

2m11.2777.1

Université de Montréal

Développement de vecteurs pharmaceutiques pour
le transport de l'ADN de *Mycobacterium phlei*

Par Meriam Kabbaj

Faculté de pharmacie

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

Décembre 1999

© Meriam Kabbaj

Université de Montréal



1:4000.11-2

QV
705
U58
2000
V.001

Université de Montréal

Développement de vecteurs pharmaceutiques pour

le transport de l'ADN de Mycobacterium phlei

Thèse de doctorat
présentée à l'Université de Montréal

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

Décembre 1979



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement de vecteurs pharmaceutiques pour
le transport de l'ADN de *Mycobacterium phlei*

Présenté par:

Meriam Kabbaj

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-Guy Besner

Président-rapporteur

Patrice Hildgen

Membre du jury

Nigel C. Phillips

Directeur de recherche

Mémoire accepté le:-----

SOMMAIRE

Mycobacterium phlei est un micro-organisme Gram positif non pathogène. La paroi mycobactérienne provenant de *M. phlei* possède une activité anticancéreuse directe par induction de l'apoptose, de même qu'un effet immunostimulant. Ces activités semblent liées à la présence d'ADN compléxé à la paroi mycobactérienne. Cependant, les applications thérapeutiques de l'ADN mycobactérien dans le traitement systémique du cancer sont limitées du fait de la courte demi-vie de l'ADN qui est sensible aux dégradations enzymatiques.

Ainsi, le but de cette étude consiste à développer un vecteur synthétique inerte pour l'ADN génomique de *M. phlei* puis à évaluer l'activité anticancéreuse de l'ADN mycobactérien une fois associé à un vecteur.

Nous avons évalué l'activité cytostatique et la cytotoxicité de 5 types de vecteurs pharmaceutiques sur des cellules issues de mélanomes de souris (B16-F1). Les liposomes anioniques composés de DPPC/DMPG montrent une activité cytostatique sans cytotoxicité directe. Les liposomes cationiques sont à la fois cytostatiques et cytotoxiques. Enfin, les liposomes composés de DPPC/DMPG/DSPE-PEG, les liposomes composés de DPPC/CHOL, les nanoparticules de lipides solides et les nanoparticules de chitosan ne

présentent aucun effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire, ni d'effets cytotoxiques. Ces derniers sont donc sélectionnés pour le transport de l'ADN génomique de *M. phlei*.

La formation d'un complexe ADN-lipide cationique (DOTAP) 5:1 (m/m) a permis l'incorporation de 10% de l'ADN dans les vecteurs neutres. Jusqu'à un rapport ADN-DOTAP 1:1 (m/m), le lipide cationique ne modifie pas l'activité de base antiprolifératrice de l'ADN de *M. phlei*. L'ADN de sperme de hareng semble diminuer fortement la toxicité du DOTAP envers les cellules tumorales. Cependant, à un rapport 1:1 (m/m) le DOTAP recouvre en partie sa toxicité une fois le complexe ADN-DOTAP associé au vecteur.

Les liposomes cationiques ainsi que le chitosan fixent plus de 90% de l'ADN et permettent une plus grande protection vis à vis des DNases.

L'efficacité antiprolifératrice de l'ADN génomique de *M. phlei* augmente fortement lorsqu'on l'associe sous forme de complexe ADN-DOTAP (5:1 ou 20:1 (m/m)) aux liposomes neutres contenant du DMPG, ou aux liposomes DPPC/CHOL. De la même manière, l'association de l'ADN de *M. phlei* au chitosan sous forme de nanoparticules augmente significativement son activité anticancéreuse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X
REMERCIEMENTS.....	XII
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION.....	1
1. APOPTOSE	3
1.1 Morphologie de l'apoptose	4
1.2 Mécanismes biochimiques	5
1.3 Modulation et transduction de l'apoptose	6
1.4 Chimiothérapie anticancéreuse et apoptose	10
2. IMMUNOTHERAPIE	14
2.1 Rôle potentiel des macrophages dans la thérapie anticancéreuse.....	14
2.2 Activation des macrophages par les lymphokines.....	15
2.3 Muramyl dipeptide (MDP).....	16
2.4 ADN mycobactérien.....	16
3. L'ADN, OUTIL THERAPEUTIQUE.....	24
3.1 ADN triplex	24
3.2 Oligonucléotides antisens (OAS).....	26
3.3 Ribozymes.....	28
3.4 ADN aptamère.....	29
4. VECTEURS SYNTHETIQUES.....	32
4.1 Vecteurs d'agents immunomodulateurs	32
4.2 Vecteurs synthétiques de l'ADN.....	36
5. OBJECTIFS	40
CHAPITRE 2	44
PRESENTATION ARTICLE 1 :.....	44
ANTICANCER ACTIVATION OF MYCOBACTERIAL DNA. EFFECT OF FORMULATION WITH CHITOSAN NANOPARTICLES	44
1. INTRODUCTION	45
2. MATERIALS AND METHODS	48
2.1 Materials.....	48
2.2 Methods.....	49
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	54
3.1 HS DNA and <i>M. phlei</i> DNA cell division inhibitory activity.....	54
3.2 Nanoparticle characterisation	55
3.3 DNase degradation assay.....	56
3.4 B16-F1 melanoma cell proliferation inhibitory and cytotoxic activity.....	58

3.5 Cell proliferation inhibitory activity of <i>M. phlei</i> DNA after association with chitosan nanoparticles or with DOPE/DOTAP liposomes	59
4. CONCLUSION	60
5. TABLES	61
6. LEGEND TO FIGURES.....	64
7. REFERENCES.....	68
CHAPITRE 3.....	75
PRESENTATION ARTICLE 2 :.....	75
ANTICANCER ACTIVATION OF MYCOBACTERIAL DNA. EFFECT OF FORMULATION WITH LIPIDIC CARRIERS.....	75
1. INTRODUCTION.....	76
2. MATERIALS AND METHODS	78
2.1 Materials	78
2.2 Methods.....	79
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	85
3.1 <i>M. phlei</i> DNA inhibits B16-F1 melanoma cell proliferation	85
3.2 Liposome and nanoparticle characterisation.....	87
3.3 Cell proliferation inhibitory activity	88
3.4 DNA/DOTAP complex is destabilised after association with lipophilic carriers.....	90
3.5. Liposomal DNA is exposed at the surface of the carrier.....	91
3.6 Cell proliferation inhibitor activity of <i>M. phlei</i> DNA is enhanced after association with neutral liposomes.....	91
4. CONCLUSION	92
5. TABLES	94
6. LEGEND TO FIGURES.....	97
7. REFERENCES.....	105
CHAPITRE 4.....	111
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	111
1. INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE PAR L'ADN DE <i>M. PHLEI</i>	112
2. DÉVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DE VECTEURS SYNTHÉTIQUES	113
2.1 Les nanoparticules de chitosan	113
2.2 les vecteurs lipidiques.....	114
2.3 Incorporation de l'ADN dans les vecteurs.....	116
2.4 Essai de dégradation par la DNase.....	116
3. EFFETS CYTOSTATIQUES ET CYTOTOXIQUES DES VECTEURS SYNTHÉTIQUES ...	117
4. ASSOCIATION ADN-VECTEUR: EFFET SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	119
4.1 ADN de sperme de hareng	119
4.2 ADN de <i>M. phlei</i>	120
5. REFERENCES.....	121

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Table 1. Mean particle size and ζ potential of chitosan nanoparticles -----	61
Table 2. Effect of <i>M. phlei</i> DNA size on chitosan particle size and ζ potential -----	62
Table 3. Mean particle size and ζ potential of DNA after treatment with DNase-----	63

Chapitre 3

Table 1. Mean diameter, ζ potential and amount of DNA associated with the carriers-----	94
Table 2. ED ₅₀ and IC ₅₀ of the four types of submicron pharmaceutical carriers-----	95
Table 3. ζ potential and size of neutral liposomes containing HS DNA-DOTAP before and after treatment with DNase-----	96

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.

Effet immunomodulateur de l'ADN mycobactérien-----21

Figure 2.

Cibles potentielles de l'ADN utilisé comme modulateur de l'expression
génétique----- 30

Chapitre 2

Figure 1.

Inhibitory activity and toxicity of *M. phlei* DNA toward B16-F1 cells----- 65

Figure 2.

Inhibitory activity and toxicity of chitosan nanoparticles and cationic
liposomes toward B16-F1 cells-----66

Figure 3.

Inhibitory activity of *M. phlei* DNA associated with chitosan
Nanoparticles-----67

Chapitre 3

Figure 1.

M. phlei DNA but not herring sperm DNA inhibits B16-F1 cells

Proliferation-----100

Figure 2.

Effect of DNA/DOTAP complexes on the proliferation of B16-F1 cells---- 101

Figure 3.

Toxicity of DNA/DOTAP complexes toward B16-F1 cells----- 102

Figure 4.

Effect of carrier associated with HS-DNA/DOTAP on the proliferation

of B16-F1 cells-----103

Figure 5.

Inhibitory activity of *M. phlei* DNA associated with liposomes----- 104

LISTE DES ABREVIATIONS

ANP	Acide nucléique peptide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BisHOP	Chlorure de dihexadécyl oxylpropyltriméthylammonium
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cellules NK	Lymphocytes tueurs naturels (natural killer)
CHOL	Cholestérol
DD	Domaine de la mort
DED	Domaine effecteur de la mort
DMPG	1,2-Dimiristoyl- <i>sn</i> -Glycéro-3-Phosphatidylglycérol
DNase	Désoxyribonucléase
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycéro-3-Phosphatidyléthanolamine
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Triméthylammonium-Propane
DOTMA	Diocetadecyl oxylpropyltriméthylammonium
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycéro-3-Phosphatidylcholine
DSPE-PEG	Distéaroylphosphatidyléthanolamine-poly(éthylène) glycol
FNT	Facteur de nécrose tumoral (tumor necrosis factor)
IFN- α,β,γ	Interféron- α,β,γ
Ig	Immunoglobuline

IL-6,12	Interleukine-6,12
IV	intraveineux
L-Fas	Ligand Fas
LDH	Lactate déshydrogénase
MAF	Facteurs activant les macrophages
MCC	Complexe cellulaire mycobactérien de <i>M. phlei</i>
MDP	Muramyl-dipeptide
MDP-CHOL	MDP-L alanyl-Cholestérol
MLV	Vésicules multi-lamellaires
<i>M. phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
MTP-PE	<i>N</i> -acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl)- <i>sn</i> -glycéro-3'-phosphatidyléthanolamine
MTT	Bromure de 3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NLS	Nanoparticules de lipides solides
NO	Monoxyde d'azote
OAS	Oligonucléotides antisens
OFT	Oligonucléotides formant un triplex
PC	Phosphatidylcholine
POE	Poly(oxyéthylène)
PG	Phosphatidylglycérol
PS	Phosphatidylsérine

RNase	Ribonucléase
R1FNT	Récepteur FNT
SA	Stéarylamine
SRE	Système réticulo-endothélial
TL	Trilaurine
FNT	Facteur de nécrose tumoral

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Nigel C. Phillips pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir initiée tout au long de ce travail à un raisonnement scientifique rigoureux grâce à ses judicieuses suggestions.

Je remercie la compagnie Bioniche Life Sciences Inc. pour son soutien financier.

Je remercie les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à la correction de ce mémoire.

Je remercie la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour m'avoir permis de poursuivre le programme de maîtrise en sciences pharmaceutiques. Un merci particulier à Gilles de Gagné pour son aide technique, à Simone Zriel et à Nadia Benzrihem pour leur aimabilité et leur précieuse aide.

Je remercie mes collègues de laboratoire d'avoir partagé mes tourments d'apprenti chercheur; un gros merci à Anh Thu Pham pour son bonheur communicatif de jeune maman et à Emmanuelle Roux pour m'avoir fait découvrir Michel Tremblay.

Je désire remercier ma famille pour son soutien affectif qui défie les frontières.

Je tiens enfin à remercier Jean-Christophe Leroux pour m'encourager au quotidien dans tout ce que j'entreprends, pour sa passion contagieuse pour la recherche, pour nos fous rires à *Banfflei* et pour notre vie à deux.

*A mon père,
pour croire à mes folies...démessurées.*

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

L'hétérogénéité biologique des cellules cancéreuses, à la fois dans les tumeurs primaires et dans les métastases, représente une des limitations majeures dans le traitement du cancer. Elle conduit à une résistance des tumeurs vis-à-vis des thérapies conventionnelles. De ce fait, les stratégies thérapeutiques doivent se diversifier, afin de contourner l'hétérogénéité tumorale et agir contre l'émergence systématique de cellules résistantes. Ainsi, l'immunothérapie et l'apoptose ouvrent des voies intéressantes pour le traitement du cancer. Il a récemment été démontré que l'ADN génomique issu de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) possédait une activité anticancéreuse, qui relève à la fois d'une action indirecte par la stimulation des macrophages et d'une action directe par l'apoptose. En effet, l'ADN de *M. phlei* induit la synthèse de nombreuses cytokines capables d'activer les macrophages *in situ*. De plus, il est capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales et d'inhiber leur prolifération. Toutefois, l'utilisation de l'ADN de *M. phlei* nécessite son incorporation dans un vecteur synthétique afin de le protéger des nucléases présentes dans les milieux physiologiques.

Nous allons dans un premier temps définir l'apoptose. Nous traiterons des mécanismes biochimiques impliqués, des principaux régulateurs qui entrent en jeu, ainsi que de l'étroite relation qui s'établit, de façon de plus en plus évidente, entre la chimiothérapie et l'apoptose. Dans un deuxième temps, nous définirons l'immunothérapie et sa contribution actuelle dans le

traitement du cancer. Nous décrivons brièvement les principaux immunomodulateurs, ainsi que la place qu'occupe l'ADN mycobactérien de manière générale et plus spécifiquement celle de l'ADN de *M. phlei* dans l'immunothérapie. D'autre part, nous consacrerons un chapitre à l'utilisation croissante de l'ADN comme agent thérapeutique. Enfin, nous donnerons un bref aperçu de l'utilisation des vecteurs synthétiques pour le transport d'immunomodulateurs et le transport de matériel génétique, notamment dans la thérapie anticancéreuse.

1. APOPTOSE

La progression tumorale résulte de la régulation de deux processus sans cesse en équilibre: la prolifération et la mort cellulaire. Les stratégies thérapeutiques actuelles ont pour but d'inhiber la prolifération cellulaire. Malheureusement les carcinomes humains les plus courants demeurent résistants à la chimiothérapie (1). Ainsi, des nouvelles stratégies anticancéreuses basées sur la régulation de la mort cellulaire voient le jour. Il est de plus en plus évident que la perte du contenu cellulaire des tumeurs spontanées et induites a lieu *via* l'apoptose (1). De plus, la majorité des agents anticancéreux induisent l'apoptose dans les cellules tumorales sensibles (2). L'apoptose a tout d'abord été définie par des critères morphologiques; on l'assimile à une mort cellulaire programmée bien que le

programme génétique ne soit pas encore bien défini (3). C'est ainsi que le concept de mort cellulaire programmée, potentiellement modulable par de nouvelles chimiothérapies, a récemment attiré l'attention des biologistes et des chimiothérapeutes.

1.1 Morphologie de l'apoptose

On a largement étudié chez le rat les critères morphologiques caractérisant l'apoptose des thymocytes immatures, induite par des glucocorticoïdes (4). Plusieurs types de cellules présentent des caractéristiques similaires lors du processus d'apoptose. Les changements morphologiques majeurs débutent par une condensation nucléaire. L'hétérochromatine granulaire devient compacte et s'agrège le long de la membrane nucléaire sous forme semi-lunaire. Le cytoplasme se rétrécit au fur et à mesure, mais les organelles cytoplasmiques demeurent morphologiquement normales. Au cours du processus, le réticulum endoplasmique se dilate et fusionne avec la membrane plasmique. Finalement les cellules se déforment et des corps apoptotiques se détachent sous forme de bourgeons (1). Ceux-ci sont rapidement reconnus *in vivo*, par des phagocytes et sont ingérés puis dégradés dans les lysosomes (1). La reconnaissance par les macrophages semble médiée par un changement de surface des oligosaccharides. Enfin, l'apoptose affecte typiquement les cellules dispersées, et ne provoque pas de

réponse inflammatoire sur le site, contrairement au phénomène de nécrose cellulaire. L'apoptose *in vitro*, est en général suivie d'une détérioration non spécifique, au fur et à mesure que la perméabilité cellulaire augmente (1). Dans les cellules épithéliales une perte des jonctions cellulaires précède les changements décrits. L'électrophorèse de l'ADN est une mesure qualitative sûre de l'apoptose, tandis qu'on utilise la cytométrie de flux pour la quantifier (5).

1.2 Mécanismes biochimiques

L'évènement biochimique le plus étudié de l'apoptose est l'activation d'une endonucléase qui clive l'ADN génomique en fragments d'environ 200 pb (6). L'électrophorèse sur un gel d'agarose permet de les révéler puisqu'ils forment une échelle caractéristique. Dans les thymocytes immatures du rat, l'activation de l'enzyme dépend du Ca^{2+} et du Mg^{2+} , elle est inhibée par le zinc (7). Les travaux de Darzynkiewicz et ses collaborateurs montrent que des inhibiteurs protéasiques préviennent l'apoptose des thymocytes, suggérant que des protéases pourraient démasquer l'activité latente de l'endonucléase (8). De plus, il a été proposé par Eastman et ses collaborateurs que l'endonucléase impliquée dans les cellules HL60 (promyélocytes) et CHO (chinese hamster ovary) est similaire à la DNase II active à pH acide (9), alors que Arrends et Willie suggèrent que l'endonucléase responsable de

l'apoptose des thymocytes est active à pH neutre (6). Enfin, Gaido et Cidlowski ont récemment isolé une endonucléase dépendante du Ca^{2+} à partir des thymocytes (NUC 18) qui est inhibée par le zinc et l'acide aurintricarboxylique (10). Par conséquent, il n'est pas clair à l'heure actuelle, que l'enzyme responsable du clivage de l'ADN dans l'apoptose soit identique dans tous les types de cellules.

L'activation de transglutaminases tissulaires semble aussi être un mécanisme biochimique impliqué dans l'apoptose. Des expériences effectuées par Piacentini et ses collaborateurs montrent que des hépatocytes apoptotiques acquièrent une membrane rigide suite à l'action de transglutaminases, responsables d'une liaison croisée membrane-protéine (11).

1.3 Modulation et transduction de l'apoptose

1.3.1 Régulation génétique

Hortvitz et ses collaborateurs ont montré que l'expression du gène Ced-9 chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) peut supprimer le processus de mort cellulaire (12). Un parallèle surprenant a été démontré chez les cellules de mammifères avec la découverte de l'oncogène Bcl-2, capable de

supprimer ou du moins de retarder l'apoptose de cellules B malignes (1, 13). Bcl-2 est un membre caractéristique d'une famille comprenant une douzaine de protéines, codées par des espèces aussi diverses que les mammifères, les vers ou les virus. Tandis que l'expression de certaines protéines comme Bcl-2 et Bcl-x supprime l'apoptose, l'expression d'autres gènes comme Bax et Bak peuvent la promouvoir (14). Les protéines pro-apoptotiques interagissent avec les protéines anti-apoptotiques par leur domaine BH3 de façon antagoniste, afin de réguler la survie cellulaire. Celle-ci se détermine par le rapport du niveau d'expression de chacune des protéines (15). Par exemple, si le niveau de Bcl-2 est supérieur à celui de Bax, la survie cellulaire prévaut, alors que la situation inverse conduit à une mort cellulaire (16). De ce fait, la surexpression de Bcl-2 promouvoit le cancer et représente un facteur déterminant dans les lymphomes des cellules folliculaires B chez l'Homme (14). A l'opposé, la perte de Bax favorise la formation de tumeurs chez la souris (17) et probablement chez l'Homme (18), alors que sa surexpression est associée à la suppression tumorale *in vitro* (19). Il est probable que Bcl-2 agisse comme un canal ionique pour réguler l'apoptose (20).

La moitié de tous les cancers humains se caractérisent par une mutation de p53, une protéine impliquée dans la suppression des tumeurs (21). p53 peut activer le processus d'apoptose en partie par activation de Bax (22).

Enfin, les proto-oncogènes *C-myc* et *C-fos* sont aussi capables de moduler l'apoptose (23).

Ainsi, la régulation de l'apoptose, bien qu'essentielle pour le développement et l'homéostasie, peut promouvoir certaines maladies, notamment le cancer, lorsqu'elle s'exprime de manière inadéquate.

1.3.2 Caspases

Des observations sur le cheminement moléculaire conduisant à la mort cellulaire montrent que les inhibiteurs de l'apoptose de type Bcl-2 préviennent l'activation de cystéines protéases (ICE) appelées couramment caspases (24). Ces protéases ont été découvertes par analogie avec Ced-3 de *C. elegans* qui est essentiel à la mort cellulaire des nématodes (25). De nombreux homologues aux ICE, exprimés sous forme de proenzymes inactives, ont été identifiés chez les mammifères, chez les nématodes (26) et chez les mouches (27). L'activation de ces caspases entraînent des clivages protéolytiques en cascade qui aboutissent à l'exécution de l'apoptose (28, 29). L'inhibition des caspases peut être, suivant les cas, suffisante (30) ou insuffisante (31) pour inhiber la mort cellulaire.

1.3.3 Récepteurs FNT (R1FNT) et Fas

Les signaux de transduction régulant l'activation des caspases proviennent des recherches sur les mécanismes d'apoptose induits par R1FNT et Fas. Ce sont deux récepteurs cellulaires de surface qui une fois trimérisés avec des ligands (respectivement FNT- α et L-Fas) induisent l'apoptose (32). Ces mécanismes jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire. En effet, des désordres auto-immuns sont associés à la fonction Fas (33) et une expression anormale de L-Fas peut permettre aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance immunitaire (34). Le signal apoptotique induit par Fas et R1FNT nécessite un domaine de la mort (DD) dans la partie cytoplasmique de chaque récepteur. Des protéines adaptatrices (FADD/MORT1 et RAIDD) se lient aux DD par leur propre domaine (35, 36). Un domaine de la mort effecteur (DED) de FADD/MORT1 est nécessaire pour la propagation du signal apoptotique. Le DED se lie au prodomaine de la caspase 8 (FLICE/MACH) offrant une connexion entre Fas ou R1FNT et les protéases ICE reliées. Ainsi, lors d'une liaison ligand/récepteur FADD/MORT1 recrute le prodomaine de la caspase 8 formant un complexe qui active l'enzyme et déclenche l'apoptose (37). La régulation de l'apoptose induite par Fas et R1FNT s'accomplit par des modulateurs de ces récepteurs et par l'expression des inhibiteurs des caspases (38, 39)

1.4 Chimiothérapie anticancéreuse et apoptose

1.4.1 Agents chimiques induisant l'apoptose

Il a été démontré que l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, induit une fragmentation intranucléosomale de l'ADN (40); le mécanisme d'action, alors soupçonné, était l'apoptose. Depuis, le spectre des agents chimiothérapeutiques causant l'apoptose n'a cessé de s'élargir. Parmi ceux-là, on trouve la dexaméthasone, la vincristine, le cisplatine, le cyclophosphamide, le paclitaxel, le 5'-fluoro-déoxyuridine, le 5'-fluorouracile et l'adriamycine (41). Leurs effets apoptotiques ont été observés sur plusieurs lignées cellulaires, comprenant les thymocytes normaux, les cellules de lymphomes, les tumeurs épithéliales ovariennes, les cellules de leucémies, les cellules adénocarcinomaux (2). De plus, d'autres études démontrent la capacité des agents chimiques à induire l'apoptose *in vivo*. Une étude expérimentale chez la souris montre que le cisplatine, le cyclophosphamide et d'autres agents causent l'apoptose dans plusieurs tumeurs *in vivo* (adénocarcinome, lymphome, sarcome, carcinome de cellules squameuses) (42). De plus, on a observé chez les patients leucémiques que la chimiothérapie (étoposide, cytosine arabinoside) causait la mort cellulaire par apoptose (43). Ainsi, les études effectuées *in vivo* et *in vitro* démontrent clairement l'induction de l'apoptose par plusieurs agents chimiques dans

différentes lignées cellulaires et tumorales, bien que l'on ne sache pas encore très exactement la fraction de la mort cellulaire attribuée à l'apoptose.

1.4.2 Mécanisme d'induction de l'apoptose par des agents chimiques

Avec nos connaissances croissantes sur les mécanismes régulant l'apoptose, il est de plus en plus évident que les agents chimiques agissent de manière similaire. En effet, certains mécanismes régulant l'apoptose proviennent d'observations faites sur la mort cellulaire induite par des agents chimiques. Ceci s'illustre bien avec l'étoposide qui induit un clivage protéolytique de poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette enzyme joue un rôle central dans les mécanismes de l'apoptose (40). Ainsi, plusieurs agents chimiques convergent vers l'activation de cette protéase ainsi que d'autres protéases reliées, aboutissant à l'exécution de l'apoptose.

1.4.3 Interaction entre les agents chimiques et les modulateurs de l'apoptose

Les agents chimiques sont capables d'interagir avec les modulateurs de l'apoptose. Ainsi, la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose *in vitro*, en réponse à plusieurs agents chimiques (44). D'un autre côté, l'expression réduite de Bax, un homologue pro-apoptotique de Bcl-2, est associée à une

faible réponse à la chimiothérapie combinatoire et à une faible survie chez les patients atteints de carcinomes métastatiques du sein (45). De la même manière, l'interruption de p53 protège les cellules carcinomales du sein de la mort induite par le platine (46). De plus, la protéine du virus d'Epstein Barr, montrant une homologie de structure et de fonction avec Bcl-2, protège les cellules de la mort induite par l'étoposide et le cisplatine (47); l'expression de Bcl-x, module la sensibilité aux drogues des neuroblastomes du cancer du sein (48) et des cellules polymphocytiques (49). Enfin, les oncogènes H-ras et MDM2 confèrent une résistance à l'apoptose induite par les drogues, respectivement dans les rhabdomyosarcomes et les glioblastomes (50, 51).

L'hypothèse la plus probable propose que chaque agent chimiothérapeutique agisse contre une cible spécifique, causant une dysfonction et un dommage qui est alors interprété par les cellules cancéreuses sensibles comme un signal pour enclencher l'apoptose (2). On peut ainsi distinguer trois phases:

- Phase 1: stress générateur du mécanisme. Dans cette phase, chaque classe d'agents chimiques agit contre une cible spécifique comme l'ADN, l'ARN ou les microtubules, causant un stress local.

- Phase 2: signal de transduction. C'est la phase au cours de laquelle la cellule est capable par des mécanismes encore mal connus de déchiffrer et de transmettre les dommages commis à une cible chimique. Par exemple, les agents causant des dommages au niveau de l'ADN utiliseraient la c-Abl tyrosine kinase pour induire l'arrêt du cycle cellulaire par un mécanisme dépendant de p53 (52). Ou encore, le traitement de certaines leucémies de cellules T avec la doxorubicine, favoriserait la liaison du ligand au récepteur Fas, ce qui conduirait à la mort de ces cellules (53).

- Phase 3: exécution de l'apoptose. Dans cette dernière phase un point décisif existerait, à la suite duquel les cellules sensibles réagiraient aux dommages induits en exécutant l'apoptose, alors que les cellules résistantes entreprendraient plutôt les réparations nécessaires à leur survie. C'est ainsi que les radiations gamma induisent l'expression du facteur pro-apoptotique Bax dans les cellules radio-sensibles, mais non dans les cellules radio-résistantes (52). Dans cette phase les cellules sensibles enclenchent la destruction des molécules par l'action des protéases, des endonucléases, des transglutaminases et probablement des lipases. Les cellules résistantes exécutent un programme d'arrêt du cycle cellulaire et une réparation des dommages induits. Il a été démontré que les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules normales (54), bien que beaucoup de cellules tumorales soient résistantes à l'apoptose.

2. IMMUNOTHERAPIE

Une des limitations majeures dans le traitement du cancer est l'hétérogénéité biologique des cellules cancéreuses, à la fois dans les tumeurs primaires et dans les métastases (55). Cette hétérogénéité se manifeste dans une grande variété de propriétés cellulaires telles que les enzymes de surface, les récepteurs, les caryotypes, la morphologie, les propriétés de croissance, l'antigénicité et la capacité d'envahir et de produire des métastases (56). Par conséquent, les stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer doivent pouvoir contourner l'hétérogénéité tumorale, agir contre l'émergence systématique de cellules résistantes aux thérapies et provoquer une réaction enclenchée par l'hôte lui-même qui favoriserait l'éradication des cellules tumorales. C'est ainsi que l'immunothérapie semble une thérapie complémentaire intéressante à la chimiothérapie.

2:1 Rôle potentiel des macrophages dans la thérapie anticancéreuse

Les phagocytes mononucléés jouent un rôle important dans l'homéostasie. Ils sont impliqués dans le processus du renouvellement tissulaire comprenant le remodelage tissulaire pendant l'embryogénèse, la destruction puis la réparation de tissus endommagés et le renouvellement tissulaire suite à l'élimination des cellules sénescents (57). Ils interviennent aussi dans la réponse aux agressions externes, comme la défense contre les infections

microbiennes (58) et parasitaires (59); enfin, ils jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les néoplasies (60). En effet, l'invasion et la prolifération de la tumeur provoque un stress du tissu avoisinant et aboutit à l'infiltration des leucocytes et des macrophages sur le site. Certaines substances dans l'environnement activent les macrophages, qui peuvent alors reconnaître spécifiquement les cellules tumorales (61). Ainsi, ils joueraient un rôle dans la protection de l'hôte contre les cellules néoplasiques (62). La réponse immune non spécifique peut aussi activer les monocytes circulants, les macrophages fixes comme les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires et parfois les lymphocytes tueurs naturels (cellules NK). Ces cellules activées produisent et sécrètent des enzymes cytolytiques, des protéases, des peroxydes d'hydrogène et plusieurs lymphokines capables de potentialiser l'activité antinéoplasique .

2.2 Activation des macrophages par les lymphokines

Les macrophages acquièrent des propriétés antitumorales à la suite de leurs interactions avec les lymphokines (63). Suite à un signal tel que les lipolysaccharides ou les muramyl-peptides, les macrophages sont activés par l'intermédiaire de l'interféron- γ (IFN- γ) (64). Les interférons α ou β augmenteraient la réponse des macrophages à l'IFN- γ (65). Cependant, les propriétés antitumorales des macrophages activés par les lymphokines sont

de courte durée et les cellules deviennent vite réfractaires à toute réactivation. Par conséquent, l'administration systémique de lymphokines solubles ne provoque pas une activation soutenue des macrophages (66).

2.3 Muramyl dipeptide (MDP)

Les macrophages peuvent aussi être activés suite à leur interaction avec les micro-organismes ou leurs produits dérivés. Le MDP est le plus petit segment défini de la paroi bactérienne capable d'activer les macrophages (67). Il a été démontré qu'un analogue synthétique du MDP, le MTP-PE (*N*-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl)-*sn*-glycero-3'-phosphatidyléthanolamine) activerait les macrophages *in vitro* (68). Néanmoins, même injecté à haute dose le MDP est rapidement éliminé et ne provoque pas une réponse antitumorale très marquée (69).

2.4 ADN mycobactérien

L'ADN possède toutes les qualités caractéristiques d'un bon antigène, à savoir, une taille importante, des structures diverses, des séquences différentes selon les espèces et une large possibilité de liaison avec les récepteurs. Malgré cela, l'ADN a longtemps été perçu comme immunologiquement inerte et n'attirait que peu l'attention des immunologistes.

Ces dernières années ont connu une véritable révolution dans la conception de l'ADN comme immunostimulant. Plusieurs études démontrent que l'ADN mycobactérien stimule la prolifération des cellules B (70) et des immunoglobulines à la fois *in vitro* et *in vivo* (71). Les propriétés stimulantes de l'ADN reflètent une microhétérogénéité structurale et résultent de séquences immunostimulantes représentées par des résidus CpG non méthylés (72). En effet, la méthylation de l'ADN d'*Escherichia coli* avec la CpG méthylase abolit toute mitogénicité envers les cellules B, démontrant que la méthylation des résidus CpG est en grande partie responsable de l'activité immune de l'ADN bactérien (73). On a récemment obtenu les mêmes résultats avec de l'ADN d'insecte (*Drosophila melanogaster*) (74). Par contre, à l'inverse des bactéries, des virus et des insectes, l'ADN des mammifères est très pauvre en CpG; de plus, il se différencie par une très lourde méthylation de ces dinucléotides (75). Comme l'ADN des mammifères ne stimule pas la prolifération des cellules B (76), la mitogénicité semble tout à fait coïncider avec la présence de motifs CpG non méthylés (fig.1).

L'effet stimulant de l'ADN bactérien est reproduit avec des oligonucléotides synthétiques contenant un ou plusieurs dinucléotides CpG (73). L'activité optimale pour stimuler la prolifération des cellules B nécessite une séquence d'ADN particulière où un motif CpG est accompagné de deux purines en 5' (de préférence des dinucléotides GpA) et de deux pyrimidines en 3' (de

préférence des dinucléotides TpC ou TpT) formant un palindrome. Ainsi, tous les oligonucléotides synthétiques dont la séquence est proche de ce palindrome idéal présentent des effets stimulants importants, alors que l'activité est réduite lorsque cette séquence est perturbée (73). Les résidus CpG induisent une sécrétion rapide et coordonnée de l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-12 et l'IFN- γ (77). L'IL-6 contribue à l'activation des cellules B et T (78), l'IL-12 régule la production d'IFN- γ et contribue à l'activation des cellules NK (79). L'IFN- γ augmente la capacité des macrophages à éliminer les pathogènes extra et intracellulaires (fig.1) (80).

2.4.1 BCG

La démonstration de l'activation des lymphocytes B de souris par des motifs CpG a certes galvanisé l'intérêt concernant le potentiel immun de l'ADN bactérien; mais les premières découvertes dans ce domaine, proviennent d'études sur l'induction par *Mycobacterium bovis* (Bacille de Calmette-Guérin-BCG) d'une résistance vis-à-vis des tumeurs chez les souris (81). Un constituant soluble appelé MY1, isolé à partir du micro-organisme, provoque une régression de tumeurs transplantables, *in vivo*, sans cytotoxicité directe. Ce constituant est composé de 98% d'acides nucléiques (70% ADN et 28% ARN), 1,3% de protéines, 0,27% d'hexose et 0,1% de lipides (82). L'ADN présent dans MY1 est responsable de la puissante activité

antitumorale; en effet, la fraction digérée par de la RNase et contenant 97% d'ADN montre une activité supérieure à MY1, tandis que MY1 traitée par de la DNase et composé essentiellement d'ARN possède une activité négligeable (83).

Comme il a été démontré dans les expériences effectuées *in vivo* et *in vitro*, l'activité antitumorale induites par l'ADN résulte d'une augmentation de l'activité des cellules NK (82). On a trouvé que lorsque des cellules de la rate de souris sont incubées *in vitro* avec MY1, l'activité des cellules NK augmente remarquablement; de plus, les cellules de la rate produisent des facteurs capables d'activer les macrophages normaux et de les rendre cytotoxiques envers les cellules tumorales (82). En effet, MY1 stimule *in vitro* la production des interférons α/β (IFN- α/β) ainsi que IFN- γ . On a tenté de caractériser les facteurs relâchés dans le surnageant des cultures cellulaires. On constate que l'activation des macrophages est complètement inhibée après un traitement avec une petite quantité d'antisérum anti-IFN- γ , ou sous des conditions acides, mais n'est pas affectée lors d'un traitement avec un antisérum anti- α/β . A l'inverse, l'activité antivirale est presque totalement inhibée en présence d'un antisérum anti- α/β , alors qu'elle n'est pas affectée par un d'antisérum anti-IFN- γ , ni par un pH acide. Ceci nous indique que l'activité MAF (facteurs activant les macrophages) est attribuée à la production d' IFN- γ alors que l'activité antivirale est due aux IFN- α/β (82).

Les macrophages/monocytes jouent un rôle central en élaborant l'IL-12 (fig.1) (84). Il a été démontré que l'IL-12 possède une puissante activité anticancéreuse après l'administration systémique ou locale, chez les souris porteuses d'une grande variété de tumeurs comprenant les mélanomes, les carcinomes, les sarcomes, les carcinomes de la vessie, et les lymphomes (85). En effet, l'IL-12 joue un rôle important dans le développement des lymphocytes T auxiliaires de type 1, elle stimule la synthèse d'IFN- γ , elle bloque l'angiogénèse à des sites de croissance tumorale, et elle augmente l'activité des cellules NK et des cellules T cytotoxiques (86). L'IL-12 peut aussi exercer un effet direct sur certaines cellules cancéreuses en inhibant leur prolifération *via* l'apoptose (87).

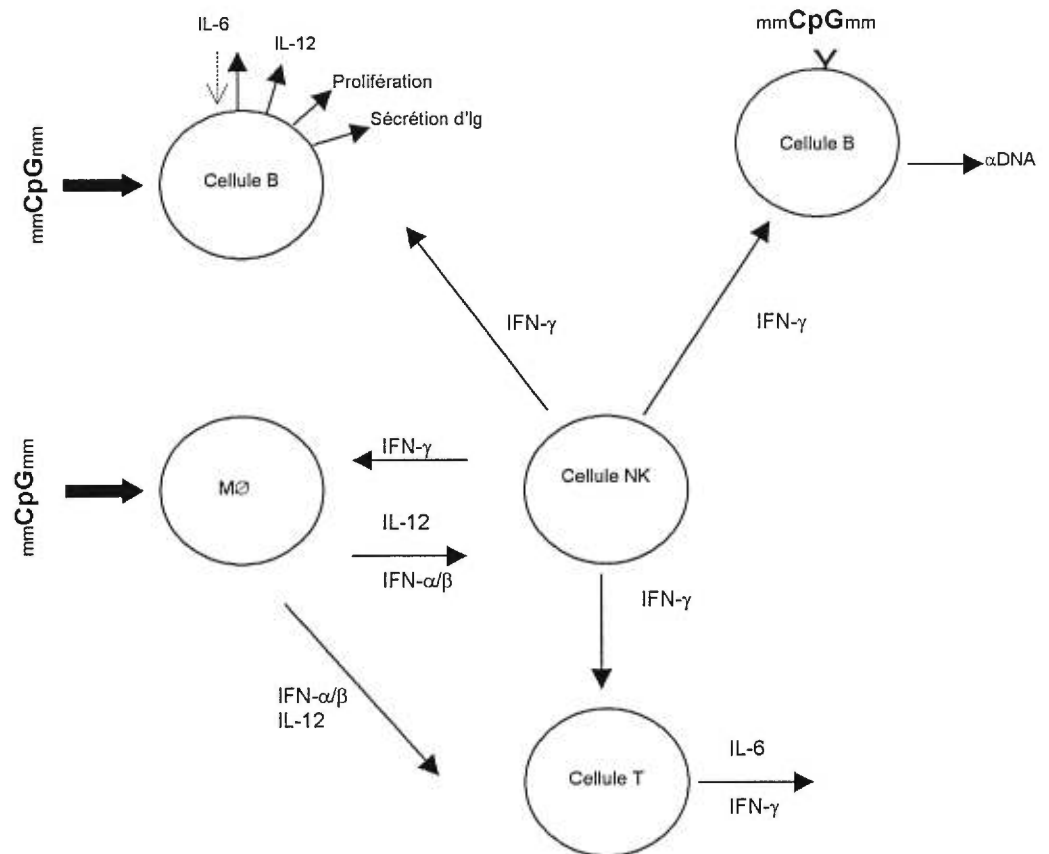


Figure 1: Effet immunomodulateur de l'ADN mycobactérien.

Tokunaga et ses collaborateurs ont synthétisé une variété d'oligonucléotides simple brin de 45 unités avec une séquence présente dans l'ADN codant pour des protéines de BCG, puis ils ont testé leur capacité à stimuler les cellules NK (88). Tous les oligonucléotides biologiquement actifs possédaient une ou plusieurs séquences palindromes alors que les oligonucléotides inactifs n'en contenaient pas. Cela suggère fortement que

des séquences palindromes tels que GACGTC, GGCGCC et TGCGCA sont essentiels pour qu'un oligonucléotide synthétique de 30 unités induise la production d'IFN- γ .

Le traitement intravésical du cancer superficiel de la vessie avec la bactérie vivante de Calmette-Guérin est une immunothérapie efficace (89). Cependant l'utilisation d'organismes BCG vivants a été associée à de nombreux effets secondaires comme la fièvre, l'infection granulomateuse et souvent même la mort (90). Les variations de la viabilité et de l'immunogénicité sont d'autres désavantages liés à l'utilisation de bactéries vivantes comme agents immunothérapeutiques (91). Ceci a conduit au développement d'immunomodulateurs qui seraient aussi efficaces mais moins toxiques.

2.4.2 ADN de *M. phlei*

Un extrait de la paroi mycobactérienne dérivée de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*), a démontré une activité anticancéreuse (92). *M. phlei* est un micro-organisme Gram positif, non pathogène pour les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères. Cette bactérie ubiquitaire se trouve dans le sol, les plantes et l'eau potable (93). *M. phlei* est reconnu pour être un immunomodulateur efficace contre les infections virales et parasitaires (94).

Le complexe cellulaire mycobactérien de *M. phlei* (MCC) est composé de la paroi cellulaire à la surface de laquelle des fragments d'ADN mycobactérien sont complexés. On a trouvé que des préparations de MCC contenaient environ 5 à 10% d'ADN sous forme de courts oligonucléotides (95). Une thérapie intravésicale avec cet extrait diminue la récurrence du cancer de la vessie chez la souris ainsi que chez les patients atteints de carcinomes de la vessie (96). Ce complexe est capable d'induire *in vitro* et *in vivo* la synthèse d'un grand nombre de cytokines humaines et de souris (97). C'est notamment un puissant inducteur de la sécrétion d'IL-12 par les monocytes et les macrophages (98). Chez les individus sains, les monocytes et les macrophages sont présents au niveau de la paroi de la vessie alors qu'ils sont localisés autour des îlots tumoraux chez les patients cancéreux. L'IL-12 synthétisée par ces monocytes et ces macrophages pourrait contribuer fortement à l'activité antitumorale de MCC. De plus, MCC est capable d'inhiber directement la prolifération de cellules carcinomales HT 1197 et HT 1376 en induisant l'apoptose. On a démontré que l'ADN de *M. phlei* associé à la paroi était responsable de l'activité de MCC (98).

3. L'ADN, OUTIL THERAPEUTIQUE

De nombreuses maladies semblent avoir une base génétique, ce qui a conduit à l'utilisation de l'acide nucléique comme agent thérapeutique. Quatre types de drogues génétiques sont actuellement reconnues: l'ADN triplex, les oligonucléotides antisens (OAS), les ribozymes et l'ADN aptamère.

3.1 ADN triplex

3.1.1 Structure

Les oligonucléotides formant un triplex (OFT) fixent spécifiquement les bases de l'ADN double brin - duplex - par une simple reconnaissance entre une purine de l'ADN duplex et les bases de l'OFT (99). Un triplex peut être constitué de deux brins pyrimidine et d'un brin purine YR*Y ou de deux brins purine et d'un brin pyrimidine YR*R (ou Y=pyrimidine et R=purine). Les brins sont formés d'ARN et/ou d'ADN. L'association colinéaire de trois brins d'oligonucléotides a lieu lorsque un troisième brin vient se fixer à l'ADN double hélice formant des paires d'Hoogsten avec les purines des paires de base de Watson-Crick (99). Des triplex intramoléculaires peuvent aussi se former lorsque l'ADN double hélice s'arrange en région homopurine-homopyrimidine (99). Deux conditions sont nécessaires à la formation de triplex YR*R et YR*Y: le duplex impliqué doit posséder une séquence

d'homopurine dans un brin et l'orientation des deux brins homologues doit être antiparallèle. Les triplex hybrides constitués d'ADN et d'ARN sont moins bien identifiés et sont exclusivement constitués de triplex YR*Y.

3.1.2 Mécanisme d'action et applications

Les OFT en se fixant à un gène particulier empêchent ainsi sa fonction et son expression. A la suite de cette liaison, la présence physique d'un troisième brin ainsi que le changement de conformation de la structure hélicoïdale empêchent les interactions ADN/protéine nécessaires à une transcription efficace (fig.2) (100). En cela, les OFT représentent des drogues intéressantes pour la thérapie anticancéreuse. La surexpression de l'oncogène *c-myc* a été identifiée dans plusieurs tumeurs, notamment dans le carcinome ovarien et celui du col de l'utérus. *C-myc* semble être une bonne cible pour l'ADN triplex. En effet, des études montrent que l'ADN triplex réduit le niveau de transcription de *c-myc* (101) et conduit à la suppression de la croissance carcinomale (99). De plus, l'oncogène HER-2/neu est surexprimé dans près de 25% des cancers mammaires chez l'humain. L'ADN triplex peut diminuer sa transcription en interférant avec les liaisons des protéines nucléaires (102). Enfin, d'autres études démontrent que les OFT sont capables d'inhiber l'expression du génome du HIV (103).

3.1.3 Modifications

Afin de contourner l'instabilité des OFT dans les fluides biologiques, le squelette sucre/phosphate est remplacé par un squelette de structure peptidique formant ainsi les acides nucléiques peptides (ANP) (104).

3.2 Oligonucléotides antisens (OAS)

3.2.1 Structure

Les OAS font références aux simples brins d'ADN ou d'ARN capables de bloquer le transfert de l'information depuis la base génétique jusqu'aux protéines exprimées, en interférant avec l'expression de l'ARNm (fig.2) (105). Ceci est un processus naturel qui permet la régulation de nombreux gènes simplement par complémentarité d'un brin ARNm sens et d'un brin d'ADN ou d'ARN antisens. Les OAS ciblent l'ARNm sans affecter l'expression d'autres gènes (105).

3.2.2 Mécanisme d'action et applications

Plusieurs théories existent concernant le mécanisme d'action des OAS. La première implique une liaison avec l'ARNm cible, qui conduit à l'inhibition physique de la translation des ribosomes (105). D'autres théories impliquent l'attachement à un site spécifique en 5' de l'ARNm, ce qui inhibe

l'attachement des facteurs de translation (106). Enfin, la liaison des OAS à l'ARNm entraînerait sa dégradation par la RNase-H, qui clive l'ARNm (107). Les applications potentielles de la thérapie antisens sont nombreuses, notamment dans la thérapie anticancéreuse où l'inhibition d'une protéine anormalement exprimée à partir d'un oncogène activé constitue une cible intéressante. Le proto-oncogène *C-myb* semble impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules hématopoiétiques. Plusieurs études ont montré l'inhibition *in vitro* des cellules leucémiques et des cellules mononucléaires de la moëlle osseuse à l'aide des OAS ciblés contre *C-myb* (108). De plus, les oncogènes ras impliqués dans 10 à 20% des tumeurs chez l'Homme présentent une mutation dans un des trois gènes ras qui conduit à la production d'oncoprotéines responsables du phénotype malin (109). Les cellules H460a issues du cancer du poumon chez l'Homme, possèdent une mutation de K ras. Des études *in vitro* ont alors démontré une diminution de la croissance cellulaire lors de l'utilisation d'OAS contre K ras (110).

3.2.3 Modifications

Plusieurs modifications chimiques sont effectuées sur les OAS afin de les rendre plus résistants vis-à-vis des dégradations enzymatiques dans les fluides biologiques. Les modifications les plus courantes consistent à remplacer chaque phosphate du groupement phosphodiester par un soufre

pour former les oligonucléotides méthylphosphonates ou phosphothioates (111). Ces OAS synthétiques sont très actifs mais ils ont le désavantage d'être toxiques et immunogènes (112).

3.3 Ribozymes

3.3.1 Structure

Ce sont des petites molécules d'ARN capables d'avoir une activité catalytique par un réarrangement des liaisons phosphodiester (113). A ce jour motifs différents d'ARN ribozyme ont été identifiés (114).

3.3.2 Mécanismes d'action et applications

Deux mécanismes d'action sont envisageables: l'attachement des ribozymes à l'ARNm empêche la translation et le métabolisme de l'ARNm, ou alors conduit au clivage et à l'inactivation de ce dernier (fig.2) (104). Un ribozyme anti-*ras* a été utilisé afin de cibler la séquence GUC mutante dans le codon 12 de l'oncogène H-*ras* (115). Il a été démontré que l'expression de H-*ras* et de la protéine correspondante a dès lors fortement diminué. De plus, des études *in vivo* sur des souris athymiques confirment la suppression des propriétés tumorales des cellules EJ transfectées avec le ribozyme anti-H-*ras*

(116). Enfin, la mutation de *K-ras* a été identifiée dans 90% des carcinomes hépatiques (117) et représente une cible potentielle pour une thérapie par des ribozymes. Un ribozyme a été développé contre le codon muté *K-ras* dans la lignée des cellules pancréatiques humaines, Capan-1 (114). Différents vecteurs ont été utilisés pour transférer le ribozyme anti-*K-ras* à ces cellules. Les résultats ont montré une forte diminution de la croissance cellulaire et du phénotype malin, surtout lors de l'utilisation d'un vecteur adénoviral.

3.4 ADN aptamère

Il s'agit de simples ou de doubles brins d'acides nucléiques pouvant se lier aux protéines et aux petites molécules (118). Les aptamères utilisés comme agents thérapeutiques se lient aux protéines impliquées dans la régulation et l'expression de gènes comme par exemple les facteurs de transcription. Ils les empêchent alors d'assurer leurs fonctions normalement, modulant ainsi l'expression des gènes dépendants de leur activité (fig.2). Quelques molécules aptamères possèdent un effet biologique. Les oligonucléotides phosphothioates double brin sont capables de lier le facteur de transcription NF- κ B et sont utilisés pour moduler spécifiquement l'expression du gène CAT transfecté ou du gène IL-12 endogène, dans les cellules B et les cellules T (119). De plus, Bock et ses collaborateurs ont isolé de l'ADN aptamère

composé de 15 unités qui se lie à la thrombine humaine (120). Celui-ci peut prévenir la coagulation *in vitro* catalysée par la thrombine à des concentrations nanomolaires. Des effets anticoagulants ont aussi été démontrés *in vivo* (121). L'aptamère pour la thrombine possède une structure nouvelle G-quadruplex et produit ses effets biologiques en rentrant en compétition avec le fibrinogène (122).

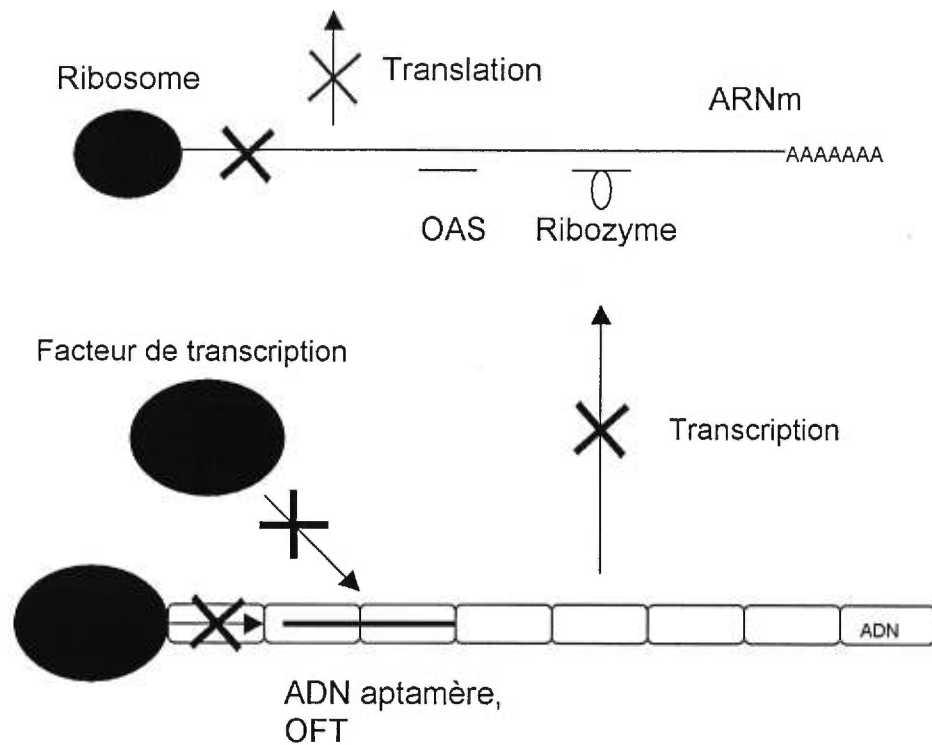


Figure 2 : Cibles potentielles de l'ADN utilisé comme modulateur de l'expression génétique.

Toutefois, un problème se pose pour l'administration de l'ADN immunomodulateur ou de l'ADN utilisé comme agent anticancéreux, en raison des nucléases présentes dans le sérum et dans l'environnement intracellulaire (123, 124). Ces enzymes sont capables de dégrader les liaisons phosphodiester de l'ADN et de compromettre son activité. En effet, l'ADN nu est dégradé en quelques minutes; sa demi-vie plasmatique après l'injection intraveineuse chez la souris est d'environ 5 à 10 min (42). De plus, l'ADN est une grosse molécule qui ne pénètre pas facilement les membranes des cellules cibles pour atteindre le site d'action intracellulaire. Par conséquent, le développement de systèmes vectoriels appropriés semble crucial pour délivrer les acides nucléiques. Les vecteurs de choix pour le transport de matériel génétique sont actuellement les systèmes viraux, comme les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés et le virus de l'herpes (125). Ce type de vecteur est efficace pour insérer des gènes étrangers dans des cellules; cependant, ils peuvent devenir pathogènes et générer de fortes réponses immunitaires qui compromettent sérieusement leur utilisation (49). Ces limitations ont conduit au développement de vecteurs synthétiques non viraux, qui protégeraient les acides nucléiques des dégradations enzymatiques, permettraient un long temps de circulation et favoriseraient le ciblage de tissus spécifiques.

4. VECTEURS SYNTHETIQUES

4.1 Vecteurs d'agents immunomodulateurs

Une des limitations majeures de l'immunothérapie est que la majorité des immunomodulateurs nécessite l'incorporation dans un vecteur, du fait de leur courte demi-vie et pour assurer un ciblage efficace des macrophages. Les liposomes ont largement été utilisés comme vecteurs d'immunomodulateurs pour cibler les cellules de Kupffer (63). Plus récemment, on rapporte l'utilisation de nanocapsules (126) et de lipoprotéines de faible densité lactosylées (127). En général, ces particules après l'administration intraveineuse sont rapidement captées par le système des phagocytes mononucléés et particulièrement par les cellules du foie et de la rate.

4.1.1 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules uni- ou multilamellaires de phospholipides s'ordonnant en feuillets bimoléculaires. Ils ont une taille variant de 10 nm à 10 μ m. Ils ont été décrits pour la première fois par Bangham en 1965 (Angleterre) (128).

La structure de base d'un liposome est un lipide composé d'une tête polaire (généralement un groupe phosphate) attachée à une chaîne

hydrophobe (chaîne hydrocarbonée). En milieu aqueux, les molécules lipidiques tendent donc à s'arranger en structures ordonnées de façon à ce que les parties hydrophobes évitent tout contact avec les molécules d'eau. La structure lipidique la plus simple est la bicouche plane. Néanmoins, une telle structure est instable et tend à se refermer sur elle-même, induisant ainsi la formation de vésicules sphériques.

L'aptitude de ces vésicules à être incorporée par divers types de cellules et leur capacité à contenir certains principes actifs ont incité, depuis environ 30 ans, la communauté scientifique à utiliser les liposomes comme vecteurs de médicaments. Il semble que les liposomes représentent le véhicule de choix pour l'administration d'immunomodulateurs. Ils peuvent transporter simultanément plusieurs molécules, les protègent dans le plasma et agissent eux-même comme immunoadjuvants (129, 130). De plus, ils réduisent considérablement l'extravasation et l'élimination rénale des immunomodulateurs et surtout ils favorisent le ciblage des macrophages (131). En effet, suite à l'administration IV, les liposomes sont naturellement captés par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) du foie et de la rate et par les monocytes circulants. Le matériel biologique actif une fois phagocyté, est libéré dans le cytoplasme évitant ainsi tout problème de dilution, de liaisons protéiniques et minimisant l'apparition d'effets secondaires indésirables (132, 133). Ainsi, l'endocytose de liposomes

contenant des lymphokines (MAF, IFN- γ), des peptides muramyl (MDP, MTP-PE), ou une combinaison synergique des deux, peuvent générer des macrophages cytotoxiques *in situ* de manière plus efficace que leurs formes libres respectives (63, 134). On a montré que les administrations multiples de ce type de liposomes conduisent à l'éradication des métastases dans plusieurs systèmes tumoraux chez la souris (135-137) et dans l'ostéosarcome spontané chez le chien (138).

On note que la distribution des liposomes administrés par voie IV peut être affectée par leur taille, leur composition, et leur charge, bien que la majorité se retrouve dans les cellules du SRE. En ce qui concerne la composition phospholipidique des vésicules multilamellaires (MLV), plusieurs groupes de recherche ont identifié certaines classes de phospholipides qui sont préférentiellement reconnues par les macrophages. Ainsi, l'incorporation de lipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylglycérol (PG) dans les MLV de phosphatidylcholine (PC) augmente la liaison et l'endocytose par les macrophages (131). Au contraire, les MLV neutres composés exclusivement de PC n'assure pas une adhésion suffisante avec les macrophages. En fait, l'inclusion de PS dans les MLV de PC entraîne leur reconnaissance par toutes les cellules du SRE. Leur activation nécessite l'endocytose des liposomes, suivie d'une période de plusieurs heures avant l'expression de l'activité antitumorale (68). Les études

sur les mécanismes d'activation des macrophages par des immunomodulateurs contenus dans des liposomes montrent que des récepteurs à la surface des macrophages ne sont pas nécessaires, mais que l'activation résulte de l'interaction des immunomodulateurs avec des cibles ou des récepteurs intracellulaires.

4.1.2 Lipoprotéines de faible densité lactosylées (Lac-LDL)

Ce sont des particules de lipoprotéines fortement lactosylées exposant environ 400 résidus de lactose dans leur partie apo B. Les Lac LDL administrés *in vivo* se fixent à des récepteurs spécifiques au galactose situés sur les cellules de Kupffer. Van de Water et ses collaborateurs (127) ont incorporé le MTP-PE (*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl)-*sn*-glycero-3'-phosphatidyléthanolamine) dans ces particules et ont montré que la phagocytose du MTP-PE *via* des récepteurs, active *in vitro* et *in vivo*, les macrophages du foie chez le rat.

4.1.3 Nanoparticules

Il s'agit d'une dispersion stable de particules polymères, caractérisée par une viscosité basse et indépendante du poids moléculaire du polymère. Les nanocapsules comportent une enveloppe polymère avec un contenu

liquide (huile ou eau) où le principe actif est dissous. Il a été montré que le MDP-L alanyl-Cholesterol (MDP-CHOL) incorporé dans les nanocapsules, active les macrophages alvéolaires du rat *in vitro* (126). Dans un modèle *in vivo* de métastases hépatiques, l'injection de nanocapsules de MDP-Chol réduit le nombre de métastases dans le foie (139).

4.2 Vecteurs synthétiques de l'ADN

4.1.1 Liposomes cationiques

Les liposomes cationiques sont couramment utilisés pour délivrer l'ADN ou l'ARN à l'intérieur de cellules mammifères (140). La plupart de ces liposomes sont composés de lipides cationiques formant des complexes stables avec les acides nucléiques. Ils peuvent, en outre, contenir de la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), un lipide fusogénique capable de déstabiliser l'endosome favorisant ainsi la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme (141). Les liposomes cationiques permettent une transfection efficace de plusieurs types de cellules, ils peuvent être métabolisés dans l'organisme et permettent le ciblage de tissus spécifiques *in vivo* (142). Ce sont donc des vecteurs très utiles pour l'administration d'oligonucléotides antisens dans le traitement du cancer (143) ou pour le transport de l'ADN en thérapie génique (144). Cependant, les liposomes

constitués de DOPE et de lipides cationiques sont très toxiques pour les cellules phagocytaires (145). Ils sont aussi capables de diminuer la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) et du facteur de nécrose tumoral (FNT), deux immunomodulateurs importants sécrétés par les macrophages activés. De plus, les vecteurs liposomaux formulés avec de la stéarylamine (SA) chargée positivement, du dioctadécyl oxypropyltriméthylammonium (DOTMA) ou du chlorure de dihexadécyl oxypropyltriméthylammonium (BisHOP) interagissent avec les protéines du serum et les globules rouges du sang induisant respectivement une forte coagulation et de l'hémolyse (146, 147). La présence d'une charge positive à la surface de tels liposomes peut activer le complément ce qui favorise leur reconnaissance par le système immunitaire et augmente leur clearance dans le sang (148). Enfin, il a été démontré que les liposomes DOPE/DOTAP induisent une nécrose épithéliale au niveau des bronches et des alvéoles suite à l'administration pulmonaire (149). Par conséquent, les liposomes cationiques doivent être utilisés avec précaution pour le transport de l'ADN.

4.2.2 Polycations

De plus en plus les polycations sont utilisés pour le transport de l'ADN. Les complexes ADN-polycations sont couramment appelés polyplexes. Ils

résultent de la formation de paires d'ions entre le groupe cationique du polycation et le groupe anionique de l'ADN.

Le travail de G. Wu était le premier à décrire un nouveau système de transport hépatocellulaire de l'ADN basé sur la polylysine conjuguée avec l'asialoglycoprotéine (150). Dans ce système, le complexe polylysine-ADN est formé spontanément *via* des charges électrostatiques entre la charge négative de l'ADN et la charge positive de la poly(lysine). L'asialoglycoprotéine liée aux chaînes de polylysine se trouve ainsi incorporée au complexe et favorise le transport de celui-ci dans les hépatocytes *via* les récepteurs d'asialoglycoprotéine. Par la suite, des études décrivent des polycations liés à la transferrine, l'insuline, l'immunoglobuline, le folate, la lectine, les virus, et les toxines protéiques, afin de parvenir à une reconnaissance cellulaire plus spécifique et d'augmenter la transfection (151-157). Les poly(lysines) conjuguées ont ensuite été utilisées avec succès pour le transport d'OAS et d'OFT (158, 159).

D'autres groupes d'études utilisent des polycations synthétiques pour complexer l'ADN. Les dendrimères de poly(amido-amine), de poly(éthylèneimine) et de poly(2-diméthylamino-éthylméthacrylate) ont été décrits par les groupes de F. Szoka, Jr, J-P. Behr, et J-Y Cherng (160-162).

Afin d'améliorer la stabilité des polyplexes dans les dispersions aqueuses et de prévenir les interactions avec les protéines du sérum, les copolymères blocs et les copolymères greffés cationiques contenant des segments de polymères hydrophiles neutres ont été développés. On trouve les polycations conjugués avec des homopolymères comme le poly(oxyéthylène) (POE), le dextran ou le poly(*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide). Plusieurs systèmes ont récemment été décrits comme le POE-bloc-polyspermine (163), le POE-bloc-polylysine (164), le POE-greffé-poly(lysine) (165) et le POE-greffé-poly(éthylène-imine) (166). De tels systèmes forment avec les courtes chaînes d'ADN des complexes micellaires (10-40 nm) très stables en dispersion aqueuse. Ils constituent donc des systèmes intéressants et sont utilisés avec succès à la fois *in vitro* et *in vivo* pour le transport d'OAS (163).

Afin d'augmenter la stabilité des complexes ADN-polycations dans l'organisme, il est possible de réticuler les chaînes entre elles et de former ainsi un réseau dans lequel l'ADN reste piégé. Basés sur ce système les Nanogels ont récemment été proposés. Il a été démontré que des oligonucléotides incorporés dans des nanogels peuvent atteindre leur cible et bloquer efficacement l'expression de certains gènes. De plus, ces particules sont capables de traverser les cellules intestinales monocouches sans dégradation ce qui ouvre la voie pour l'administration orale des OAS.

Cependant, la toxicité et les problèmes immunologiques qu'engendrent un bon nombre de ces polymères demeurent une limitation majeure à leur utilisation.

4.2.3 Nanoparticules de chitosan

Le chitosan est un dérivé non acétylé de la chitine, un polysaccharide naturel cationique, constitué d'unités de glucosamine. Le chitosan est capable de condenser l'ADN, formant ainsi des nanoparticules stables de population homogène (167). Des études sur les caractéristiques biophysiques du complexe ADN-chitosan ont été effectuées (167), ainsi que des expériences de transfection cellulaire (168) en vue de développer les vecteurs de chitosan. Le chitosan présente l'avantage d'être relativement bien toléré et d'être biocompatible par rapport aux polyplexes (169).

5. OBJECTIFS

Nous avons vu auparavant que l'ADN de *M. phlei* est un immunomodulateur puissant, capable d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses et de ce fait d'inhiber leur prolifération. C'est ainsi que l'ADN contenu dans l'extrait mycobactérien MCC, est responsable des propriétés anticancéreuses de ce dernier. Une étude comparative montre que MCC est toutefois plus actif que

l'ADN génomique. La paroi mycobactérienne renfermant les fragments d'ADN semble les protéger des nucléases présentes dans les milieux physiologiques et potentialiser ainsi leur activité.

Le but de mon projet de recherche, consiste alors à utiliser un vecteur synthétique inerte qui remplace la paroi mycobactérienne pour protéger et transporter l'ADN génomique issu de *M. phlei*.

Mes objectifs sont les suivants:

- Formuler l'ADN de *M. phlei* avec un lipide cationique, le DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Triméthylammonium-Propane), qui favoriserait l'association de l'ADN avec des vecteurs synthétiques lipophiles non cationiques. Le rapport molaire ADN-DOTAP doit être tel que le DOTAP ne présente aucune toxicité ni n'influence l'activité de l'ADN.
- Synthétiser différents types de vecteurs et les caractériser. On choisit de préparer les vecteurs suivant:
 - Des liposomes négatifs solides composés de 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphatidylcholine (DPPC) et de 1,2-Dimiristoyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphatidylglycérol (DMPG). Le rapport molaire DPPC/DMPG est de 9/1
 - Des liposomes neutres composés de DPPC/DMPG/DSPE-PEG (9/1/0.1)

- Des liposomes neutres fluides composés de DPPC et de Cholestérol (CHOL) avec un rapport molaire 7/3
 - Des liposomes neutres composés de 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphatidyléthanolamine (DOPE), de DOTAP et de DSPE-PEG avec un rapport molaire 1/1/0.1
 - Des liposomes positifs composés de DOPE/DOTAP 1/1 et de DPPC/DOTAP (1/1)
 - Des nanoparticules de lipides solides (NLS), composées de tilaurine (TL) et de phospholipides DPPC/DMPG dans un rapport molaire 30/1
 - Des nanoparticules de chitosan
-
- Etudier l'effet de ces porteurs sur la prolifération de cellules B16-F1 issus de mélanomes de souris par la réaction avec MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium), afin de sélectionner les vecteurs inertes qui ne possèdent pas d'effet intrinsèque sur la croissance cellulaire. MTT est un sel de tétrazolium qui est converti en un formazan de couleur bleu dans les mitochondries des cellules vivantes. La production de formazan peut être dosée par spectroscopie et constitue un bon indice de la prolifération cellulaire.
 - Analyser la toxicité des vecteurs sur des cellules tumorales afin d'éliminer les vecteurs cytotoxiques. Les essais de toxicité sont effectués en

mesurant le pourcentage de lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu. La LDH est une enzyme normalement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes et qui est libérée en cas de nécrose.

- Mesurer l'activité et la toxicité de l'ADN de *M. phlei* associé à des porteurs, préalablement sélectionnés pour leur inertie. Les mesures de l'inhibition de la croissance cellulaire sont effectuées par la réaction avec MTT et la toxicité se mesure par le test de LDH.

CHAPITRE 2

PRESENTATION ARTICLE 1 :

**Anticancer activation of mycobacterial DNA. Effect of
formulation with chitosan nanoparticles**

M. Kabbaj and N.C. Phillips

1. INTRODUCTION

Nucleic acid-based drugs, such as triplex forming DNA, antisense oligonucleotides and ribozymes, are currently being evaluated for their potential in the treatment of cancer (1-3). Their rapid breakdown by nucleases (4) and their clearance from the blood (5) compromises the effectiveness of such agents for the systemic treatment of cancer. The development of appropriate delivery systems may be critical for the clinical success of nucleic acids as pharmaceutical agents.

Although delivery systems for gene therapy based on genetically engineered viruses such as retroviruses, adenoviruses, adeno-associated virus (AAV) and herpes virus have been evaluated (6-8), they can induce immune responses and may become pathogenic (9). As a result of these limitations, there has been substantial effort focused on constructing non-viral carriers. The first non viral carriers developed were cationic liposomes (10). Cationic liposomes form complexes with DNA via charge and hydrophobic interactions. However, these structures have a strong tendency to form large aggregates with time (11), are unstable in contact with serum (11) and lack target specificity (12). More recently, attempts have been made to develop new non-viral carriers, based on the generation of condensed forms of DNA through charge neutralization with polycations such as poly-lysine, cationic dendrimers and polyethyleneimine (13-15).

DNA extracted and purified from *Mycobacterium Bovis* (BCG) has potent antitumor activity against a number of syngeneic tumors in the mouse and in the guinea pig (16). This fraction, designated MY1, appears to act by augmenting natural killer cell activity and inducing interferons (17). In addition, synthetic oligonucleotides with CpG-containing palindromic sequences present in the cDNA encoding mycobacterial proteins can also induce interferon- α and γ and augment natural killer cell activity (18). The antiproliferative activity of this mycobacterial DNA appears to be indirect, with no direct inhibitory or cytotoxic activity towards tumor cells being reported (19).

Mycobacterium phlei (*M. phlei*) is a non-pathogenic Gram-positive microorganism that is found in soil, on plants and in drinking water (20, 21). It has been reported to be a potent immunostimulator active against viral and parasitic infections (20). A cell wall preparation derived from this mycobacterium where mycobacterial DNA in the form of short oligonucleotides is complexed with the cell wall possesses a chemotheapeutic-like action against human bladder cancer cells by inducing apoptosis, as well as a monokine-inducing activity (22). The tumor cell division inhibitory activity of this cell wall complex is correlated with the presence of mycobacterial DNA in the preparation.

One of the problems associated with phosphodiester-based DNA is the susceptibility of the linkage to degradation by nucleases present in plasma or the intracellular environment (23, 24). Although enhanced nuclease resistance of antisense DNA can be achieved via the use of backbone modifications such as phosphorothioates (25) or deoxyribose modifications at the 3'-terminus (26), significant increases in toxicity are often observed (27). Such modifications may not be appropriate for other therapeutic forms of DNA such as aptamers. Chitosan is a deacetylated cationic polysaccharide consisting of repeated glucosamine units derived from the naturally occurring polysaccharide chitin (28). The availability of chitosan, its biocompatibility and its chemical and biological properties makes it an attractive biomaterial for a variety of pharmaceutical applications, especially in the areas of drug delivery (29). Chitosan-plasmid and chitosan-antisense DNA complexes have been prepared and evaluated (30). Recent studies have shown that chitosan nanoparticles form spontaneously as a result of ionic interaction between the positively charged amino group of the glucosamine and negatively charged multivalent counter-ions such as tripolyphosphate or sulfate groups (31). Such nanoparticles appear to be suitable vehicles for the delivery of immunostimulants derived from *M. vaccae*, and may find application as antitumour agents (32). Because chitosan is able to form polyelectrolyte complexes with DNA (31), we have evaluated the potential for using DNA complexation with chitosan to form nanoparticles, and have determined the

activity of *M. phlei* DNA-chitosan nanoparticles to inhibit tumor cell division relative to a cationic liposomal *M. phlei* DNA formulation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

M. phlei was kindly provided by Bioniche Life Sciences Inc. (London, Ontario, Canada). Chitosan hydrochloride (CL 213) was purchased from Pronova Biopolymer (Oslo, Norway). Herring sperm DNA (HS DNA), lysozyme, sodium dodecyl sulfate (SDS), ethidium bromide (EtBr), dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide (MTT), lactate dehydrogenase colorimetric kit and tripolyphosphate (TPP) were purchased from Sigma Chemical company (St. Louis, MO). Proteinase K, DNase I, modified Eagle's medium (MEM), non-essential amino acids and fetal bovine serum (FBS) were all from Gibco Life sciences (Grand Island, NY). Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) was purchased from Northern Lipids Inc. (Vancouver, B.C., Canada), and dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP) was purchased from Avanti Polar-Lipids Inc. (Alabaster, AL). B16-F1 murine melanoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (Frederick, MD).

2.2 Methods

2.2.1 Isolation of DNA from M. phlei

One g (wet cell mass) of *M. phlei* in 5 mL TE buffer (10 mM Tris.Cl, pH 7.4 and 1 mM EDTA, pH 8.0) was incubated with 100 μ L of 50 mg/mL lysozyme solution at 37°C for 90 min. One hundred μ L of proteinase K (5mg/mL) and 100 μ L of SDS (500 mg/mL) were then added and incubation was carried-out for a further 10 min at 65°C. Mycobacterial DNA was then purified by conventional phenol extraction and ethanol precipitation (Moore, 1995). *M. phlei* genomic DNA was sonicated for 5 min or 45 min on ice with a probe sonicator (Model 550 Sonic Dismembrator, serial no. F2419, Misonix Inc. PA, Pittsburgh) using power 3, before encapsulation into the carriers.

2.2.2 Chitosan nanoparticle preparation

All manipulations were carried-out in a class 100 laminar flow hood using sterile reagents and depyrogenated (180°C, 4 h) sterile glassware. Chitosan nanoparticles were obtained by inducing the gelation of an aqueous chitosan solution with TPP. TPP (400 μ L containing 0.1-2.0 mg/mL) was added to 1 mL of the chitosan solution (1 mg/mL) under magnetic stirring at room temperature. The gelation of the chitosan solution was also induced

using HS DNA. DNA solutions (400 μ l containing 0.1 – 5.0 mg/mL) were added to 1 mL of the chitosan solution under magnetic stirring at room temperature for 2 min.

2.2.3 Cationic liposomes

All manipulations were carried-out in a class 100 laminar flow hood using sterile reagents and depyrogenated (180°C, 4 h) sterile glassware. Cationic liposomes composed of DOPE/DOTAP in the molar ratio 1:1 were prepared by dissolving the phospholipid/lipids in anhydrous chloroform followed by rotary evaporation under reduced pressure in sterile, pyrogen-free round-bottomed flasks to form thin phospholipid/lipid films. The required volume of NaCl (0.85% w/v) was added, and liposomes were formed by agitation at 65°C. Liposomes containing *M. phlei* DNA were prepared by hydrating the phospholipid/lipid film with 0.1 mg/mL of DNA in 0.85% NaCl.

2.2.4 Particle size measurement and particle zeta (ζ) potential

The mean particle size of the chitosan nanoparticles and cationic liposomes was determined by photon correlation spectroscopy (N4 Plus, Coulter, Hialeah, FL). The samples were diluted with saline solution to give a particule count rate between 5×10^4 and 1×10^6 counts/s. Mean particule

diameter was calculated in size distribution processor mode (SDP) using the following conditions: fluid refractive index 1.33; temperature 20°C; viscosity 0.93 cP; angle of measurement 90.0°; sample time 10.5 μ s, and sample run time 90 s. The ζ potential of the chitosan nanoparticles and cationic liposomes was measured using a Delsa 440SX (Coulter, Hialeah, FL) using the following conditions: current 10 mA; frequency range 500 Hz; viscosity 0.93 cP; dielectric constant 78.3; conductivity 16.7 ms/cm; on time 2.5 s, off time 0.5 s, and sample run time 60 s.

2.2.5 Quantification of chitosan nanoparticle- or cationic liposome-incorporated DNA

The DNA loading efficiency was determined upon separation of the chitin nanoparticles from the aqueous suspension medium by centrifugation at 5,000 g for 15 min at 4°C. Free DNA present in the supernatant was then measured by spectrofluorimetry using the DNA intercalating molecule EtBr (final concentration 5 μ g/ml) at an excitation wavelength 546 nm and an emission wavelength of 590 nm. Unencapsulated DNA was separated from cationic liposomal DNA by centrifugation at 30,000 g for 60 min at 4°C, and free DNA in the supernatant determined as described above.

2.2.6 DNase degradation assay

HS DNA 500 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), HS DNA DOPE/DOTAP liposomes and HS DNA/chitosan nanoparticles were incubated with DNase I (300 units / mL) in DNase I reaction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 5; 20 mM MgCl_2 ; 500 mM KCl) at 37°C for 30 min. DNase I was inactivated by the addition of EDTA (final concentration 2.5 mM) and the reaction mixture was heated for 10 min at 65°C to denature the enzyme. DNA was then isolated by phenol/ CHCl_3 extraction, and DNA content in the aqueous phase was measured as described above. Digestion of non-incorporated DNA by DNase-1 was confirmed by electrophoresis in agarose gels (0.7% agarose containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr) for 3 h at 100 V.

2.2.7 Tumor cell line

B16-F1 melanoma cells were grown as monolayer cultures in MEM supplemented with MEM non-essential amino acids, gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and containing 10% heat-inactivated FBS (56°C, 30 min) (MEM-FBS). The cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 .

2.2.8 Proliferation assay

B16-F1 cells were incubated in 100 μL MEM-FBS (5×10^3 cells) in 96-well flat-bottomed tissue culture plates with different concentrations of *M. phlei* DNA, *M. phlei* DNA in chitosan nanoparticles or cationic liposomal DNA for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . A concentration range of DNA from 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was evaluated. Chitosan nanoparticles prepared using a ratio of 500 μg of *M. phlei* DNA/mg of chitosan were used to give different DNA concentrations. Cationic liposomes were prepared using a ratio of 100 μg of *M. phlei* DNA/mg of lipids. Control experiments were carried-out using HS DNA and HS DNA in chitosan nanoparticles. Cell growth was measured by determination of MTT reduction (Mosman et al. 1983). Briefly, 10 μL of MTT dissolved in PBS at 5 mg mL^{-1} was added to the wells at the end of the incubation period and incubation continued for an additional 4 h at 37°C. Acid-isopropanol (100 μL of 0.04 M hydrochloric acid in isopropanol) was then added, and reduced MTT was measured at a wavelength of 570 nm in an ELISA plate reader.

2.2.9 Toxicity assay

B16-F1 cells were incubated in 100 μL of MEM-FBS (5×10^3 cells) in 96-well flat-bottomed tissue culture plates with *M. phlei* DNA or *M. phlei* DNA

in chitosan nanoparticles for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ as described above. LDH activity in the supernatant was used as an indicator of cellular cytotoxicity, and was determined using a modified commercial LDH kit (33). Total LDH release was determined by incubating the cells in 1.0 % v/v Triton X-100 in water to induce lysis, followed by vigorous agitation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 HS DNA and *M. phlei* DNA cell division inhibitory activity

The ability of DNA isolated from HS or from *M. phlei* to inhibit the division of B16-F1 melanoma cells was initially determined. Cellular proliferation was measured by determination of MTT reduction and toxicity by LDH release. The data presented in Fig. 1 shows the cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA or of HS DNA toward B16-F1 melanoma cells. *M. phlei* DNA caused significant inhibition of cell proliferation ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$) (fig. 1A) without intrinsic cytotoxicity, ($ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) (fig. 1B) whereas HS DNA had no effect on cell division (fig. 1A) and was not toxic (fig. 1B). The mechanism(s) whereby *M. phlei* DNA inhibits tumor cell division and induces apoptosis are not currently known. The ability of *M. phlei* DNA to inhibit tumor cell division is associated with cell cycle arrest (34), indicating a specific mode of action which is currently under investigation. The ability of DNA

prepared from *M. phlei* to inhibit cell division is in sharp contrast to DNA prepared from BCG, which does not appear to possess the ability to inhibit tumor cell division ((19) Phillips and Fillion, manuscript in preparation). The similarity in base composition of DNA derived from *M. phlei* (69% CG) and of DNA derived from BCG (66% CG) (35) would not appear to be a predictive factor for tumor cell division inhibitory activity. BCG DNA shares little sequence homology with *M. phlei* DNA (36), thus indicating that the activity of *M. phlei* may in fact be sequence, not base composition, specific.

3.2 Nanoparticle characterisation

Chitosan nanoparticles were obtained spontaneously by inducing the gelation of an aqueous solution of chitosan with sodium tripolyphosphate or with HS DNA. The ζ potential and the size range of the tripolyphosphate/chitosan or HS DNA/chitosan complexes were then determined (table 1). In both cases the mean diameter of the particles decreased with increasing phosphate charge density. This may be explained by an increase in the number of reticulation points that favours smaller particles (30). Polymer-DNA complexation is known to be influenced by the polymer to DNA charge ratio. Both electrostatic interactions and hydrogen bonding play a role in complexation (15). However, above 6 μmol of phosphate the mean particle size increased, and at 16.2 μmol phosphate

there was significant particle aggregation. These results may be related to a reduced surface charge of the particles leading to their aggregation. This conclusion is supported by the observation that the particle ζ potential was not significantly affected by a phosphate charge density below 16.2 μmol of phosphate. Similar results have been obtained by Remy et al., who showed that increasing the N/P ratio (polymer nitrogen per DNA phosphate) decreased the particle size range, and that at N/P=2 chitosan complexes have a tendency to aggregate (30).

Similar results were obtained with *M. phlei* DNA (data not shown). In addition, the size of the condensed particles did not appear to depend upon the length of of the DNA, since sonicating genomic DNA for 5 min (10 000 bp) or for 45 min (100 bp) did not significantly affect subsequent chitosan particle size (table 2). Chesnoy and coworkers have also observed that particle size following DNA condensation with polyamines does not seem to be dependent upon the length of the DNA. (37)

3.3 DNase degradation assay

The DNA loading efficiency of the chitosan nanoparticles or incorporation within cationic liposomes was greater than 94% (table 3). For effective *in vivo* delivery, it is essential that a synthetic carrier can protect associated DNA

during transport to the target cells. Unincorporated DNA was almost completely degraded by DNase-1 after 30 min incubation (table 3). Incorporation of DNA within chitosan nanoparticles resulted in a decreased DNA degradation by DNase I, with 42% of the incorporated DNA remaining associated with the particles after 30 min incubation. DNA incorporated within cationic liposomes was considerably more susceptible to degradation by DNase-1, with 34% of the incorporated DNA remaining associated with the liposomes after 30 min incubation. Although chitosan nanoparticles and cationic lipids such as DOTAP form DNA condensates by ionic interaction, they differ in that DNA is physically entrapped in a solid matrix in chitosan nanoparticles (38), whereas it coats liposomal phospholipid/lipid membranes, especially at the surface (39). The results obtained with DNase-1 strongly indicate that a significant proportion of the DNA in both types of formulation is however accessible to nuclease attack. Surface-associated DNA would appear to be important for cationic liposomes, as evidenced by the significant change in ζ potential after DNase-1 treatment, indicative of the loss of negatively charged DNA from the liposome surface (table 3). This does not appear to be the case for chitosan nanoparticles, where the loss of 58% DNA following DNase-1 treatment was not associated with a significant change in nanoparticle ζ potential (table 3). The reduced DNA content following DNase-1 treatment was not associated with a significant change in the diameter of either cationic liposomes or chitosan nanoparticles, indicating that the loss of

DNA was not associated with particle or liposome disruption. These results also indicate that chitosan nanoparticles may possess significant porosity, and that additional surface modifications will be required to ensure protection of incorporated DNA from nuclease attack.

3.4 B16-F1 melanoma cell proliferation inhibitory and cytotoxic activity

The cytostatic activity of chitosan nanoparticles or cationic liposomes toward B16-F1 melanoma cells was determined *in vitro* using the tetrazolium (MTT) reduction assay, and cytotoxicity was determined by the release of the cytoplasmic enzyme LDH. Cationic polyphosphate chitosan nanoparticles (ζ potential = +21 mV) did not possess cytostatic ($IC_{50} > 1$ mg/mL) (fig. 2A) or cytotoxic activity ($ED_{50} > 1$ mg/mL) (fig. 2B). In contrast cationic liposomes composed of DOPE/DOTAP (molar ratio 1:1; ζ potential = +34 mV) were both cytostatic ($IC_{50} = 49$ μ g/mL) (fig. 2A) and cytotoxic ($ED_{50} = 87$ μ g/mL) (fig. 2B). The extremely low toxicity of chitosan towards mammalian cells in culture has been previously observed (40). Chitosan nanoparticles have also been shown to be significantly less toxic than poly-(L-lysine) (41), and in the present study to be significantly less toxic than DOPE/DOTAP liposomes. The positive charge *per se* does not seem to be responsible for either the cytostatic or cytotoxic effect. B16-F1 melanoma cell proliferation inhibitory activity as well as cytotoxic activity of DOPE/DOTAP may be explained by the intrinsic

toxicity of cationic lipids. Cationic liposomes containing DOTAP have already been reported to have several adverse effects that appears to be related to their ability to act as inhibitors of protein kinase C activity (42).

3.5 Cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA after association with chitosan nanoparticles or with DOPE/DOTAP liposomes

The cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA was significantly enhanced following complexation with chitosan (fig. 3A). *M. phlei* DNA complexed with chitosan nanoparticles was 20-fold more potent (95% confidence limits 5.9-166) than non-complexed *M. phlei* DNA (Pharm PC software, version 4). The complexation of HS DNA with chitosan did not result in any cell proliferation inhibitory activity (fig.3A), demonstrating that complexation *per se* is not a contributing factor for activity. Complexation of *M. phlei* DNA with DOPE/DOTAP liposomes in contrast resulted in a significant reduction of proliferation inhibitory activity (fig. 3B). HS DNA also reduced the inhibitory activity of DOPE/DOTAP liposomes (fig. 3B), demonstrating that complexation of DNA by cationic liposomes results in mutual antagonism of inhibitory activity. The mechanism of chitosan interaction with mammalian cells is not currently known. Mammalian cells have a negative ζ potential (43), and simple electrostatic interaction may be sufficient to ensure efficient interaction. That chitosan can interact with mammalian cells is demonstrated by the fact that it has direct stimulatory

effects on macrophages (44). Plasma proteins are generally anionic at physiological pH (45), and the association of these proteins with positively charged chitosan nanoparticles may significantly influence cell-nanoparticle interaction. We are currently evaluating the fixation of plasma proteins to chitosan nanoparticles and their effect on tumor cell targeting.

4. CONCLUSION

Our results show that *M. phlei* DNA caused significant inhibition of cell proliferation without intrinsic cytotoxicity. The mechanism(s) whereby *M. phlei* DNA inhibits tumor cell division and induces apoptosis are currently being investigated. Chitosan nanoparticles appears to be a suitable vehicle for the delivery of *M. phlei* DNA since they show no toxicity toward B16-F1 melanoma cells, they are easy to prepare without the use of organic solvent, and they are able to condense DNA and to form small and stable complexes. However, further investigations concerning additional surface modifications may be necessary to ensure more effective protection of incorporated DNA from nuclease attack. The cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA was significantly enhanced following complexation with chitosan. *M. phlei* DNA complexed with chitosan nanoparticles was 20-fold more potent than non-complexed *M. phlei* DNA. This formulation may therefore have application as an antitumor agent.

5. TABLES

Table 1. Mean particle size and ζ potential of chitosan nanoparticles

Polyphosphate	(mg/mL)	PO ₄ charge density (μ mol)	Chitosan nanoparticles	
			Size (nm)	ζ potential (mV)
TPP	0.1	0.81	858 \pm 273 ^a	+37 \pm 4
	0.2	1.62	561 \pm 51	+26 \pm 4
	0.4	3.24	487 \pm 58	+29 \pm 5
	0.5	4.05	439 \pm 90	+22 \pm 2
	0.7	5.67	477 \pm 113	+22 \pm 2
	1	8.1	874 \pm 75	+18 \pm 4
	2	16.2	>10000	+11 \pm 1
HS DNA	0.1	0.33	872 \pm 289	+35 \pm 4
	0.2	0.66	593 \pm 33	+22 \pm 2
	0.4	1.32	594 \pm 48	+29 \pm 6
	0.5	1.65	526 \pm 97	+31 \pm 2
	0.7	2.31	587 \pm 54	+33 \pm 3
	1	3.3	547 \pm 133	+23 \pm 2
	2	6.6	700 \pm 150	+19 \pm 5
	4	13.2	1044 \pm 242	+22 \pm 2
	5	16.5	>10000	+9 \pm 4

^aThe results shown are the mean \pm SD of 3 separate experiments.

Table 2. Effect of *M. phlei* DNA size on chitosan particle size and ζ potential.

<i>M. phlei</i> DNA	DNA concentration (mg/mL)	Chitosan nanoparticles	
		Diameter (nm)	ζ potential (mV)
10 000 bp (sonicated 5 min)	0.1	558 \pm 124 ^a	+25 \pm 6
	0.2	398 \pm 282	+ 20 \pm 10
	0.4	509 \pm 160	+ 22 \pm 10
	0.5	417 \pm 130	+ 23 \pm 6
	0.7	615 \pm 304	+ 23 \pm 6
100 bp (sonicated 45 min)	0.1	482 \pm 160	+35 \pm 4
	0.2	887 \pm 246	+22 \pm 2
	0.4	846 \pm 289	+29 \pm 5
	0.5	747 \pm 182	+31 \pm 2
	0.7	1315 \pm 240	+33 \pm 3

^aThe results shown are the mean \pm SD of 3 separate experiments.

Table 3. Mean particle size and ζ potential of DNA after treatment with DNase

Preparation	No DNase treatment			DNase treatment		
	Size, nm	ζ potential, mV	DNA incorporation $\mu\text{g}/\text{mg}$ chitosan or lipid	Size, nm	ζ potential, mV	DNA content $\mu\text{g}/\text{mg}$ chitosan or lipid
HS DNA	>10000	-14 ± 1^a	N/A	155 ± 55^b	$+3.2 \pm 9$	N/A
HS DNA DOPE/DOTAP	835 ± 300	$+36 \pm 4$	94 ± 6 (94%) ^c	770 ± 250	$+43 \pm 3$	34 ± 6 (34%)
HS DNA CHITOSAN	309 ± 122	$+31 \pm 2$	475 ± 8 (95%)	480 ± 150	$+34 \pm 4$	210 ± 5 (42%)

^aThe results shown are the mean \pm SD of 3 separate experiments.

^b The mean size of particles in the DNase control incubation after inactivation was 202 ± 60 nm. These particles are therefore representative of denatured and aggregated DNase.

^c Percent DNA incorporated

6. LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Effect of *M. phlei* DNA (O) and HS DNA (●) (A) on B16-F1 melanoma cell proliferation and (B) cytotoxicity toward B16-F1 cells (B). The results shown are the mean \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 2. B16-F1 melanoma cell cytotoxicity (A) and inhibitory cell proliferation activity (B) of chitosan nanoparticles (O) and cationic DOPE/DOTAP liposomes (●). The results shown are the mean \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 3. B16-F1 melanoma cell proliferation inhibitory activity of (A) *M. phlei* DNA alone (O), *M. phlei* DNA in chitosan nanoparticles (●) or HS DNA in chitosan nanoparticles (□), and (B) *M. phlei* DNA in cationic liposomes (●), HS DNA in cationic liposomes (□) (fig. 3B). The results shown are the mean \pm SD of 3 independent experiments.

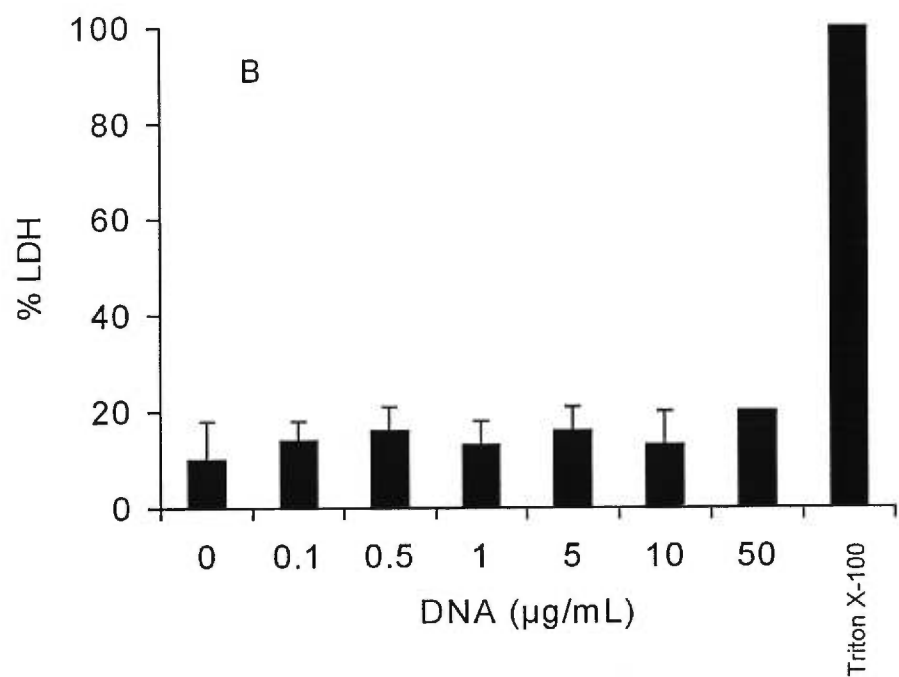
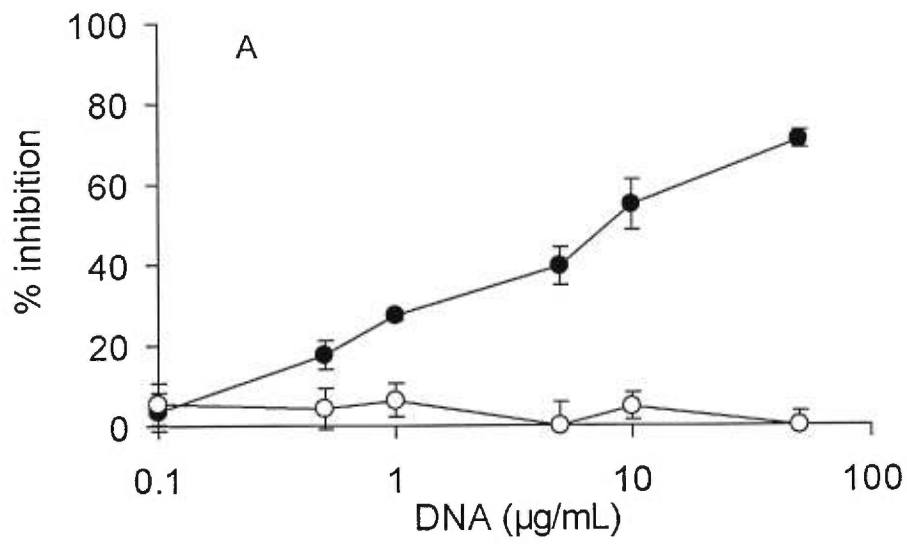


Figure 1

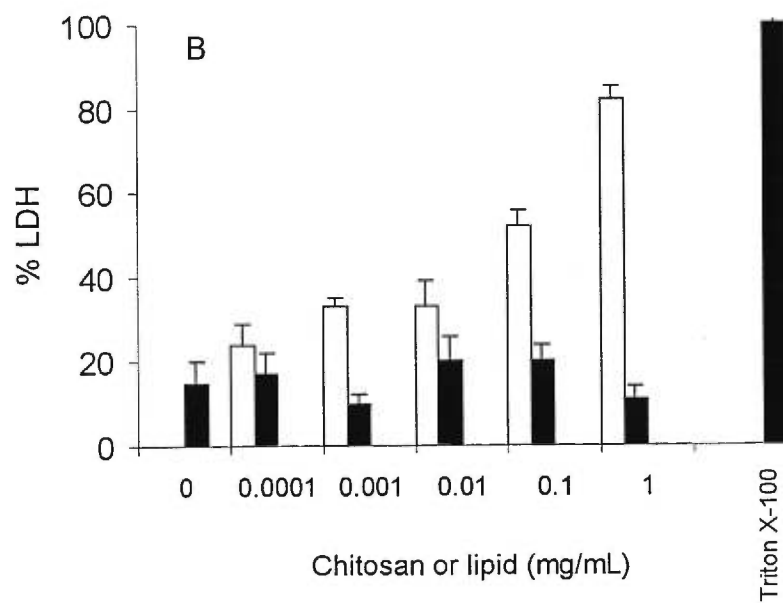
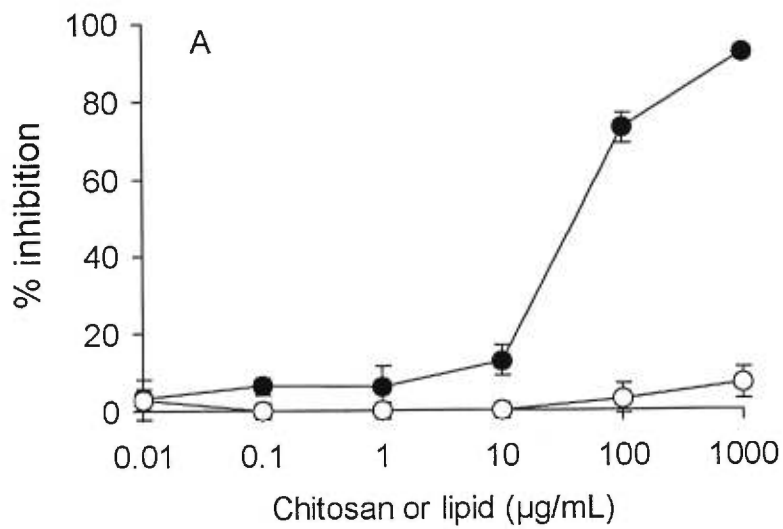


Figure 2

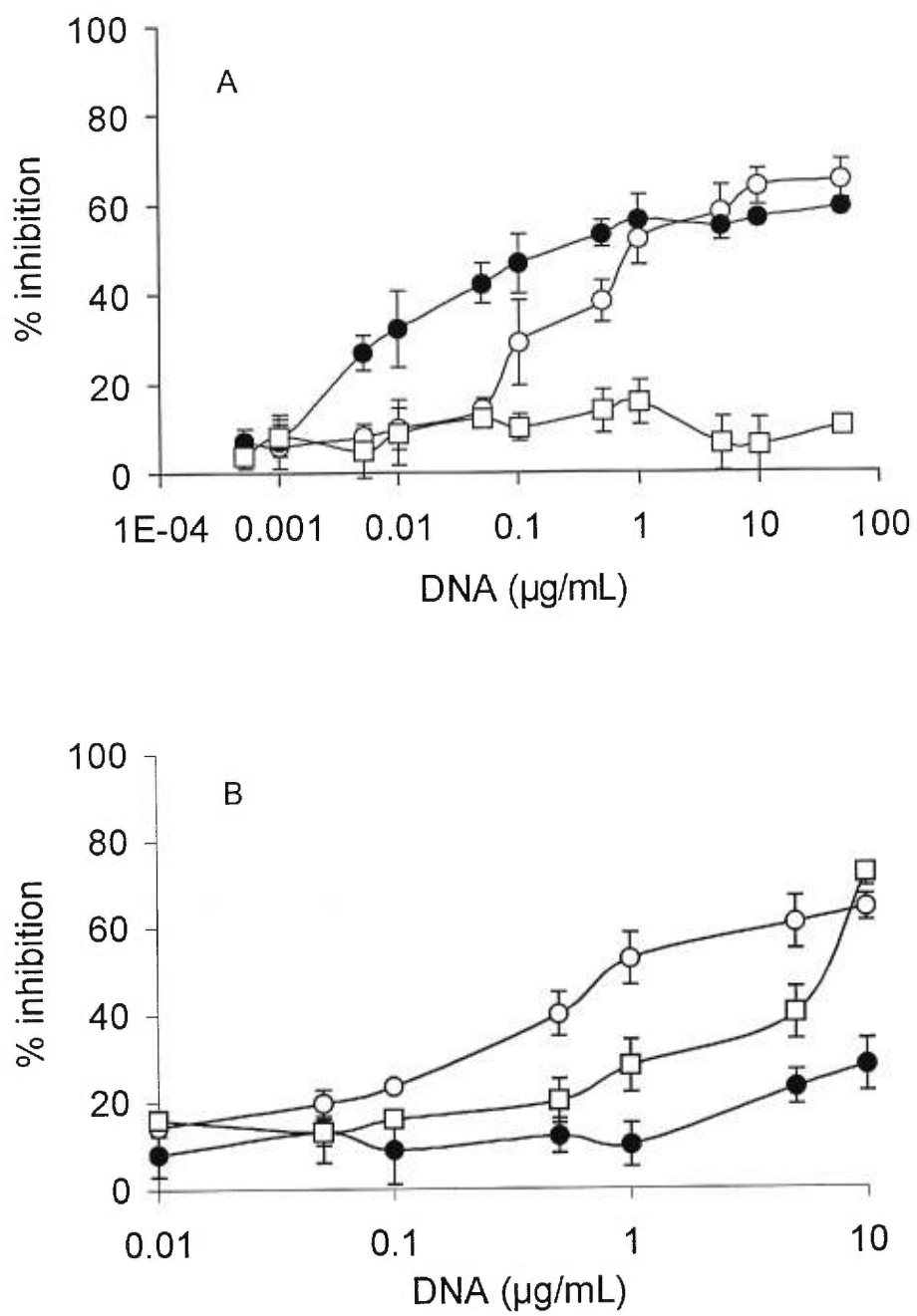


Figure 3

7. REFERENCES

1. Maher, L. J., Wold, B., and Dervan, P. B. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation, *Science*. 245: 725-730, 1989.
2. Crooke, S. T. Therapeutic applications of oligonucleotides, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 329-376, 1992.
3. Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K. J. Therapeutic application of ribozymes, *Pharmacol. Ther.* 68: 247-267, 1995.
4. Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous infection into mice: Involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake, *Pharm. Res.* 12: 825-830, 1995.
5. Fisher, P. L., Terhorst, T., Cao, X., and Wagner, R. W. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 21: 3857-3865, 1993.
6. Miller, N. and Vile, R. Targeted vectors for gene therapy, *FASEB J.* 9: 190-199, 1995.
7. Vile, R. G., Tuszyński, A., and Castleden, S. Retroviral vectors. From laboratory tools to molecular medicine, *Mol. Biotechnol.* 5: 139-158, 1996.

8. Robbins, P. D., Tahara, H., and Ghivizzani, S. C. Viral vectors for gene therapy, *Trends Biotechnol.* *16*: 35-40, 1998.
9. Yei, S., Mittereder, N., Tang, K., O'Sullivan, C., and Trapnell, B. C. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated *in vivo* vector administration to the lung, *Gene Ther.* *1*: 192-200, 1994.
10. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. S., Wenz, J. P., Northrop, M., Ringold, M., and Danielsen, H. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *84*: 7413-7417, 1987.
11. Huang, L. and Li, S. Liposomal gene delivery: A complex package, *Nat. Biotechnol.* *15*: 620-621, 1997.
12. Chonn, A. and Cullis, P. R. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* *30*: 73-83, 1998.
13. Wu, G. Y. and Wu, C. H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.* *262*: 4429-4932, 1987.
14. Haensler, J. and Szoka Jr., F. C. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjugate Chem.* *4*: 372-379, 1993.

15. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, B., Demeneix, B., and Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethyleneimine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 7297-7301, 1995.
16. Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., and Sudo, T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, J. Natl. Cancer Inst. 72: 955-962, 1984.
17. Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α / β and γ with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG, Jpn J Cancer Res. 79: 866-873, 1988.
18. Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells, Microbiol Immunol. 36: 55-66, 1992.
19. Shimada, S., Yano, O., Inoue, H., Kuramoto, E., Fukuda, T., Yamamoto, H., Kataoka, T., and Tokunaga, T. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors, J. Natl. Cancer Inst. 74: 681-688, 1985.

20. Mallick, B. B., Kishore, S., Das, S. K., and Garg, A. Non-specific immunostimulation against viruses, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 55-63, 1985.
21. Papapetropoulou, M., Tsintzou, A., and Vantarakis, A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece, *Can. J. Microbiol.* 43: 499-502, 1997.
22. Fillion, M. C., Lépicier, P., and Phillips, N. C. *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells, *Br. J. Cancer.* 79: 229-235, 1999.
23. Iida, R., Sawazaki, K., Yasuda, T., Tsubota, E., Aoyawa, M., Matsuk, T., and Kishi, K. Deoxyribonuclease I phenotyping from saliva stains, *J. Forensic Sci.* 44: 175-178, 1999.
24. Prince, W. S., Baker, D. L., Dodge, A. H., Ahmed, A. E., Chestnut, R. W., and Sinicropi, D. V. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum, *Clin. Exp. Immunol.* 113: 289-296, 1998.
25. Hoke, G. D., Draper, K., Freiser, S. M., Gonzalez, C., Driver, V. B., Zounes, M. C., and Ecker, D. J. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection, *Nucleic Acids Res.* 19: 5743-5748, 1991.
26. Uhlmann, E. and Peyman, A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle, *Chem. Rev.* 90: 543-584, 1990.

27. Agrawal, S., Zhao, Q., Jiang, Z., Oliver, C., Giles, H., Heath, J., and Serota, D. Toxicologic effects of an oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate and its analogs following intravenous administration in rats, *Antisense Nucleic Acid drug dev.* 7: 575-584, 1997.
28. Aspden, T., Illum, L., and Skaugrud, O. Chitosan as delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect upon nasal membrane integrity using rat models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4: 23-31, 1996.
29. Sawayanagi, Y., Nambu, N., and Nagai, T. Use of chitosan for sustained-release preparations of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 30: 4213-4215, 1982.
30. Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., and Remy, J. S. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability, *Pharm. Res.* 15: 1332-1339, 1998.
31. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., and Alonso, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharm. Res.* 14: 1431-1436, 1997.
32. Tian, X. X. and Groves, M. Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 151-157, 1999.

33. Phillips, N. C. and Gagné, L. Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipid correlation with liposome immune adjuvant activity, *J. Drug Target.* 3: 137-147, 1995.
34. Fillion, M. C., Fillion, B., Marie, V., Reader, S., Ménard, I., and Phillips, N. C. Mycobacterial cell wall-DNA complex (MCC) induces cycle arrest at the late S+G₂M phase in leukemic cells, *Br. J. Cancer.* 80 *supplement 2*: 76, 1999.
35. Wayne, L. G. and Gross, W. M. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from mycobacteria, *J. Bacteriol.* 96: 1915-1919, 1968.
36. Stine, K. C., Warren, B. A., and Becton, D. L. Apoptosis induced by interleukin-12 measured by DNA electrophoresis and *in situ* end labelling in leukemia, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 795: 420-421, 1996.
37. Chatteraj, D. K., Gosule, L. C., and Schellman, J. A. DNA condensation with polyamines. II. Electron microscopic studies, *Mol. Biol.* 121: 327-337, 1978.
38. Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L., Roy, K., Walsh, S. M., and August, J. T. DNA-polycation nanospheres as non viral gene delivery vehicles, *J. Controlled Release.* 53: 183-193, 1998.
39. Law, D. Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice, *Hum. Gene Ther.* 6: 553, 1995.

40. Richardson, S. C. W., Hanno, V. J., Kolbe, V. J., and Duncan, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA, *Int. J. Pharm.* 178: 231-243, 1999.
41. Roy, K., Mao, H. Q., and Leong, K. W. DNA chitosan nanospheres: transfection efficiency and cellular uptake, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 673-674, 1997.
42. Fillion, M. C. and Phillips, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells, *Biochim. Biophys. acta.* 1329: 345-356, 1997.
43. Kabanov, A.V. Taking polycation gene delivery systems from *in vitro* to *in vivo*, *Pharm. Sci. Technol.* 2: 365-372, 1999.
44. Peluso, G., Patella, O., Rainiar, M., Satin, M., Ambrosia, L., Celebre, D., Avalon, B., and Balsam, G. Chitosan mediated stimulation of macrophage function, *Biomaterials.* 15: 1215-1220, 1994.
45. Patel, H. M. Serum opsonins and liposomes: Their interaction and opsonophagocytosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9: 39-90, 1992.

CHAPITRE 3

PRESENTATION ARTICLE 2 :

**Anticancer activation of mycobacterial DNA. Effect of
formulation with lipidic carriers**

M. Kabbaj and N.C. Phillips

1. INTRODUCTION

Triplex forming DNA, antisense oligonucleotides and ribozymes are examples of nucleic acids currently being evaluated for anticancer potential (1-3). Nuclease degradation (4) and rapid clearance of oligonucleotides from the blood (5) compromise the effectiveness of such agents for the systemic treatment of cancer. The development of suitable delivery systems may be critical for the application of nucleic acids as pharmaceutical agents.

Delivery systems for gene therapy based on genetically engineered viruses such as retroviruses, adenoviruses, adeno-associated virus (AAV) and herpes virus have been evaluated (6-8). They have the potential for inducing therapy-limiting immune responses (9) and may become pathogenic (10). Because of these limitations, there has been substantial effort on constructing non-viral carriers for both gene and non-gene therapeutic molecules. Although cationic liposomes have been evaluated in gene and antisense therapy (11), they have proven to be most useful for the delivery of antisense oligonucleotides into cells in culture, and could potentially be used for the delivery of antisense oligonucleotides into animals (12). The importance of cationic liposomes as carriers is reflected in the wide variety of commercially available cationic liposome formulations (13). However, those cationic liposomes form large aggregates with time (14), are unstable in contact with serum (14) and lack target specificity (15).

DNA extracted and purified from *Mycobacterium Bovis* strain (BCG) has been shown to have antitumor activity against various syngeneic tumors in the mouse and in the guinea pig (16). This DNA fraction acts by augmenting natural killer cell activity and inducing interferons (17). Synthetic oligonucleotides present in the cDNA encoding mycobacterial proteins also induces interferon- α and γ , and augment natural killer cell activity (18). These DNA preparations do not appear to have a direct inhibitory or cytotoxic activity towards tumor cells (19).

Mycobacterium phlei (*M. phlei*) is a non-pathogenic Gram-positive microorganism that is found in soil, on plants and in drinking water (20, 21). It is a potent immunostimulator (20). A cell wall preparation derived from this mycobacterium, where mycobacterial DNA in the form of short oligonucleotides is complexed with the cell wall, possesses a chemotherapeutic-like action against human bladder cancer cells by inducing apoptosis, as well as an immunomodulatory monokine-inducing activity (22). The tumor cell division inhibitory activity of this cell wall complex is associated with the presence of mycobacterial DNA in the preparation.

A major problem associated with phosphodiester-based DNA is the susceptibility of the linkage to degradation by nucleases present in the extracellular or the intracellular environment (23, 24). Although enhanced

nuclease resistance of antisense DNA is achieved via the use of phosphorothioates (25) or deoxyribose modifications at the 3'-terminus (26), significant increases in toxicity are often observed (27). In this report we have used DNA-DOTAP complex in order to enhance *M. phlei* DNA incorporation into non cationic lipophilic carriers. Four types of submicron pharmaceutical carriers - anionic, cationic, and neutral liposomes and solid lipid nanoparticles (SLN) - were selected for evaluation as drug carriers for *M. phlei* DNA. Cytostatic activity and cytotoxicity toward B16 melanoma cells were determined *in vitro*, with the aim of determining whether incorporation of *M. phlei* DNA into an appropriate carrier could protect and enhance its activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

M. phlei was provided by Bioniche Life Sciences Inc. (London, Ontario, Canada) Herring sperm DNA (HS DNA), lysozyme, sodium dodecyl sulfate (SDS), ethidium bromide (EtBr), dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide (MTT), lactate dehydrogenase (LDH) commercial kit, cholesterol (99.5% purity: CHOL) and trilaurin (TL) were from Sigma Chemical company (St. Louis, MO). Proteinase K, modified Eagle's medium (MEM), non-essential amino acids and fetal bovine serum (FBS) were from Gibco Life sciences

(Grand Island, NY). Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) were from Northern Lipids, Inc. (Vancouver, B.C., Canada), dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP) was obtained from Avanti Polar-Lipids Inc. (Alabaster, AL) and distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀) was from Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). B16-F1 murine melanoma cells were from the American Type Culture Collection (Frederick, MD).

2.2 Methods

2.2.1 Isolation of DNA from M. phlei

One g of *M. phlei* wet cell mass in 5 mL TE buffer (10 mM Tris.Cl, pH 7.4 and 1 mM EDTA, pH 8.0) was incubated with 100 μ L of 50 mg/mL lysozyme solution at 37°C for 90 min. Proteinase K (100 μ L containing 5mg/mL) and of SDS (100 μ L containing 500 mg/mL) were then added, and the incubation continued for a further 10 min at 65°C. Mycobacterial DNA was then purified by conventional phenol extraction and ethanol precipitation (Moore, 1995). *M. phlei* genomic DNA was sonicated for 5 min on ice with a probe sonicator

(Model 550 Sonic Dismembrator, Misonix Inc., PA, Pittsburgh) using power 3, before incorporation into the lipidic carriers.

2.2.2 Formation of DNA-DOTAP complexes

DOTAP (500 μg , 100 μg and 25 μg) was solubilised in CHCl_3 in sterile glass tubes, and evaporated under reduced pressure to leave a thin film. *M. phlei* DNA (1 mL containing 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in NaCl (0.85 % w/v) was added to each tube and agitated for 30 min at 50°C to allow the formation of DNA-DOTAP complexes (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios respectively). HS DNA-DOTAP complexes (1/1, 5/1 and 20/1 mass ratios) were prepared as negative controls.

2.2.3 Tumor cell line

B16-F1 melanoma cells were grown as adherent monolayer cultures in MEM supplemented with non-essential amino acids and containing 10% heat-inactivated FBS (56°C, 30 min) (MEM-FBS). The cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 .

2.2.4 Proliferation assay

B16-F1 cells were incubated in 100 μL MEM-FBS (5×10^3 cells) in 96-well flat-bottomed tissue culture plates for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 with different concentrations of *M. phlei* DNA, *M. phlei* DNA-DOTAP complexes (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios) or *M. phlei* DNA-DOTAP incorporated into lipidic carriers. A concentration range of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA was evaluated. Lipidic carriers prepared using an initial ratio of 500 μg *M. phlei* DNA-DOTAP/mg lipid were used and subsequently diluted to give different DNA concentrations. Control incubations were carried-out using HS DNA, HS DNA-DOTAP complexes (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios) and HS DNA-DOTAP incorporated into lipidic carriers. Cell proliferation was measured by determination of MTT reduction (Mosman *et al.*, 1983). Briefly, 10 μL MTT dissolved in PBS (5 mg mL^{-1}) was added to the wells which were further incubated at 37°C for 4 h. Acid-isopropanol (100 μL isopropanol containing 0.04 M HCl) was then added, and reduced MTT was measured at a wavelength of 570 nm in an ELISA plate reader.

2.2.5 Toxicity assay

B16-F1 melanoma cells were incubated in 100 μL of MEM-FBS (5×10^3 cells) in 96-well flat-bottomed tissue culture plates for 48 h at 37°C in an

atmosphere of 5% CO₂ with *M. phlei* DNA, *M. phlei* DNA-DOTAP complexes (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios) or *M. phlei* DNA-DOTAP (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios) incorporated into lipidic carriers as described above. LDH activity in the supernatant was used as an indicator of cytotoxicity, and was determined using a modified commercial LDH kit (28). Total LDH activity was determined by incubating the cells in 1.0 % v/v Triton X-100 in water to induce lysis, followed by vigorous agitation.

2.2.6 Liposome preparation

Anionic liposomes were prepared from DPPC and DMPG (9:1 mol ratio), cationic liposomes were prepared from DOPE/DOTAP (1:1 mol ratio), and neutral liposomes were prepared from DPPC/CHOL (7:3 mol ratio). Amphiphilic DSPE-PEG (10 mol %) was incorporated in both anionic and cationic liposomes. All manipulations were carried-out in a class 100 laminar flow hood using sterile reagents and depyrogenated (180°C, 4h) sterile glassware. All liposomes were prepared by dissolving the lipids/phospholipids in anhydrous chloroform followed by rotary evaporation under reduced pressure in sterile, pyrogen-free round-bottomed flask to form thin lipid /phospholipid films. The required volume of NaCl (0.85% w/v) was added, and liposomes were prepared by agitation at 65°C. Liposomes containing *M. phlei* DNA-DOTAP (1/1, 5/1 and 20/1 mass ratios) were prepared by hydrating the

lipid film with 0.5 mg/mL of DNA-DOTAP (1/1, 5/1 and 20/1 mass ratios) in 0.85% NaCl. Control liposomes were prepared using 0.5 mg/mL of HS DNA-DOTAP (1/1, 5/1 and 20/1 mass ratios).

2.2.7 SLN preparation

To prepare SLNs, 20 mg TL, 0.5 mg DPPC and 0.06 mg DMPG were dissolved in 2 mL chloroform in a sterile round bottom flask at room temperature. After removal of the CHCl_3 by rotary evaporation under reduced pressure at 50°C, an oily lipid film was obtained on the flask wall. The lipid film was hydrated with 2 mL of saline solution and hydrated for 5 min at 50°C. The emulsion obtained was homogenized by sonication for 1 min to produce SLN (29). SLN containing *M. phlei* DNA were prepared by hydrating the lipid film with 0.5 mg/mL DNA-DOTAP (1/1, 5/1, 20/1 mass ratios) in saline solution. Controlled SLN were prepared using HS DNA-DOTAP solutions at the same mass ratios.

2.2.8 Particle size measurement and zeta (ζ) potential

The mean particle size of the lipidic carriers was determined by photon correlation spectroscopy (N4 Plus, Coulter, Hialeah, FL). The samples were diluted with saline solution to give a particule count rate between 5×10^4 and

1×10^6 counts/s. Mean particle diameter was calculated in size distribution processor mode (SDP) using the following conditions: fluid refractive index 1.33; temperature 20°C; viscosity 0.93 cP; angle of measurement 90.0°; sample time 10.5 μ s, and sample run time 90 s.

The ζ potential was measured using a Delsa 440SX (Coulter, Hialeah, FL) using the following conditions: current 10 mA; frequency range 500 Hz; viscosity 0.93 cP; dielectric constant 78.3; conductivity 16.7 ms/cm; on time 2.5 s, off time 0.5 s, and sample run time 60 s.

2.2.9 Quantification of incorporated DNA

The loading efficiency of the liposomal carriers was determined after separation of liposomes from the aqueous suspension medium by centrifugation at 30,000 g for 60 min at 4°C. Free DNA present in the supernatant was then quantified fluorimetrically using the DNA intercalator EtBr (final concentration 5 μ g/ml), at an excitation wavelength of 546 nm and an emission wavelength of 590 nm.

2.2.10 DNase degradation assay

HS DNA 500 (μ g/mL), HS DNA-DOTAP (5/1 mass ratio) in DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes and HS DNA-DOTAP (5/1 mass ratio) in

DPPC/CHOL liposomes were incubated with DNase I (300 units / mL) in DNase I reaction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 5; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl) at 37°C for 60 min. DNase I was inactivated by the addition of EDTA (final concentration 2.5 mM) and the reaction mixture was heated for 10 min at 65°C to denature the enzyme. The size and the ζ potential of the two carriers were then measured. Digestion of HS DNA by DNase-1 was confirmed by electrophoresis in agarose gels (0.7% agarose containing 5mg/mL EtBr) for 3 h at 100 V.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *M. phlei* DNA inhibits B16-F1 melanoma cell proliferation

The ability of DNA isolated from HS or from *M. phlei* to inhibit the division of B16-F1 melanoma cells was initially determined. Cell proliferation was measured by MTT reduction and toxicity by LDH release. Figure 1 shows the cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA and of HS DNA toward B16-F1 melanoma cells. *M. phlei* DNA caused significant inhibition of cell proliferation ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$) (fig. 1) without intrinsic cytotoxicity ($ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) (data not shown), whereas HS DNA had no effect on cell division (fig. 1) and was not cytotoxic (data not shown). The mechanism(s) whereby *M. phlei* DNA inhibits tumor cell division and induces apoptosis are not currently

known. The ability of *M. phlei* DNA to inhibit tumor cell division is associated with cell cycle arrest (30), indicating a specific mode of action which is currently under investigation. The ability of DNA prepared from *M. phlei* to inhibit cell division is in sharp contrast to DNA prepared from BCG, which does not appear to inhibit tumor cell division ((19), Phillips and Filion, manuscript in preparation). The similarity in base composition of DNA derived from *M. phlei* (69% CG) and of DNA derived from BCG (66% CG) (31) does not appear to be a predictive factor for tumor cell proliferation inhibitory activity. BCG DNA shares little sequence homology with *M. phlei* DNA (32), thus indicating that the activity of *M. phlei* DNA may in fact be sequence, not base composition, specific.

The efficiency of DNA incorporation into non-cationic carriers is low (33); in order to enhance DNA incorporation into non-cationic lipid/phospholipid carriers, we felt it would be advantageous to complex DNA with the cationic lipid DOTAP prior to incorporation using non-cytostatic/non-cytotoxic amounts of DOTAP. We initially analysed the proliferation inhibitory activity of the *M. phlei* DNA-DOTAP complex at three different mass ratios (1/1, 5/1, and 20/1), and found no change in the cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei*-DNA-DOTAP at any of the mass ratios (fig 2A). We confirmed this observation using HS DNA which had no effect on cellular growth when complexed with DOTAP at three different ratios (fig. 2B). Although DOTAP did not change *M.*

phlei DNA activity, it appears that HS DNA is capable of reducing DOTAP cell proliferation inhibitory activity toward B16-F1 cells. Although DOTAP alone caused significant inhibition of cell proliferation ($IC_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$), it was not inhibitory when complexed with HS DNA (IC_{50} of HS DNA-DOTAP 1/1 $> 50 \mu\text{g/mL}$).

Fig 3 shows that HS-DNA or *M. phlei* DNA also reduces DOTAP cytotoxicity. The percentage of LDH released by DOTAP ($ED_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$) was considerably reduced when DOTAP was complexed with HS or *M. phlei* DNA ($ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). These results demonstrate that the use of a DNA-DOTAP complex at a mass ratio as high as 1/1 does not modify *M. phlei* DNA cell proliferation inhibitory activity, and does not exhibit any cytotoxicity.

3.2 Liposome and nanoparticle characterisation

Table 1 summarizes the mean particle diameter, ζ potential and DNA incorporation capacity of each of the different carriers. Liposomes composed of DPPC/DMPG (9/1 molar ratio) had a negative charge (ζ potential = -19 mV) conferred by the negatively charged phospholipid DMPG. SLN composed of the same phospholipids had a similar ζ potential (-15 mV). DOPE/DOTAP liposomes possessed a positive charge conferred by the quaternary ammonium group of DOTAP (ζ potential = +34 mV). Pegylated liposomes

were neutral (DPPC/DMPG/PEG ζ potential = -5 mV; DOPE/DOTAP/PEG ζ potential = -1 mV), thus demonstrating that incorporating amphiphilic DSPE-PEG (10 mol %) in anionic and cationic liposomes masks their surface charge. DPPC/CHOL liposomes were neutral (ζ potential = -2 mV).

DNA incorporation into the carriers was evaluated (table 2). It appears that complexation of DNA with DOTAP enhanced DNA incorporation into non cationic carriers by 2-6 fold. However, the amount of DNA associated with neutral or negatively charged liposomes after complexation with DOTAP is significantly less than that obtained with cationic liposomes.

3.3 Cell proliferation inhibitory activity

Cytostatic activity toward B16-F1 melanoma cells was determined *in vitro* using a tetrazolium (MTT) reduction assay, and cytotoxicity was determined by the release of the cytoplasmic enzyme LDH (table 3). Anionic liposomes composed of DPPC/DMPG (9:1 molar ratio, ζ potential = -19 mV) were cytostatic (IC_{50} = 32 μ g/mL) but were not cytotoxic (ED_{50} > 1 mg/mL). Incorporating amphiphilic DSPE-PEG (10 mol %) to anionic liposomes masked their surface charge (ζ potential = -5 mV) and reduced their cytostatic activity. However, anionic SLN composed of TL/DPPC/DMPG (30:1:0.1 mol ratio; ζ potential = -15 mV) were not cytostatic or cytotoxic (IC_{50} > 1 mg/mL,

ED₅₀ > 1 mg/mL). These results indicate that the relative content of the phospholipid DMPG and not the charge is responsible for the observed inhibition. Cationic liposomes composed of DOPE/DOTAP (mol ratio 1:1; ζ potential = +34 mV) had cytostatic (IC₅₀ = 49 μ g/mL) and cytotoxic activity (ED₅₀ = 87 μ g/mL); incorporating amphiphilic DSPE-PEG (10 mol %) into these liposomes masked their surface charge (ζ potential = -1 mV) and reduced their cytostatic activity (IC₅₀ = 1 mg/mL), as well as reducing their cytotoxic activity (ED₅₀ = 590 μ g/mL). The cell proliferation inhibitory activity as well as the cytotoxic activity of DOPE/DOTAP liposomes may be due to the intrinsic toxicity of cationic lipids. Cationic liposomes have been reported to have a number of adverse effects that appear to be related to their ability to act as inhibitors of protein kinase C activity (34). Neutral DPPC/CHOL liposomes (ζ potential = -2 mV) were not toxic toward B16 melanoma cells, and did not inhibit cell proliferation (IC₅₀ > 1 mg/mL, ED₅₀ > 1mg/mL). These results demonstrate that DMPG or DOTAP containing liposomes are not appropriate carriers for *M. phlei* DNA because of their intrinsic cell proliferation inhibitory activity and toxicity. Grafting amphiphilic PEG, which masks the particle surface charge, only partially neutralized DOPE/DOTAP liposome cytostatic or cytotoxic activity, but was however effective in neutralizing the cytostatic activity of DPPC/DMPG liposome. Neutral liposomes, or anionic SLN, were in contrast inert, and are thus appropriate for development as carriers for targeting DNA to tumor cells.

3.4 DNA/DOTAP complex is destabilised after association with lipophilic carriers

Free DNA interacts spontaneously with cationic liposomes whereas the use of cationic lipid in a DNA/DOTAP complexed form augments the incorporation of DNA into neutral or anionic lipophilic carriers such as DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes or DPPC/CHOL liposomes. As we demonstrated above, DOTAP complexed with HS DNA is not cytotoxic and does not change *M. phlei* DNA growth inhibitory activity. However, the association of HS DNA-DOTAP (mass ratio 1:1) with inert liposomes DPPC/DMPG/DSPE-PEG, DPPC/CHOL or SLN, surprisingly triggered a strong cell proliferation inhibitory activity (fig. 5A, 5C). HS DNA-DOTAP complex (mass ratio 5:1) was inert below concentrations of 5 µg/mL, 50 µg/mL, and 1 µg/mL of HS DNA when associated with DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes, DPPC/CHOL liposomes, and SLN respectively (data not shown). HS DNA-DOTAP complex (mass ratio 20:1) was inert below concentrations of 5 µg/mL, 50 µg/mL, and 0.5 µg/mL of HS DNA when associated with DPPC/DMPG/DSPE-PEG, DPPC/CHOL, and SLN respectively (data not shown). It appears that the DNA-DOTAP complex is destabilised in the presence of lipophilic carriers to the benefit of a DOTAP/carrier interaction, where DOTAP exhibits its cytotoxicity. This may be explained by a stronger affinity of DOTAP for components of the lipophilic carriers such as negatively-charged head groups or phosphodiester groups than for DNA.

3.5. Liposomal DNA is exposed at the surface of the carrier

It is very probable that the DNA is located on the cell surface of the liposomal carriers. Indeed, after the separation of non incorporated DNA the ζ potential of DPPC/DMPG/DSPE-PEG and DPPC/CHOL liposomes was found to be negative. The surface localization of DNA was also confirmed by DNase treatment, which resulted in a increase in liposomal ζ potential (table 3). The absence of a significant change in liposome size after DNase treatment indicates that the integrity of the carriers was unchanged. The presence of DNA at the surface of the liposomal carriers and the susceptibility to nuclease attack indicates that further modification of the liposomal surface may be required to ensure protection against degradation, especially in view of the fact that pegylation does not appear to be effective.

3.6 Cell proliferation inhibitor activity of *M. phlei* DNA is enhanced after association with neutral liposomes

M. phlei DNA or DNA-DOTAP strongly inhibits B16-F1 melanoma cell proliferation. We therefore determined if we could enhance *M. phlei* DNA inhibitory activity by the use of synthetic carriers. DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes and DPPC/CHOL liposomes were evaluated because of their intrinsic lack of toxicity. The amount of DNA-DOTAP associated with DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes and DPPC/CHOL liposomes was only 10 % of the total DNA used to prepare the liposomes. After removal of the non

incorporated-DNA, we found that the cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA-DOTAP (5/1 or 20/1 mass ratios) associated with DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes was 9-fold (95% confidence limits 4-26) and 68-fold (95% confidence limits 24-323) more potent respectively than non complexed *M. phlei* DNA (fig. 7). *M. phlei* DNA/DOTAP (5/1, 20/1 mass ratios) associated with DPPC/CHOL liposomes was 6-fold (95% confidence limits 3-12) and 7-fold (95% confidence limits 4-17) more potent respectively than non complexed *M. phlei* DNA. These results demonstrate that it is feasible to increase the DNA inhibitory activity potency toward B16-F1 melanoma cells by inclusion into inert lipidic carriers.

4. CONCLUSION

Our results show that *M. phlei* DNA caused significant inhibition of B16-F1 melanoma cell proliferation without intrinsic cytotoxicity. Among the carriers tested, neutral liposomes were selected for carrying *M. phlei* DNA because they exhibited no cytostatic/cytotoxic activity. Complexation of DNA with DOTAP enhanced DNA incorporation into these non cationic carriers by 2-6 fold. Although DOTAP alone caused significant inhibition of cell proliferation it did not change *M. phlei* DNA activity. However, HS DNA was capable of significantly reducing both DOTAP cell proliferation inhibitory activity toward B16-F1 cells and cytotoxicity. The formulations consisting of DNA-DOTAP

complexes (5/1 or 20/1 mass ratio) incorporated into DPPC/DMPG/DSPE-PEG or DPPC/CHOL liposomes significantly enhanced the cell proliferation inhibitory activity of *M. phlei* DNA.

5. TABLES

Table 1. Mean diameter, ζ potential and amount of DNA associated with the carriers.

Carrier	Diameter (nm)	ζ potential (mV)	DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ lipid/phospholipid)	
			DNA alone	DNA/DOTAP (5/1)
DPPC/DMPG (9/1)	332 ± 14^a	-19 ± 4	2 ± 1	5 ± 3
DPPC/DMPG/DSPE-PEG (9/1/0.1)	491 ± 28	-5 ± 4	1 ± 0.8	6 ± 3
DPPC/CHOL (7/3)	273 ± 15	-2 ± 1	2 ± 1.5	8 ± 3
DOPE/DOTAP (1/1)	235 ± 20	$+34 \pm 6$	29 ± 3	n.d.
DOPE/DOTAP/DSPE- PEG (1/1/0.1)	124 ± 4	-1 ± 3	n.d. ^b	n.d.
SLN	381 ± 48	-15 ± 5	n.d. ^c	n.d. ^c

^a The results shown are the mean \pm SD of three separate experiments.

^b n.d.: not determined. DNA incorporation by DOPE/DOTAP/DSPE-PEG liposomes was not determined because of their toxicity

^c n.d.: not determined. It was not possible to separate unincorporated DNA from SLN-DNA by centrifugation due to the density of the SLN.

Table 2. ED₅₀ and IC₅₀ of the four types of submicron pharmaceutical carriers.

Carrier	ED ₅₀ (mg/mL) ^a	IC ₅₀ (mg/mL) ^b
DPPC/DMPG (9/1)	> 1	0.032
DPPC/DMPG/DSPE-PEG (9/1/0.1)	> 1	1
SLN	> 1	>1
DOPE/DOTAP (1/1)	0.087	0.049
DOPE/DOTAP/DSPE-PEG (1/1/0.1)	0.59	1
DPPC/CHOL (7/3)	> 1	>1

^aLDH ED₅₀ was determined as described in the Materials and Methods.

^bMTT IC₅₀ was determined as described in the Materials and Methods.

Table 3. ζ potential and size of neutral liposomes containing HS DNA-DOTAP before and after treatment with DNase.

Carrier	Before DNase treatment		After DNase treatment	
	ζ potential (mV)	Size (nm)	ζ potential (mV)	Size (nm)
DPPC/DMPG/DSPE- PEG (9/1/0.1)	-16 ± 4^a	860 ± 180	-5 ± 1^b	910 ± 150^d
DPPC/CHOL (7/3)	-18 ± 2	740 ± 150	-10 ± 2^c	880 ± 110^d

^aThe results shown are the mean \pm SD of three separate experiments.

^bSignificantly different to vector-DNA complex before DNase treatment ($p < 0.008$, 2-tailed t -test).

^cSignificantly different to carrier-DNA complex before DNase treatment ($p < 0.003$, 2-tailed t -test).

^dNot significantly different to carrier-DNA complex before DNase treatment ($p > 0.05$, 2-tailed t -test).

6. LEGEND TO FIGURES

Figure 1

M. phlei DNA (O) but not herring sperm DNA (●) inhibits B16-F1 cells proliferation. B16-F1 cells were incubated at 5.0×10^3 cells ml⁻¹ with different concentration of DNA or DNA/DOTAP for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cell proliferation was measured by determination of MTT reduction as described in the Materials and Methods section. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

Figure 2

A. DNA/DOTAP complexes with mass ratios of 20/1 (Δ), 5/1 (\square) and 1/1 (\blacksquare) do not modify *M. phlei* DNA inhibitory activity toward B16-F1 cells. B. HS DNA/DOTAP complexes with mass ratios of 20/1 (Δ), 5/1 (\square) and 1/1 (\blacksquare) reduce DOTAP inhibitory activity toward B16-F1 cells. B16-F1 cells were incubated at 5.0×10^3 cells ml⁻¹ with different concentration of DNA or DNA/DOTAP for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cell proliferation was measured by determination of MTT reduction as described in the

Materials and Methods section. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

Figure 3.

M. phlei DNA-DOTAP (1/1 mass ratio) (closed columns) and HS DNA-DOTAP (1/1 mass ratio) (grey columns) reduce DOTAP (open columns) toxicity toward B16-F1 cells. B16-F1 cells were incubated at 5.0×10^3 cells ml^{-1} with the indicated concentrations of DOTAP for 48 h at 37°C, in an atmosphere of 5% CO_2 . Toxicity was determined by the release of LDH activity into the supernatant. Total LDH activity was determined by incubating the cells with 1.0% (v/v) Triton X-100. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

Figure 4

B16-F1 melanoma cell proliferation inhibitory cell proliferation activity of liposome-incorporated HS DNA-DOTAP complex (1/1 mass ratio) (O), free HS DNA-DOTAP complex (1/1) (●), liposomal carriers containing DOTAP (□) and DOTAP alone (■). Fig. A, DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes; Fig. B, DPPC/CHOL liposomes; and Fig. C, SLN. B16-F1 cells were incubated at 5.0×10^3 cells ml^{-1} for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . Cell proliferation was determined by MTT reduction as described in the Materials and Methods

section. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

Figure 5

Free *M phlei* DNA (O), encapsulated *M. phlei* DNA-DOTAP complex (20/1 mass ratio) (●), encapsulated *M phlei* DNA-DOTAP complex (5/1 mass ratio) (□) and encapsulated HS DNA-DOTAP (5/1 mass ratio) (■) inhibitory cell proliferation activity toward B16-F1 melanoma cells. Fig. A shows DNA encapsulated into DPPC/DMPG/DSPE-PEG liposomes and fig. B shows DNA encapsulated into DPPC/CHOL liposomes. B16-F1 cells were incubated at 5.0×10^3 cells ml⁻¹ with different concentrations of centrifuged DNA-DOTAP liposomes for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cell proliferation was measured by determination of MTT reduction as described in the Materials and Methods section. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

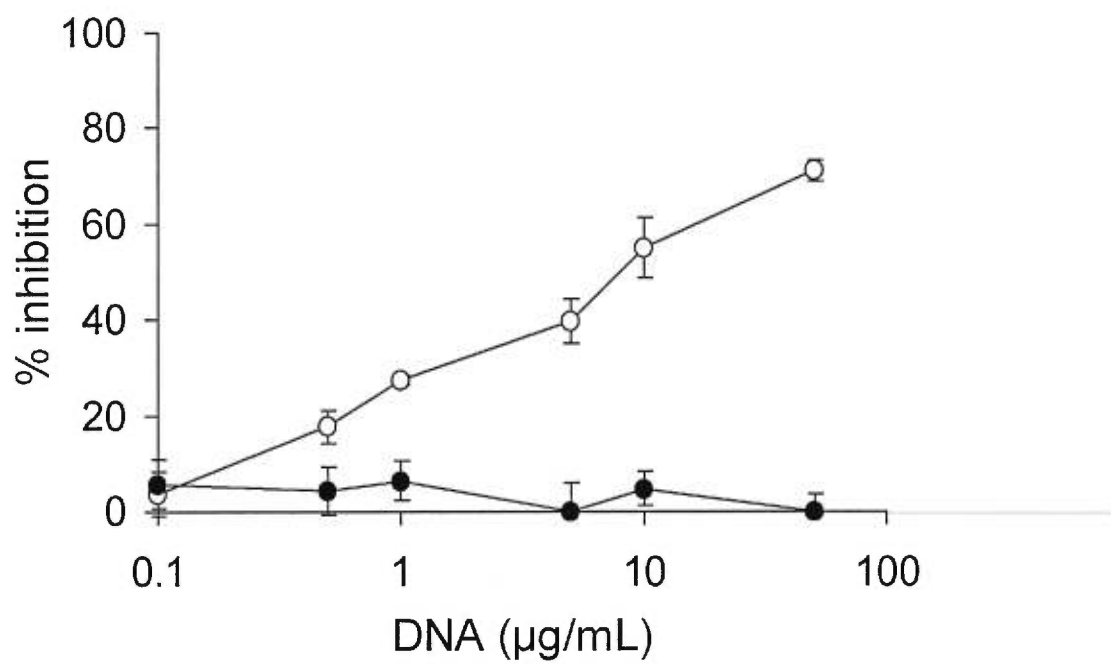


Figure 1

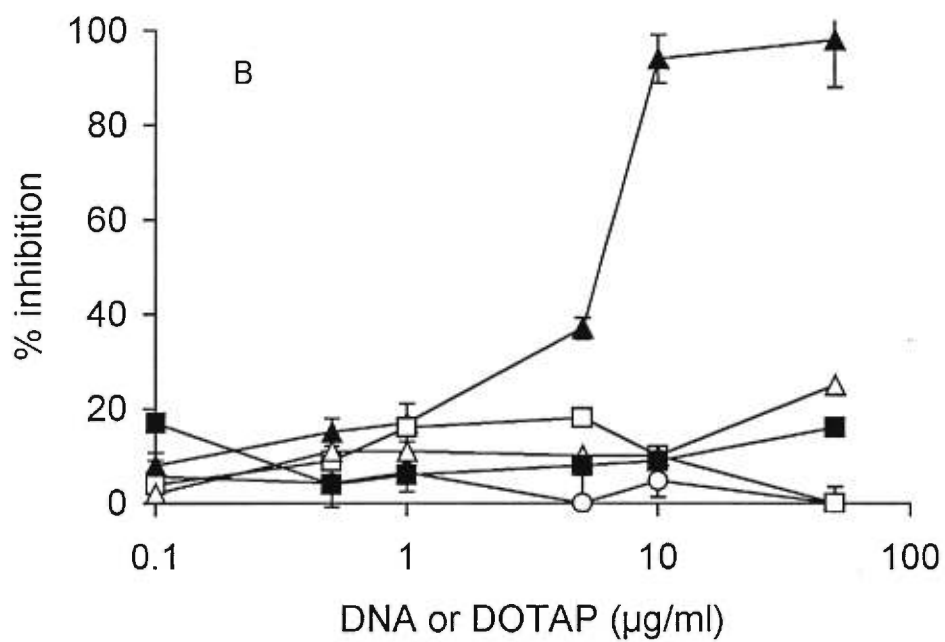
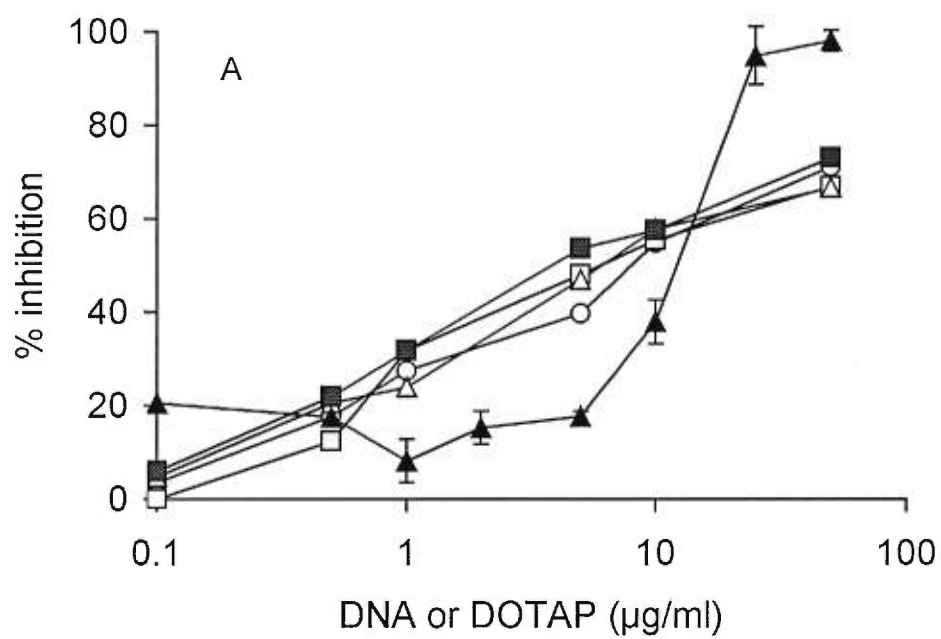


Figure 2

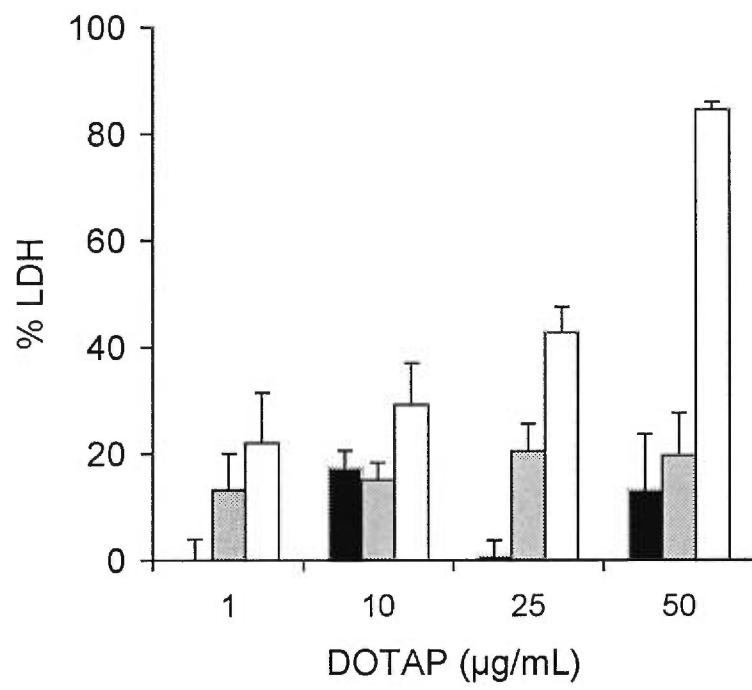


Figure 3

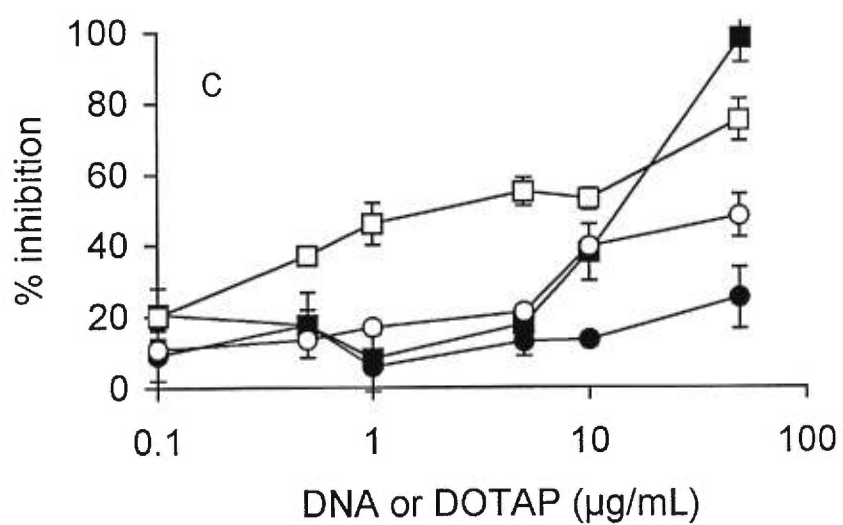
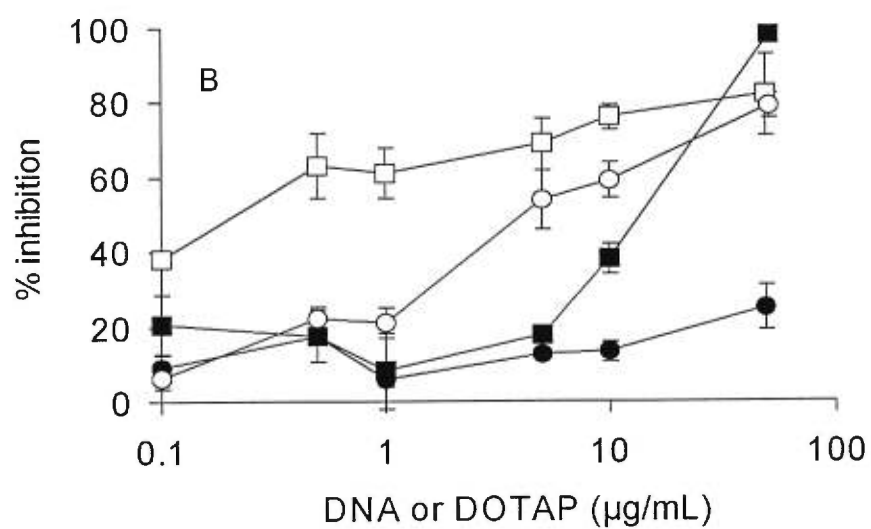
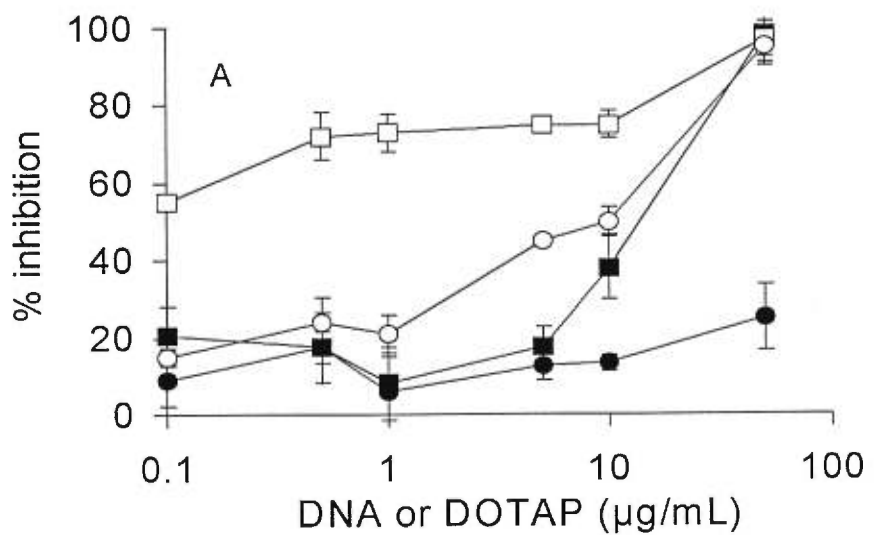


Figure 4

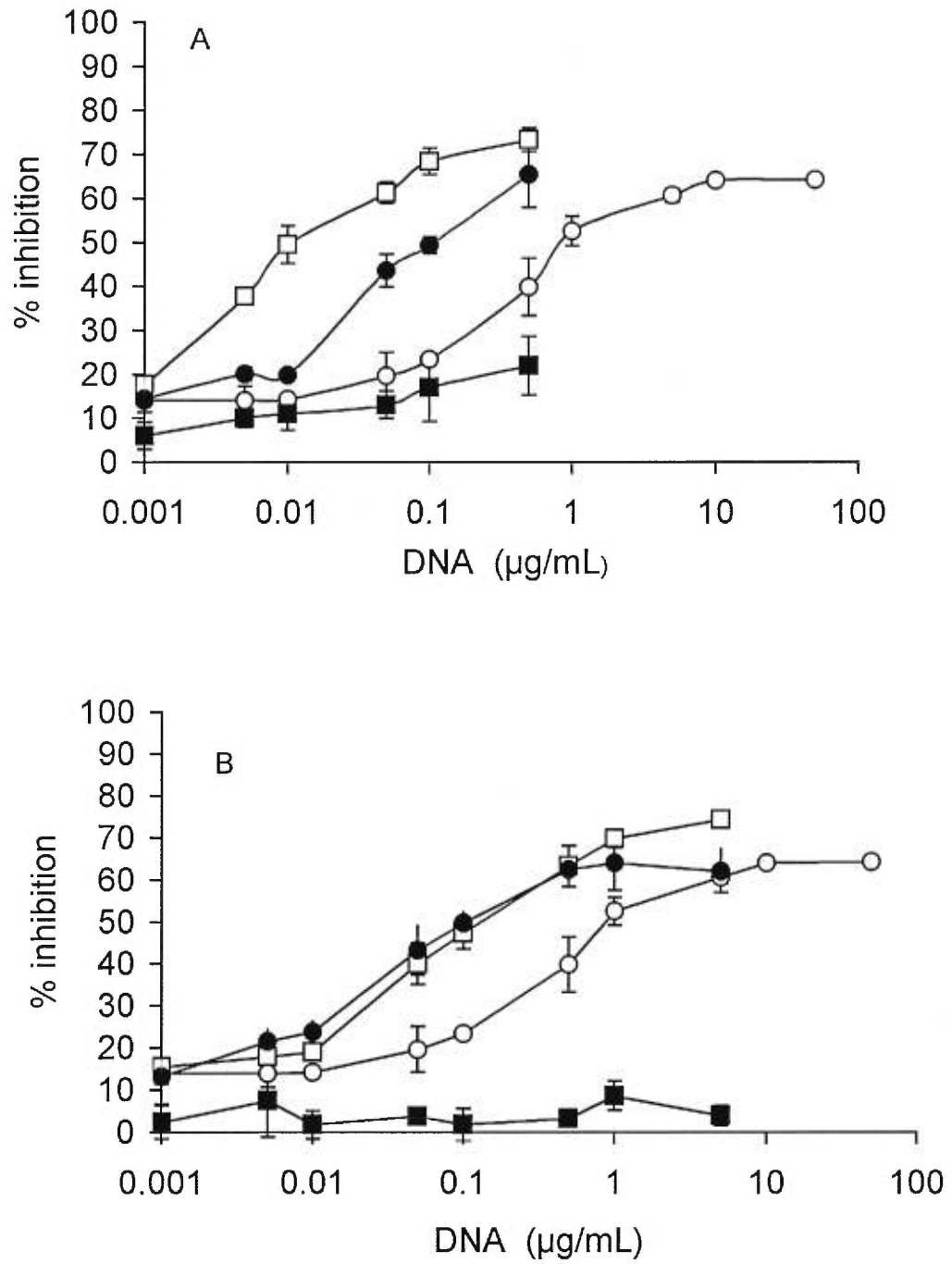


Figure 5

7. REFERENCES

1. Maher, L. J., Wold, B., and Dervan, P. B. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation, *Science*. 245: 725-730, 1989.
2. Crooke, S. T. Therapeutic applications of oligonucleotides, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 329-376, 1992.
3. Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K. J. Therapeutic application of ribozymes, *Pharmacol. Ther.* 68: 247-267, 1995.
4. Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous infection into mice: Involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake, *Pharm. Res.* 12: 825-830, 1995.
5. Fisher, P. L., Terhorst, T., Cao, X., and Wagner, R. W. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 21: 3857-3865, 1993.
6. Miller, N. and Vile, R. Targeted vectors for gene therapy, *FASEB J.* 9: 190-199, 1995.
7. Vile, R. G., Tuszynski, A., and Castleden, S. Retroviral vectors. From laboratory tools to molecular medicine, *Mol. Biotechnol.* 5: 139-158, 1996.

8. Robbins, P. D., Tahara, H., and Ghivizzani, S. C. Viral vectors for gene therapy, *Trends Biotechnol.* *16*: 35-40, 1998.
9. Fink, D. J. and Glorioso, J. C. Herpes simplex virus-based vectors: problems and some solutions, *Adv. Neurol.* *72*: 149-156, 1997.
10. Yei, S., Mittereder, N., Tang, K., O'Sullivan, C., and Trapnell, B. C. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated *in vivo* vector administration to the lung, *Gene Ther.* *1*: 192-200, 1994.
11. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. S., Wenz, J. P., Northrop, M., Ringold, M., and Danielsen, H. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *84*: 7413-7417, 1987.
12. Bennett, C. F., Chiang, M. Y., Chan, H., Schoemaker, J. E. E., and Mirabelli, C. K. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides, *Mol. Pharmacol.* *41*: 1021-1033, 1992.
13. Sorgi, F. L. and Huang, L. Drug delivery applications, 1997.
14. Huang, L. and Li, S. Liposomal gene delivery: A complex package, *Nat. Biotechnol.* *15*: 620-621, 1997.
15. Chonn, A. and Cullis, P. R. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* *30*: 73-83, 1998.

16. Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., and Sudo, T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 955-962, 1984.
17. Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG, *Jpn J Cancer Res.* 79: 866-873, 1988.
18. Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells, *Microbiol Immunol.* 36: 55-66, 1992.
19. Shimada, S., Yano, O., Inoue, H., Kuramoto, E., Fukuda, T., Yamamoto, H., Kataoka, T., and Tokunaga, T. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 681-688, 1985.
20. Mallick, B. B., Kishore, S., Das, S. K., and Garg, A. Non-specific immunostimulation against viruses, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 55-63, 1985.

21. Papapetropoulou, M., Tsintzou, A., and Vantarakis, A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece, *Can. J. Microbiol.* 43: 499-502, 1997.
22. Fillion, M. C., Lépicier, P., and Phillips, N. C. *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells, *Br. J. Cancer.* 79: 229-235, 1999.
23. Iida, R., Sawazaki, K., Yasuda, T., Tsubota, E., Aoyawa, M., Matsuk, T., and Kishi, K. Deoxyribonuclease I phenotyping from saliva stains, *J. Forensic Sci.* 44: 175-178, 1999.
24. Prince, W. S., Baker, D. L., Dodge, A. H., Ahmed, A. E., Chestnut, R. W., and Sinicropi, D. V. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum, *Clin. Exp. Immunol.* 113: 289-296, 1998.
25. Hoke, G. D., Draper, K., Freiser, S. M., Gonzalez, C., Driver, V. B., Zounes, M. C., and Ecker, D. J. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection, *Nucleic Acids Res.* 19: 5743-5748, 1991.
26. Uhlmann, E. and Peyman, A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle, *Chem. Rev.* 90: 543-584, 1990.
27. Agrawal, S., Zhao, Q., Jiang, Z., Oliver, C., Giles, H., Heath, J., and Serota, D. Toxicologic effects of an oligodeoxyribonucleotide

- phosphorothioate and its analogs following intravenous administration in rats, *Antisense Nucleic Acid drug dev.* 7: 575-584, 1997.
28. Phillips, N. C. and Gagné, L. Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipid correlation with liposome immune adjuvant activity, *J. Drug Target.* 3: 137-147, 1995.
 29. Pisetsky, D. S. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code, *Immunity.* 5: 303-310, 1996.
 30. Fillion, M. C., Fillion, B., Marie, V., Reader, S., Ménard, I., and Phillips, N. C. Mycobacterial cell wall-DNA complex (MCC) induces cycle arrest at the late S+G₂M phase in leukemic cells, *Br. J. Cancer.* 80 *supplement 2*: 76, 1999.
 31. Wayne, L. G. and Gross, W. M. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from mycobacteria, *J. Bacteriol.* 96: 1915-1919, 1968.
 32. Shivannavar, C. T., Katoch, V. M., Sharma, V. D., Patil, M. A., Katoch, K., Bharadwaj, V. P., Sharma, R. K., Bhatia, A. S., and Agrawal, B. M. Determination of mycobacterial phylogeny on the basis of immunological relatedness of superoxide dismutases, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1164-1169, 1996.
 33. Maurer, N., Mori, A., Palmer, L., Monck, M. A., Mok, K. W. C., Mui, B., Akhong, Q. F., and Cullis, P. R. Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs, *Molecular Membrane Biology.* 16: 129-140, 1999.

34. Filion, M. C. and Phillips, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells, *Biochim. Biophys. acta.* 1329: 345-356, 1997.

CHAPITRE 4
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

1. INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE PAR L'ADN DE *M. PHLEI*

La paroi mycobactérienne provenant de *M. phlei* possède une activité anticancéreuse directe via l'induction de l'apoptose. Cette activité semble liée à la présence d'ADN complexé à la paroi mycobactérienne. Nous avons évalué l'activité de l'ADN génomique de *M. phlei* sur la prolifération de cellules B16-F1 issues de mélanomes de souris par la réaction d'MTT et nous avons en effet observé une forte inhibition de la croissance cellulaire ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$). L'ADN de sperme de hareng utilisé comme contrôle négatif ne montre aucun effet sur la prolifération cellulaire ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). De plus, le test de LDH indique que l'ADN de *M. phlei* n'est pas toxique aux concentrations étudiées ($ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'ADN de *M. phlei* inhibe la croissance des cellules tumorales et induit l'apoptose sont encore inconnus. Cette activité semble propre à l'ADN de *M. phlei* puisque l'ADN provenant de BCG ne possède aucun effet sur la prolifération cellulaire (83). La composition des bases de l'ADN de *M. phlei* (69% CG) et de l'ADN de BCG (66% CG) présente une similitude qui par conséquent ne semble pas responsable de l'activité antiprolifératrice de l'ADN de *M. phlei*. Par contre, la séquence des bases des deux ADN ne partage que peu d'homologie, ce qui indique que l'activité de l'ADN de *M. phlei* est probablement liée à une séquence particulière de ses bases. La capacité de l'ADN de *M. phlei* à inhiber la division cellulaire en bloquant le

cycle cellulaire indique un mode d'action spécifique qui est actuellement en cours d'étude.

Cependant, les applications thérapeutiques de l'ADN mycobactérien dans le traitement systémique du cancer sont limitées du fait de la courte demi-vie de l'ADN, sensibles aux dégradations enzymatiques. Ainsi, le but de cette étude consiste dans un premier temps, à développer un vecteur synthétique pour transporter l'ADN génomique de *M. phlei*.

2. DÉVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DE VECTEURS SYNTHÉTIQUES

2.1 Les nanoparticules de chitosan

Les nanoparticules de chitosan sont obtenues spontanément par la réticulation d'une solution de chitosan à l'aide de tripolyphosphate ou d'ADN de sperme de hareng. Le potentiel ζ et la taille des complexes ainsi formés sont mesurés. Dans les deux cas, le diamètre des particules diminue lorsqu'on augmente la densité en charge de phosphate. Cela pourrait s'expliquer par une augmentation des points de réticulation qui favorise la formation de particules plus petites. La complexation polymère-ADN est influencée par le rapport de charge entre les deux. Des interactions électrostatiques et des ponts hydrogène semblent jouer un rôle prépondérant

(161). Cependant, au dessus de 6 μmol de phosphate, le diamètre des particules augmente et celles-ci semblent s'agréger à 16,2 μmol de phosphate. Ces résultats sont liés à une forte diminution de la charge en surface des particules qui conduit à leur agrégation. Des résultats similaires sont obtenus avec l'ADN de *M. phlei*.

2.2 les vecteurs lipidiques

2.2.1 Dérivation de l'ADN

L'efficacité de l'incorporation d'ADN dans les vecteurs lipophiles non cationiques est très faible (170). Afin d'y remédier, on a pensé à former un complexe ADN-lipide cationique (DOTAP). La quantité de DOTAP utilisée doit être à la fois non cytostatique, non toxique, mais toutefois suffisante pour améliorer la fixation de l'ADN sur les porteurs lipidiques. Pour cela, nous avons étudié l'effet sur la prolifération cellulaire d'un complexe ADN de *M. phlei*-DOTAP à trois rapports différents (1:1, 5:1, 20:1 (m:m)) et nous n'avons observé aucune modification de l'activité de base de l'ADN. De plus, on a confirmé ces résultats en utilisant de l'ADN de sperme de hareng (non cytostatique) complexé avec DOTAP aux mêmes rapports 1:1, 5:1, 20:1 (m:m). De la même manière, ces complexes n'ont aucun effet sur la prolifération cellulaire ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) alors que le DOTAP seul l'inhibe

fortement ($IC_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$). Par conséquent, le DOTAP ne modifie pas l'activité de l'ADN, mais, en revanche l'ADN de hareng diminue l'activité antiprolifératrice du lipide cationique. D'autre part, l'ADN de *M. phlei* et l'ADN de sperme de hareng réduisent la toxicité du DOTAP puisque le pourcentage de LDH en présence de DOTAP seul ($ED_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$) diminue fortement après complexation de ce dernier aux deux types d'ADN ($ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats démontrent que jusqu'à un rapport ADN-DOTAP 1:1, l'activité de l'ADN de *M. phlei* ne varie pas et le complexe n'exhibe aucune cytotoxicité.

2.2.2 Caractérisation des vecteurs

Les liposomes composés de DPPC/DMPG (9/1 rapport molaire) sont négatifs (ζ potentiel = -19 mV). Les NLS composés des mêmes phospholipides ont un potentiel ζ similaire (-15 mV). Les liposomes DOPE/DOTAP ont une charge positive due à l'ammonium quaternaire du DOTAP (ζ potentiel = +34 mV). Les liposomes pégylés sont neutres (potentiel ζ des liposomes DPPC/DMPG/DSPE-PEG = -5 mV; potentiel ζ des liposomes DOPE/DOTAP/DSPE-PEG = -1 mV), ce qui démontre que l'incorporation de PEG à la surface de liposomes anioniques ou cationiques masque leur charge. Les liposomes DPPC/CHOL sont neutres et présentent un potentiel ζ proche de 0 (-2 mV).

2.3 Incorporation de l'ADN dans les vecteurs

Il apparaît qu'après dérivation de l'ADN par DOTAP, la quantité d'ADN incorporé dans les liposomes neutres augmente de 2 à 6 fois, ce qui demeure néanmoins faible par rapport à la quantité d'ADN fixée par les lipides cationiques. Les nanoparticules de chitosan lient quant à elles plus de 94% de l'ADN.

2.4 Essai de dégradation par la DNase

Lors de l'incubation des nanoparticules de chitosan contenant de l'ADN avec de la DNase pendant 30 min, on observe que l'ADN véhiculé est plus résistant à la DNase que l'ADN libre. En effet, tout l'ADN libre est dégradé par l'enzyme, alors que 42% d'ADN demeure présent dans les nanoparticules de chitosan. L'ADN complexé aux lipides cationiques semble plus accessible à la digestion enzymatique, seulement 30% d'ADN reste associé au vecteur après le traitement enzymatique. Ces résultats démontrent cependant, que dans les deux cas une proportion non négligeable de l'ADN est accessible aux dégradations enzymatiques. Alors que la perte de l'ADN s'accompagne d'une augmentation du potentiel ζ des liposomes cationiques, on n'observe pas de modification de la charge en surface des nanoparticules de chitosan. Les deux types de vecteurs forment des complexes par interaction ionique avec l'ADN, néanmoins l'ADN est piégé dans la matrice de chitosan, alors qu'il se

retrouve principalement à la surface des liposomes cationiques (171). La perte de l'ADN dans les nanoparticules de chitosan serait liée à la structure poreuse de ces dernières. Ainsi, des modifications supplémentaires de la surface des nanoparticules sont nécessaires afin de mieux protéger l'ADN véhiculé par le chitosan. Des résultats semblables sont obtenus avec les liposomes neutres, où l'ADN semble se lier en surface des vecteurs. En effet, après séparation de l'ADN non incorporé par centrifugation, le potentiel ζ des liposomes neutres devient négatif et un traitement à la DNase conduit alors à l'augmentation du potentiel ζ .

3. EFFETS CYTOSTATIQUES ET CYTOTOXIQUES DES VECTEURS SYNTHÉTIQUES

Les nanoparticules de chitosan n'ont pas effet cytotatique ($IC_{50} > 1$ mg/mL) ou cytotoxique ($ED_{50} > 1$ mg/mL) envers les cellules B16-F1. Par contre les liposomes cationiques sont à la fois cytotatiques ($IC_{50} = 49$ μ g/mL) et cytotoxiques ($ED_{50} = 87$ μ g/mL). La faible toxicité des nanoparticules de chitosan a déjà été observée auparavant (172). Ainsi, la charge positive en soi ne semble pas responsable de l'effet cytotatique ou cytotoxique. L'activité antiprolifératrice des liposomes cationiques et leur toxicité seraient plutôt dues à une toxicité intrinsèque des lipides cationiques. En effet, l'incorporation de DSPE-PEG amphiphile masque la charge de ces liposomes mais ne réduit qu'en partie l'activité cytotatique ($IC_{50} = 1$ mg/mL) et

cytotoxique ($ED_{50} = 590 \mu\text{g/mL}$). Les liposomes cationiques contenant du DOTAP possèdent plusieurs effets secondaires, essentiellement dus à l'inhibition de la protéine kinase C (145). Les liposomes anioniques (DPPC/DMPG) sont cytostatiques ($IC_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$) mais ne sont pas cytotoxiques ($ED_{50} > 1 \text{ mg/mL}$). L'incorporation de DSPE-PEG (10 mole %) réduit l'activité cytostatique. Cependant les NLS anioniques composées de TL/DPPC/DMPG (30:1:0.1 rapport molaire) ne sont ni cytostatiques ($IC_{50} > 1 \text{ mg/mL}$) ni cytotoxiques ($ED_{50} > 1 \text{ mg/mL}$). Ces résultats montrent que c'est la quantité de phospholipide DMPG et non la charge qui est responsable de l'activité cytostatique des liposomes anioniques. Enfin, les liposomes neutres composés de DPPC/CHOL ne possèdent aucun effet cytostatique ou cytotoxique ($IC_{50} = 1 \text{ mg/mL}$, $ED_{50} > 1 \text{ mg/mL}$). D'après ces résultats, il apparaît que les liposomes anioniques et les liposomes contenant du DOTAP ne sont pas appropriés pour transporter l'ADN de *M. phlei*, puisqu'ils ne sont pas inertes. Les liposomes neutres DPPC/DMPG/DSPE-PEG et DPPC/CHOL, les NLS et les nanoparticules de chitosan n'ont quant à eux aucun effet sur la prolifération cellulaire et vont nous permettre d'évaluer l'activité de l'ADN de *M. phlei* une fois associé à un support synthétique.

4. ASSOCIATION ADN-VECTEUR: EFFET SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

4.1 ADN de sperme de hareng

On a vu précédemment que le DOTAP complexé avec l'ADN n'est pas cytotoxique et ne modifie pas l'effet de l'ADN de *M. phlei* sur la prolifération cellulaire. Cependant, l'association d'ADN de hareng-DOTAP (1:1 m:m) avec les véhicules inertes préalablement sélectionnés conduit à une forte inhibition de la croissance cellulaire. Le complexe ADN hareng-DOTAP (5:1 m:m) semble inerte en dessous des concentrations de 5 µg/mL, 50 µg/mL, et 1 µg/mL, lorsqu'on l'associe respectivement aux liposomes DPPC/DMPG/DSPE-PEG, aux liposomes DPPC/CHOL et aux NLS. Enfin, le complexe ADN hareng-DOTAP (20:1 m:m) est inerte en dessous des concentrations de 5 µg/mL, 50 µg/mL, et 0.5 µg/mL, lorsqu'on l'associe respectivement aux liposomes DPPC/DMPG/DSPE-PEG, aux liposomes DPPC/CHOL et aux NLS. Ces résultats démontrent que le complexe ADN-DOTAP est déstabilisé en faveur d'une interaction DOTAP-vecteur où le DOTAP recouvre sa toxicité. Ainsi, l'affinité du DOTAP pour les vecteurs lipophiles (groupements négatifs, ou groupements phosphate) semble supérieure à son affinité pour l'ADN. Les nanoparticules de chitosan préparées avec de l'ADN de hareng ne présentent aucune activité cytostatique et servent de contrôle négatif.

4.2 ADN de *M. phlei*

L'inhibition de la prolifération cellulaire par l'ADN de *M. phlei* augmente fortement après complexation avec le chitosan. Les nanoparticules de chitosan sont 20 fois plus actives que l'ADN seul (95% limite de confiance 5.9-166). Comme on a vu ci-dessus, la complexation du chitosan avec l'ADN de hareng n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire, ce qui démontre que la complexation en soi ne contribue pas à l'activité. Le mécanisme d'interaction du chitosan avec les cellules mammifères est encore méconnu. Les cellules mammifères ont un potentiel ζ négatif et une simple interaction électrostatique pourrait être suffisante pour favoriser une interaction ADN-cellule plus efficace. De plus, l'association du complexe ADN-DOTAP (5:1 et 20:1 m:m) aux liposomes DPPC/DMPG/DSPE-PEG augmente respectivement de 68 fois (95% limite de confiance 24-323) et de 9 fois (95% limite de confiance 4.2-26) l'activité de l'ADN libre. Enfin, l'association du complexe ADN-DOTAP (5:1 et 20:1 m:m) aux liposomes DPPC/CHOL augmente respectivement de 68 fois (95% limite de confiance 24-323) et de 7 fois (95% limite de confiance 3.6-17) l'activité de l'ADN libre.

En conclusion, notre étude démontre qu'il est possible d'augmenter significativement l'efficacité de l'ADN de *M. phlei* en l'incorporant dans un vecteur synthétique de type polymère ou liposomal.

5. REFERENCES

1. Dive, C., Evans, C. A., and Whetton, A. D. Induction of apoptosis-new targets for cancer chemotherapy, *Cancer Biol.* 3: 417-427, 1992.
2. Hannun, Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer therapy, *Blood.* 89: 1845-1853, 1997.
3. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. H. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer.* 26: 239-245, 1972.
4. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature.* 284: 555-556, 1980.
5. Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., and Wyllie, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry, *Biochim. Biophys. Acta.* 1133: 275-285, 1992.
6. Arends, M. J., Morris, R. G., and Willie, A. Apoptosis: the role of the endonuclease, *Am. J. Pathol.* 136: 593-608, 1990.
7. Cohen, J. J. and Duke, R. C. Glucocorticoid activation of a calcium dependant endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death, *J. Immunol.* 132: 38-42, 1984.
8. Bruno, S., Lassota, P., Giaretti, W., and Darzinkiewicz, Z. Apoptosis of rat thymocytes triggered by prednisolone, camptothecin or teniposide is

- selective to G⁰ cells and is prevented by inhibitors of proteases, *Oncol. Res.* 4: 29-35, 1992.
9. Eastman, A. The pathway of apoptosis activated by anticancer agents, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 33: 587, 1992.
10. Gaido, M. L. and Cidlowski, J. A. Identification, purification and characterisation of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B, *J. Biol. Chem.* 266: 18580-18585, 1991.
11. Piacentini, M., Autuori, F., Dini, L., Farrale, M. G., Ghibelli, L., Piredda, L., and Fesus, L. Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation, *Cell Tiss. Res.* 263: 227-235, 1991.
12. Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. Mechanisms and functions of cell death, *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698, 1991.
13. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre-B cells, *Nature.* 335: 440-442, 1988.
14. Korsmeyer, S. J. Regulators of cell death, *Trends Genet.* 11: 101-105, 1995.
15. Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., and White, E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting

- the p53-inducible and death-promoting Bax protein, *Genes Dev.* *10*: 461-477, 1996.
16. Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell.* *74*: 609-619, 1993.
17. Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., and Van Dyke, T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*, *Nature.* *385*: 637-640, 1997.
18. Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. Somatic frame shift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science.* *275*: 967-969, 1997.
19. Sabbatini, P., Han, J. H., Chiou, S. K., Nicholson, D., and White, E. Interleukin 1 beta converting enzyme-like proteases are essential for p53-mediated transcriptionally-dependent apoptosis, *Cell Growth Diff.* *8*: 643-653, 1997.
20. Mushmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wrong, S. L., and Fessik, S. W. X-ray and NMR structure of human Bcl-X, an inhibitor of programmed cell death, *Nature.* *381*: 335-341, 1996.
21. Ko, L. J. and Prives, C. P-53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.* *10*: 1054-1072, 1996.

22. White, K., Tahaoglu, E., and Steller, H. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper, *Science*. 271: 805-807, 1996.
23. Buttyan, R., Zakeri, Z., Lockshin, R., and Wolgemuth, D. Cascade induction of *c-fos*, *c-myc* and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate, *Mol. Endocrinol.* 2: 650-657, 1988.
24. Rao, L. and White, E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 52-58, 1997.
25. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell*. 75: 641-652, 1993.
26. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*. 87: 171, 1996.
27. Fraser, A. and Evan, G. I. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, *drICE*, *Embo. J.* 16: 2805-2813, 1997.
28. Rotonda, J. J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. The three dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis, *Nature Struct. Biol.* 3: 619-625, 1996.

29. Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., and et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme, *Nature*. 370: 270-275, 1994.
30. Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westwendorp, M., Baeuerle, P., Drodge, W., Krammer, P. H., Fiers, W., and Schulze-Osthoff, K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis, *Nature*. 375: 81-83, 1995.
31. Mc Carthy, N. J., Whyte, M. K. B., Gilbert, C. S., and Evan, G. I. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogene, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak, *J. Cell Biol.* 136: 215-227, 1997.
32. Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and Puck, J. M. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome, *Cell*. 88: 935-946, 1995.
33. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis, *Nature*. 356: 314-317, 1992.
34. Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. C., and Tschopp, J.

- Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape, *Science*. 274: 1363-1366, 1996.
35. Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 271: 4961-4965, 1996.
36. Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain, *J. Biol. Chem.* 270: 7795-7798, 1995.
37. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A. N. J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M. E., and Dixit, V. M. FLICE a novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex, *Cell*. 85: 817-827, 1996.
38. Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferez, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Mankovitch, J., Shi, L., Greenmberg, A., Miller, L. K., and Wong, W. W. Inhibition of ICE family proteases by baciloviruse anti-apoptotic protein p35, *Science*. 269: 1885-1888, 1995.

39. Komyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., and Salvesen, G. Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA, *J. Biol. Chem.* 269: 1931-1937, 1994.
40. Kaufmann, S. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note., *Cancer Res.* 49: 5870-5878, 1989.
41. Huschtscha, L. J., Bartier, W. A., Ross, C. E. A., and Tattersall, M. H. N. Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs *in vitro.*, *Br. J. Cancer.* 73: 54-60, 1996.
42. Meyn, R. E., Stephens, L. C., Hunter, N. R., and Milas, L. Apoptosis in murine tumors treated with chemotherapy agents, *Anticancer drugs.* 6: 443-450, 1995.
43. Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias, *Leukemia.* 7: 659-670, 1993.
44. Kondo, S., Yin, D., Takeuchi, J., Morimura, T., Oda, Y., and Kikuchi, H. bcl-2 gene enables rescue from *in vitro* myelosuppression (bone marrow cell death) induced by chemotherapy, *Br. J. cancer.* 70: 421-426, 1994.

45. Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V. M., Niskanen, E., Nordling, S., and Reed, J. C. Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma, *Cancer Res.* *55*: 4471-4478, 1995.
46. Eliopoulos, A. G., Derr, D. J., Herold, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J. C., and Young, L. S. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: Influence of p53 and Bcl-2, *Oncogene.* *11*: 1217-1228, 1995.
47. Tarodi, B., Subramanian, T., and Chinnaudurai, G. Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects against cell death by DNA-damaging agents and heterologous viral infection, *Virology.* *201*: 404-407, 1994.
48. Dole, M. G., Jasty, R., Cooper, M. J., Thompson, C. B., Nunez, G., and Castle, V. P. Bcl-x is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.* *55*: 2576-2582, 1995.
49. Minn, A. J., C.M., R., Boise, L. H., and Thompson, C. B. Expression of bcl-x confer a multidrug resistance phenotype, *Blood.* *86*: 1903-1910, 1995.
50. Nooter, K., Boersma, A. W. M., Oostrum, R. G., Burger, H., Jochemsen, A. G., and Stoter, G. Constitutive expression of the c-H-ras oncogene inhibits doxorubicin-induced apoptosis and promotes cell

- survival, in a rhabdomyosarcoma cell line, *Br. J. Cancer*. 71: 556-561, 1995.
51. Kondo, S., Barnett, G. H., Hara, H., Morimura, T., and Takeuchi, J. MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis, *Oncogene*. 10: 2001-2006, 1995.
52. Yuan, Z. M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage, *Nature*. 382: 272-274, 1996.
53. Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., and Debatin, P. H. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug induced apoptosis in leukemia cells, *Nat. Med.* 2: 574-577, 1996.
54. Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., and Housman, D. E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell*. 74: 957-967, 1993.
55. Fidler, I. J. and Poste, G. The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy, *Semin. Oncol.* 12: 207-221, 1985.
56. Killion, I. J. and Kollmorgen, G. M. Isolation of immunogenic tumor cells by cell-affinity chromatography, *Nature*. 259: 674-676, 1976.
57. Fidler, I. J. Macrophages and metastasis: a biological approach to cancer therapy, *Cancer Res.* 45: 4714-4726, 1985.

58. Hahn, H. Antibacterial defense mechanisms, *Infection*. *11*: 5112-5118, 1983.
59. Nogueira, N. Intracellular mechanisms of killing, *Contemp. Top. Immunobiol.* *12*: 53-69, 1984.
60. Gregoriadis, G. and Allison, A. C. Liposomes in biotechnological system. New York: Wiley-Interscience, 1980.
61. Stern, A.S., Magram, J. and Presky D.H. Interleukin-12 : an integral cytokine in the immune response. *Life Sci.* *58*: 639-654, 1996.
62. Hibbs, J. B. Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells *in vitro* by activated macrophages, *J. Natl. Cancer Inst.* *53*: 1487-1492, 1974.
63. Fidler, I. J. and Schroit, A. J. Synergism between lymphokines and muramyl dipeptide encapsulated in liposomes: *in situ* activation of macrophages and therapy of spontaneous cancer metastasis, *J. Immunol.* *133*: 515-518, 1984.
64. Saiki, I. and Fidler, I. J. Synergistic activation by recombinant mouse interferon-gamma and muramyl-dipeptide of tumoricidal properties in mouse macrophages, *J. Immunol.* *135*: 684-688, 1985.
65. Pace, J. L. Synergistic interactions between IFN-gamma and IFN-beta in priming murine macrophages for tumor cell killing, *J. Leukocyte Biol.* *44*: 514-520, 1988.

66. Poste, G. and Kirsh, R. Rapid decay of tumoricidal activity and loss of responsiveness to lymphokines in inflammatory macrophages, *Cancer Res.* 39: 2582-2590, 1979.
67. Chedid, L., Audibert, F., and Johnson, A. G. Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptide analogous to bacterial immunoregulating agents, *Prog. Allergy.* 25: 63-80, 1978.
68. Fogler, W. E. and Fidler, I. J. The activation of tumoricidal properties in human blood monocytes by muramyl dipeptide requires specific intracellular interaction, *J. Immunol.* 136: 2311-2316, 1986.
69. Parant, M., Parant, F., and Chedid, L. Fate of the synthetic immunoadjuvant muramyl dipeptide (14C-labeled) in the mouse, *Int. J. Immunopharmacol.* 1: 35-41, 1979.
70. Messina, J. P., Gilkeson, G. S., and Pisetsky, D. S. The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens, *Cell. Immunol.* 147: 148-157, 1993.
71. Gilkeson, G. S., Grudier, J. P., Karounos, D. G., and Pisetsky, D. S. Induction of anti-dsDNA antibodies in normal mice by immunization with bacterial DNA, *J. Immunol.* 142: 1482-1486, 1989.
72. Hergesberg, M. Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells, *Experientia.* 47: 1171-1185, 1991.

73. Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation, *Nature*. 374: 546-549, 1995.
74. Sun, S., Cai, Z., Ilanglade-Demoyen, P., Kosaka, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., and Sprent, J. Dual function of *Drosophila* cells as APC for naive CD8+ T cells: implications for tumor immunotherapy, *Immunity*. 4: 555-564, 1996.
75. Sarmiento, M., Glasebrook, A. L., and Fitch, F. W. IgG or IgM monoclonal antibodies reactive with different determinants on the molecular complex bearing Lyt 2 antigen block T cell-mediated cytotoxicity in the absence of complement, *J. Immunol.* 125: 2665-2672, 1980.
76. Messina, J. P., Gilkeson, G. S., and Pisetsky, D. S. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA, *J. Immunol.* 147: 1759-1764, 1991.
77. Paul, W. E., Seder, R. A., and Plaut, M. Lymphokine and cytokine production by Fc epsilon RI+ cells, *Adv. Immunol.* 53: 1-29, 1993.
78. Hirano, T., Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. Biological and clinical aspects of interleukin-6, *Immunol. Today*. 11: 443-449, 1990.

79. Zhan, Y. and Cheers, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection, *Infect. Immun.* 63: 1387-1390, 1995.
80. Murray, H. W. Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation and antimicrobial host defense *in vitro*, in animal models and in humans, *Diagn. microbiol. infect. Dis.* 13: 411-421, 1990.
81. Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., and Sudo, T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 955-962, 1984.
82. Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG, *Jpn J Cancer Res.* 79: 866-873, 1988.
83. Shimada, S., Yano, O., Inoue, H., Kuramoto, E., Fukuda, T., Yamamoto, H., Kataoka, T., and Tokunaga, T. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 681-688, 1985.
84. Halpern, M. D., Kurlander, R. J., and Pisetsky, D. S. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of

- interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha, *Cell. Immunol.* 167: 72-78, 1996.
85. Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. B., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F., and Gately, M. K. Antitumour and antimetastatic activity of interleukin-12 against murine tumors, *J. Exp. Med.* 178: 1223-1230, 1993.
86. Zitvogel, L. and Lotze, M. T. Role of interleukin-12 (IL12) as an anti-tumour agent: experimental biology and clinical application, *Res. Immunol.* 146: 628-638, 1995.
87. Stine, K. C., Warren, B. A., and Becton, D. L. Apoptosis induced by interleukin-12 measured by DNA electrophoresis and *in situ* end labelling in leukemia, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 795: 420-421, 1996.
88. Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells, *Microbiol Immunol.* 36: 55-66, 1992.
89. Morales, A. Long term results of BCG therapy for bladder cancer, *J. Urol.* 132: 457-459, 1984.
90. Lamm, D. L., van der Meijden, A. D., and Morales, A. Incidence and treatment of complications of bacillus calmette-guérin intravesical therapy in superficial bladder cancer, *J. Urol.* 147: 596-600, 1992.

91. Lagranderie, M. R. R., Balazuc, A. M., Deriaud, E., leclerc, C. D., and Gheorghiu, M. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* vaccine strains, *infect. Immunol.* *64*: 1-9, 1996.
92. Kadhim, S. A., Chin, J. L., Batislam, E., Karlick, S., Garcia, B. M., Curtis Nickel, J., and Morales, A. Modification of intravesical Bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthopic murine bladder tumor: Use of mycobacterial cell wall extract (MCWE), *J. Urol.* *149*: A225, 1993.
93. Papapetropoulou, M., Tsintzou, A., and Vantarakis, A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece, *Can. J. Microbiol.* *43*: 499-502, 1997.
94. Mallick, B. B., Kishore, S., Das, S. K., and Garg, A. Non-specific immunostimulation against viruses, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *8*: 55-63, 1985.
95. Fillion, M. C., Lépicier, P., and Phillips, N. C. *Mycobacterium phlei* cell wall complex, a new antitumoral agent, induces IL-12 synthesis by monocytes/macrophages, *Blood.* *90*: 58b, 1997.
96. Chin, J. L., Kadhim, S. A., Batislam, E., Karlick, S. J., Garcia, B. M., Curtis Nickel, J., and Morales, A. Mycobacterium cell wall: an alternative to intravesical bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthopic murine bladder cancer, *J. Urol.* *156*: 1189-1193, 1996.
97. Fillion, M. C. Manuscript in preparation, 2000.

98. Fillion, M. C., Lépicier, P., and Phillips, N. C. *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells, *Br. J. Cancer.* 79: 229-235, 1999.
99. Letai, A. G., Palladino, M. A., Fromm, E., Rizzo, V., and Fresco, J. R. Specificity in formation of triple-stranded nucleic acid helical complexes: studies with agarose-linked polyribonucleotide affinity columns, *Biochemistry.* 27: 9108-9112, 1988.
100. Maher, L. J., Wold, B., and Dervan, P. B. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation, *Science.* 245: 725-730, 1989.
101. Cooney, M., Czernuszewicz, G., Postel, E. H., Flint, S. J., and Hogan, M. E. Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene *in vitro*, *Science.* 241: 456-469, 1988.
102. Ebbinghaus, S. W., Gee, J. E., Rodu, B., Mayfield, C. A., Sanders, G., and Miller, D. M. Triplex formation inhibits HER-2/neu transcription *in vitro*, *J. Clin. Invest.* 92: 2433-2439, 1993.
103. McShan, W. M., Rossen, R. D., Laughter, A. H., Trial, J., Kessler, D. J., Zendegui, J. G., Hogan, M. E., and Orson, F. M. Inhibition of transcription of HIV-1 in infected human cells by oligodeoxynucleotides designed to form DNA triple helices, *J. Biol. Chem.* 267: 5712-5721, 1992.

104. Curcio, L. D., Bouffard, D. Y., and Scanlon, K. J. Oligonucleotides as modulators of cancer gene expression, *Pharmacol. Ther.* *74*: 317-332, 1997.
105. Crooke, S. T. Therapeutic applications of oligonucleotides, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *32*: 329-376, 1992.
106. Boiziau, C., Kurfurst, R., Cazenave, C., Roig, V., Thuong, N. T., and Toulme, J. J. Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism, *Nucleic Acids Res.* *19*: 1113-1119, 1991.
107. Walder, R. Y. and Walder, J. A. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *85*: 5011-5015, 1988.
108. Citro, G., Perrotti, D., Cucco, C., D'Agnano, I., Sacchi, A., Zupi, G., and Calabretta, B. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myb antisense oligodeoxynucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *89*: 7031-7035, 1992.
109. Bos, J. L. *ras* oncogenes in human cancer: a review, *Cancer Res.* *49*: 4682-9, 1989.
110. Mukhopadhyay, T., Tainsky, M., Cavender, A. C., and Roth, J. A. Specific inhibition of K-*ras* expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA, *Cancer Res.* *51*: 1744-1748, 1991.

- 111.Hoke, G. D., Draper, K., Freiser, S. M., Gonzalez, C., Driver, V. B., Zounes, M. C., and Ecker, D. J. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection, *Nucleic Acids Res.* 19: 5743-5748, 1991.
- 112.Agrawal, S., Zhao, Q., Jiang, Z., Oliver, C., Giles, H., Heath, J., and Serota, D. Toxicologic effects of an oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate and its analogs following intravenous administration in rats, *Antisense Nucleic Acid drug dev.* 7: 575-584, 1997.
- 113.Cech, T. R., Zaug, A. J., and Grabowski, P. J. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence, *Cell.* 27: 487-496, 1981.
- 114.Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K. J. Therapeutic application of ribozymes, *Pharmacol. Ther.* 68: 247-267, 1995.
- 115.Tone, T., Kashani-Sabet, M., Funato, T., Shitara, T., Yoshida, E., Kashfian, B. I., Horng, M., Fodstadt, O., and Scanlon, K. J. Suppression of EJ cells tumorigenicity, *In Vivo.* 7: 471-476, 1993.
- 116.Feng, M., Cabrera, G., Deshane, J., Scanlon, K. J., and Curiel, D. T. Neoplastic reversion accomplished by high efficiency adenoviral

- mediated delivery of anti-*ras* ribozymes, *Cancer Res.* 55: 2024-2028, 1995.
117. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-*ras* genes, *Cell.* 53: 549-54, 1988.
118. Ellington, A. D. and Szostak, J. W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature.* 346: 818-822, 1990.
119. Bielinska, A., Shivdasani, R. A., Zhang, L., and Nabel, G. J. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides, *Science.* 250: 997-1000, 1990.
120. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature.* 355: 564-566, 1992.
121. Griffin, L. C., Tidmarsh, G. F., Bock, L. C., Toole, J. J., and Leung, L. L. K. *In vivo* anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits, *Blood.* 12: 3271-3276, 1993.
122. Wang, K. Y., McCurdy, S., Shea, R. G., Swaminathan, S., and Bolton, P. H. A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA, *Biochemistry.* 32: 1899-1904, 1993.

123. Iida, R., Sawazaki, K., Yasuda, T., Tsubota, E., Aoyawa, M., Matsuk, T., and Kishi, K. Deoxyribonuclease I phenotyping from saliva stains, *J. Forensic Sci.* *44*: 175-178, 1999.
124. Prince, W. S., Baker, D. L., Dodge, A. H., Ahmed, A. E., Chestnut, R. W., and Sinicropi, D. V. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum, *Clin. Exp. Immunol.* *113*: 289-296, 1998.
125. Miller, N. and Vile, R. Targeted vectors for gene therapy, *FASEB J.* *9*: 190-199, 1995.
126. Barratt, G. M., Yu, W. P., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Petit, J. F., Tenu, J. P., Israel, L., Morere, J. F., and Puisieux, F. Delivery of MDP-L-alanyl-cholesterol to macrophages: comparaison of liposomes and nanocapsules, *Cancer J.* *2*: 439-443, 1990.
127. Van de Water, B., van Berkel, T. J., and Kuiper, J. Activation of rat Kupffer cells to tumoricidal cells by the immunomodulator muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine incorporated into the novel drug carrier lactosylated low density lipoprotein, *Mol. Pharmacol.* *45*: 971-977, 1994.
128. Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* *13*: 238-252, 1965.
129. Alving, C. R. Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages, *Pharmacol. Ther.* *22*: 407-424, 1983.

130. Poste, G., Kirsh, R., and Bugelski, P. Liposomes as a drug delivery system in cancer therapy, p. 323. New York: Academic Press, 1984.
131. Fidler, I. J. Targeting of immunomodulators to mononuclear phagocytes for therapy of cancer, *Adv. Drug deliv. Rev.* 2: 69, 1988.
132. Poste, G., Bucana, C. D., Raz, A., Bugelski, P., Kirsh, R., and Fidler, I. J. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery, *Cancer Res.* 42: 1412-1422, 1982.
133. Schroit, A. J. and Fidler, I. J. Effects of liposomes structure and lipid composition on the activation of tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide, *Cancer Res.* 42: 161-167, 1982.
134. Fidler, I.J., Fan, D., and Ichinose, Y. Potent *in situ* activation of murine lung macrophages and therapy of melanoma metastases by systemic administration of liposomes containing muramyltripeptide phosphatidylethanolamine and interferon gamma, *Inv. Metastasis.* 9: 75-88, 1989.
135. Deodhar, S. D., Barna, B. P., Edinger, M., and Chiant, T. Inhibition of lung metastases by liposomal immunotherapy in a murine fibrosarcoma model, *J. biol. Response Mod.* 1: 27, 1982.

136. Phillips, N. C. and Tsao, M. Inhibition of experimental liver tumor growth in mice by liposomes containing a lipophilic muramyl dipeptide, *Cancer Res.* *49*: 936-939, 1989.
137. Brodt, P., Blore, J., Phillips, N. C., Munzer, J. S., and Rioux, J. D. Inhibition of murine hepatic tumor growth by liposomes containing a lipophilic muramyl dipeptide, *Cancer immunol. Immunother.* *28*: 54-58, 1989.
138. Mac Ewen, E. G., Kurzman, I. D., Rosenthald, R. C., Smith, B. W., Manley, P. A., Roush, J. K., and Howard, P. E. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome encapsulated muramyl tripeptide, *J. Natl. Cancer Inst.* *81*: 935-938, 1989.
139. Yu, W. P., Barratt, G. M., Devissaguet, J. P., and Puisieux, F. Anti-metastatic activity *in vivo* of MDP-L-alanyl-cholesterol (MTP-Chol) entrapped in nanocapsules, *Int .J. Immunopharmacol.* *13*: 167-173, 1991.
140. Rojanasakul, Y. *Adv. Drug Delivery.* *18*: 115-131, 1996.
141. Farhood, H., Serbina, N., and Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer, *Biochim. Biophys. Acta.* *1235*: 289-295, 1995.
142. Smith, J. G., Walzem, R. L., and German, J. B. Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochim. Biophys. Acta.* *1154*: 327-340, 1993.

143. Aoki, K., Yoshida, T., Sugimuna, T., and Terada, M. Liposome-mediated *in vivo* gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity, *Cancer Res.* 55: 3810-3816, 1995.
144. Caplen, N. J., Alton, E. W., Middleton, J. R., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffrey, P. K., and Hodson, M. E. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, *Nature Med.* 1: 39-46, 1995.
145. Fillion, M. C. and Phillips, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1329: 345-356, 1997.
146. Senior, J. H., Trimble, R., and Maskiewicz, R. Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1070: 173-179, 1991.
147. Yoshihara, E. and Nakae, T. Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine, *Biochim. Biophys. Acta.* 854: 93-101, 1986.
148. Tan, L. and Gregoriadis, G. *Biochem. Soc. Trans.* 17: 690-691, 1989.
149. Malone, R. Non viral genetic therapeutics: advances, challenges and applications for self-assembling systems, p. 4.1.1-4.1.26. Boston: IBC's library series, 1995.

150. Wu, G. Y. and Wu, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4932, 1987.
151. Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., and Birnstiel, M. L. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87: 3410-3414, 1990.
152. Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Phillips, S., Curiel, D. T., and Birnstiel, M. L. High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89: 6094-6098, 1992.
153. Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M., and Roche, A. C. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells, *Nucleic Acids Res.* 21: 871-878, 1993.
154. Thurnher, M., Wagner, E., Clausen, H., Mechtler, K., Rusconi, S., Dinter, A., Birnstiel, M. L., Berger, E. G., and Cotten, M. Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells, *Glycobiology.* 4: 429-35, 1994.
155. Rojanasakul, Y., Wang, L. Y., Malanga, C. J., Ma, J. K., and Liaw, J. Targeted gene delivery to alveolar macrophages via Fc receptor-mediated endocytosis, *Pharm. Res.* 11: 1731-1736, 1994.

156. Perales, J. C., Ferkol, T., Molas, M., and Hanson, R. W. An evaluation of receptor-mediated gene transfer using synthetic DNA-ligand complexes, *Eur. J. Biochem.* 226: 255-266, 1994.
157. Fisher, K. J. and Wilson, J. M. The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer, *Biochem. J.* 321: 49-58, 1997.
158. Ebbinghaus, S. W., Vigneswaran, N., Miller, C. R., Chee-Awai, R. A., Mayfield, C. A., Curiel, D. T., and Miller, D. M. Efficient delivery of triplex forming oligonucleotides to tumor cells by adenovirus-polylysine complexes, *Gene Ther.* 3: 287-297, 1996.
159. Ginobbi, P., Geiser, T. A., Ombres, D., and Citro, G. Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides on human melanoma (M14) cells, *Anticancer Res.* 17: 29-35, 1997.
160. Haensler, J. and Szoka Jr., F. C. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjugate Chem.* 4: 372-379, 1993.
161. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, B., Demeneix, B., and Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethyleneimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7297-7301, 1995.

162. Cherng, J. Y., Van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles, *Pharm Res.* 13: 1038-1042, 1996.
163. Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V., Suzdaltseva, Y. G., and Alakhov, V. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery, *Bioconjug. Chem.* 6: 639-643, 1995.
164. Wolfert, M. A., Schacht, E. H., Toncheva, V., Ulbrich, K., Nazarova, O., and Seymour, L. W. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers, *Hum. Gene Ther.* 7: 2123-2133, 1996.
165. Choi, Y. H., Liu, F., Kim, J. S., Choi, Y. K., Park, J. S., and Kim, S. W. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier, *J. Controlled Release.* 54: 39-48, 1998.
166. Vinogradov, S. V., Bronich, T. K., and Kabanov, A. V. Self-assembly of polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides, *Bioconjug. Chem.* 9: 805-812, 1998.
167. Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., and Remy, J. S. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability, *Pharm. Res.* 15: 1332-1339, 1998.

168. Roy, K., Mao, H. Q., and Leong, K. W. DNA chitosan nanospheres: transfection efficiency and cellular uptake, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 673-674, 1997.
169. Tian, X. X. and Groves, M. Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 151-157, 1999.
170. Maurer, N., Mori, A., Palmer, L., Monck, M. A., Mok, K. W. C., Mui, B., Akhong, Q. F., and Cullis, P. IR. Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs, *Molecular Membrane Biology.* 16: 129-140, 1999.
171. Law, D. Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice, *Hum. Gene Ther.* 6: 553, 1995.
172. Richardson, S. C. W., Hanno, J., J. P. Relbe, W. H. and Duncan, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA, *Int. J. Pharm.* 178: 231-243, 1999.