

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Évaluation de stratégies pour l'optimisation d'un vaccin à ADN contre le
virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)**

par

Mélanie Brunelle

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Octobre 2008

©Mélanie Brunelle, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

**Évaluation de stratégies pour l'optimisation d'un vaccin à ADN contre le
virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)**

présentée par
Mélanie Brunelle

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

John-Morris Fairbrother, président-rapporteur

Brian J. Talbot, directeur de recherche

Youssef Elazhary, codirecteur

Sylvette Laurent, codirectrice

Carl A. Gagnon, membre du jury

Mircea A. Mateescu, examinateur externe

Mario Jacques, représentant du doyen



Sommaire

La protection contre le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est corrélée par la réponse immunitaire dirigée contre la glycoprotéine de l'enveloppe E2. Une difficulté dans la mise au point d'un vaccin contre le BVDV réside dans le fait que de hauts niveaux de variabilité génétique et antigénique entre les deux génotypes du BVDV (I et II) sont observés dans la séquence de E2. L'injection intramusculaire d'un vecteur d'expression eucaryote contenant le gène E2 d'une souche du génotype I confère une réponse immunitaire protectrice chez le bovin contre le BVDV. Cependant, il comporte des lacunes importantes. Premièrement, la protection conférée est principalement dirigée contre les souches du génotype I et deuxièmement, la quantité d'ADN à injecter est très importante pour observer l'induction d'une réponse immunitaire (3 mg/veau). Les deux objectifs généraux de mon projet de recherche sont : (1) d'augmenter le potentiel immunologique du prototype de vaccin à ADN contre le BVDV et (2) créer un vecteur multivalent pour générer une protection croisée contre des souches hétérologues de BVDV et élargir le spectre de protection du vaccin aux deux génotypes. Le premier objectif général se divise en deux objectifs spécifiques : (a) Développer et caractériser des molécules de transport pour assurer la livraison de l'ADN vaccinal et améliorer la biodisponibilité de l'ADN vaccinal, (b) apporter des modifications géniques à la séquence E2 native pour optimiser l'expression du gène et la présentation de la protéine résultante au système immunitaire.

En protégeant l'ADN injecté lors de son voyage vers le noyau, les molécules de transport augmentent le niveau d'expression de l'ADN et permettent de diminuer considérablement la quantité d'ADN nécessaire pour le développement d'une réponse immunitaire adéquate. Trois familles différentes de molécules de transport cationiques ont été étudiées: (1) les poly(amidoamine)s, (2) les surfactants bola(amphiphile)s et (3) les poly(amphiphile)s de type méthacrylate. Pour élargir la compréhension des mécanismes impliqués dans la livraison de gènes par les molécules de transport et déterminer d'éventuelles relations structure-fonction, les propriétés physico-chimiques des complexes molécules de transport/ADN ont été déterminées. Par la suite, plusieurs essais de transfection *in vitro* ont été effectués afin de déterminer le potentiel de transfection des différentes familles de molécules de transport à notre disposition. Les polymères de la famille des poly(amphiphile)s de type méthacrylate se sont avérés des molécules de transport très

efficaces pour la transfection *in vitro* en plus d'être peu toxiques. Nos études *in vitro* ont permis de sélectionner des candidats très prometteurs pour d'éventuelles essais *in vivo*.

Pour optimiser le potentiel immunologique du prototype de vaccin à ADN, des modifications génétiques ont été apportées à la séquence E2. Premièrement, l'optimisation du choix des codons des gènes E2 pour l'espèce bovine grâce à la synthèse chimique a été faite. Deuxièmement, la séquence native du gène E2 a été modifiée pour maximiser la présentation de la protéine exprimée au système immunitaire. Une région riche en résidus hydrophobes responsable de l'ancrage de la glycoprotéine E2 dans la membrane cellulaire a été substituée par la séquence de translocation de la protéine E^{rms} des pestivirus. Les résultats de l'expression *in vitro* indiquent que les modifications apportées à E2 permettent sa sécrétion dans le surnageant cellulaire. Une immunisation expérimentale effectuée chez la souris a démontrée que le plasmide codant la séquence E2 modifiée (Δ E2) permet une meilleure induction de la réponse immunitaire humorale et cellulaire, comparativement à la séquence native.

Pour élargir le spectre de protection du vaccin aux deux génotypes du BVDV, les séquences de gènes E2 provenant de souches présentes en Amérique du Nord et représentatives du génotype I (E2-1, souche NADL) et du génotype II (E2-2 ou Δ E2-2, souche 890) ont été sélectionnées et clonées dans un même vecteur d'expression eucaryote sous le contrôle de promoteurs différents. Des essais de transfection *in vitro* suivis d'immunofluorescence indirecte ont indiqué des niveaux d'expression similaires pour les deux gènes. Une immunisation expérimentale effectuée chez la souris a permis de déterminer l'impact de la présence d'un second gène dans le vecteur d'expression eucaryote pBudCE4.1 sur la réponse spécifique. Les résultats indiquent que l'expression de Δ E2-2 ou de E2-2 par un plasmide codant aussi E2-1 affecte l'intensité de la réponse immunitaire E2-2 spécifique. La réponse immunitaire est inférieure lorsqu'un second gène est présent dans le vecteur pBudCE4.1. De plus, l'expression de Δ E2-2 dans le vecteur codant une seconde protéine ne permet pas une induction immunologique supérieure, telle que remarquée lors de la comparaison de pBude2-2 et pBud Δ E2-2.

Mots clés : virus de la diarrhée virale bovine, protéine d'enveloppe E2, séquence de translocation, vaccination par ADN, molécule de transport, complexe, polymère cationique, bola(amphiphile), transfection, cytotoxicité.

SUMMARY

Protection against the virus responsible for bovine viral diarrhoea (BVDV) is correlated with the immune response directed against the envelope glycoprotein E2. The most significant obstacle to the development of an efficient protective vaccine against the two major genotypes (I and II) of BVDV is the high genetic and antigenic variability observed in the sequence of E2. It has been demonstrated in cattle that intramuscular injection with a eukaryotic expression vector containing the E2 gene of a genotype I strain, confers a protective immune response against BVDV. However, the experimental DNA vaccine possessed serious deficiencies. Firstly, the protection was mainly directed against genotype I strains and secondly, a considerable quantity of DNA (3 mg/animal) was needed to induce a protective immune response. The two main objectives of my research project were: (1) to increase the immunological potential of the DNA vaccine prototype and, (2) to create a multivalent DNA vaccine which generates cross protection against heterologous viral strains and induces a wide spectrum of protection to both genotypes. The first main objective can be subdivided into 2 specific objectives: (a) to develop and characterize gene delivery systems to insure the delivery of the DNA vaccine and to improve its bioavailability, (b) to carry out genetic modifications to the E2 native sequence to optimize the expression of E2 gene and the presentation of the E2 protein to the immune system.

By protecting DNA during its transport from the inoculation site to the nucleus, gene delivery molecules increase the level of gene expression and permit a decrease in the total quantity of DNA needed for the development of an adequate immune response. Three different families of cationic molecules were studied: (1) permanently charged poly(amidoammonium) salt polymers, (2) hemifluorinated bifunctional bola(amphiphile)s and (3) tail-end (dimethylamino)pyridinium-polymers containing polymethacrylates. In order to broaden the understanding of the cationic delivery systems and to determine possible structure-function relationships, the physicochemical properties of the DNA complexes were analysed. Following these initial characterizations, *in vitro* transfection tests were performed to determine the transfection potential of each gene delivery system. Preliminary tests were carried out *in vitro* with a view to identify the non cytotoxic and most effective gene delivery systems which increase DNA expression. The polymethacrylate polymer family was the most effective at gene delivery and showed little

toxicity. These interesting *in vitro* experiments thus identified effective gene delivery systems for future *in vivo* experiments.

To maximize the immunological potential of the DNA prototype, we genetically modified the E2 native sequence. Firstly, we optimized the codons of the E2 genes to be more applicable to bovine species. This was carried out by chemical synthesis. Secondly, we modified the native sequence of the E2 gene to maximize its protein presentation to the immune system. An area rich in hydrophobic residues responsible for the anchoring of E2 to the cell membrane was replaced by the translocation sequence of the E^{ms} protein from pestivirus. Our results from *in vitro* experiments indicated that the modifications made to E2 allowed its secretion into the culture supernatant. *In vivo*, the plasmid encoding the modified E2 (Δ E2) induced better humoral and cellular immune responses compared to the E2 native sequence in mice.

To widen the spectrum of protection against the two BVDV genotypes, E2 gene sequences from BVDV strains present in North America and representative of genotype I (E2-1, NADL strain) and genotype II (E2-2 or Δ E2-2, 890 strain) were selected and combined in a single eukaryotic expression vector (pBudCE4.1) under the control of different promoters. *In vitro* transfection followed by indirect immunofluorescence indicated similar gene expression for the two genes. Experimental immunization carried out in mice demonstrated the impact of a second gene in a eukaryotic expression vector. The results indicated that the expression of Δ E2-2 or E2-2 by a plasmid also encoding E2-1 significantly reduced the intensity of the E2-2 immune response. The immune response was lower when E2-1 was present in the pBudCE4.1 vector. Moreover, the Δ E2-2 expression by the vector encoding a second gene did not induce a superior immune response, as observed with the comparison of pBudE2-2 and pBud Δ E2-2 responses.

Key words: bovine viral diarrhoea virus, E2 envelope glycoprotein, DNA vaccine, sequence of translocation, gene delivery system, complex, cationic polymer, bola(amphiphile), transfection, cytotoxicity.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES ET SCHÉMAS.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xx
DÉDICACE.....	xxii
I. INTRODUCTION.....	1
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
1. Le virus de la diarrhée virale bovine et la pathologie associée.....	5
1.1. Le virus de la diarrhée virale bovine	5
1.1.1. Classification.....	5
1.1.2. Génome et protéines virales.....	7
1.1.3. Mécanisme d'infection	8
1.1.3.1. Entrée du virus dans la cellule.....	9
1.1.3.2. Traduction et répllication	10
1.2. Manifestations cliniques.....	10
1.3. Réponse immunitaire induite suite à une infection par le BVDV.....	12
1.3.1. Rôle immunologique des protéines virales	12
1.3.1.1. La glycoprotéine E2 (E2).....	13
1.3.1.2. La protéine de la nucléocapside (N).....	14
1.3.1.3. La protéine non-structurale p125 (p54/80).....	14
1.4. Traitement et contrôle des infections au BVDV.....	15
1.4.1. Programme d'éradication.....	15
1.4.2. Vaccination.....	15

2. Les vaccins à ADN.....	16
2.1. Choix de l'antigène lors de l'élaboration d'un vaccin.....	17
2.2. Choix du vecteur d'expression.....	18
2.2.1. Les vecteurs d'expression d'origine virale.....	18
2.2.2. Les vecteurs d'expression eucaryote.....	19
2.2.2.1. Les composantes	19
2.2.2.2. Efficacité immunologique	19
2.3. Méthodes d'inoculation des vecteurs d'expression eucaryotes.....	20
2.3.1. Méthodes traditionnelles	20
2.3.2. Méthodes mécaniques	20
2.3.2.1. L'électroporation.....	20
2.3.2.2. Le "gene gun".....	21
2.4. Immunologie de la vaccination par ADN	22
2.4.1. Propriété immunostimulante intrinsèque des vecteurs d'expression eucaryotes.....	22
2.4.1.1. Les récepteurs de type « toll-like » 9	23
2.4.2. Maturation et présentation de l'antigène.....	24
2.4.2.1. Cellules présentatrices d'antigènes	24
2.4.2.2. Cellules dendritiques	24
2.4.2.3. Cellules somatiques	26
2.4.3. Réponse des cellules T _{aux} CD4 ⁺	27
2.4.4. Réponse des lymphocytes T cytotoxiques	28
2.4.5. Réponse immunitaire humorale	28
2.4.6. Réponse immunitaire mémoire.....	30
2.4.6.1. Réponse immunitaire mémoire humorale.....	30
2.4.6.2. Réponse immunitaire mémoire cellulaire.....	30
2.5. Risques et problèmes associés à la vaccination par ADN.....	31
2.5.1. Intégration aléatoire	31
2.5.2. Induction d'une tolérance.....	31
2.5.3. Induction d'une réponse autoimmune.....	32
2.5.4. Inconvénients actuels des vaccins à ADN.....	32

3. Mécanismes cellulaires impliqués dans la vaccination par ADN.....	33
3.1. Mécanismes cellulaires : de l'internalisation de l'ADN plasmidique à l'expression de l'antigène.....	33
3.1.1. Internalisation du vecteur d'expression eucaryote	33
3.1.1.1. Rupture de la membrane cellulaire.....	34
3.1.1.2. Formation de larges pores membranaires.....	34
3.1.1.3. Formation de petits pores membranaires.....	34
3.1.1.4. Endocytose.....	35
3.1.2. Les compartiments intracellulaires	37
3.1.2.1. L'endosome et le lysosome.....	37
3.1.2.2. Le cytoplasme.....	37
3.1.2.3. Le noyau.....	38
3.1.2.4 Transcription et expression du transgène.....	40
4. Optimisation des vaccins à ADN	41
4.1. Le vecteur d'expression eucaryote.....	41
4.1.1. L'appareil transcriptionnel.....	41
4.1.1.1. Le promoteur eucaryote.....	41
4.1.1.2. Nouveauté : appareil de transcription dérivé des Alphavirus.....	43
4.1.2. Séquence de l'antigène.....	44
4.1.2.1. Optimisation des codons.....	44
4.1.2.2. Optimisation de la présentation de l'antigène.....	44
4.2. Livraison de l'ADN : molécules de transport	46
4.2.1. Les polymères neutres.....	47
4.2.2. Les lipides cationiques.....	48
4.2.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des lipoplexes...	49
4.2.2.2. Internalisation cellulaire des lipoplexes.....	49
4.2.2.3. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des lipoplexes	50
4.2.3. Les polymères cationiques.....	51
4.2.3.1. Propriétés de surface des complexes.....	51
4.2.3.1.1. Potentiel ζ des complexes et internalisation cellulaire.....	51

4.2.3.2. Diamètre et morphologie des complexes.....	52
4.2.3.2.1. Diamètre et efficacité de transfection.....	56
4.2.3.2.2. Diamètre et transport cytoplasmique.....	57
4.2.3.2.3. Diamètre, morphologie et internalisation nucléaire.....	58
4.2.3.3. Stabilité des complexes.....	59
4.2.3.3.1. Méthode de préparation des complexes et stabilité.....	60
4.2.3.4. Forces d'association et de dissociation des complexes.	61
4.2.3.5. Efficacité de transfection <i>in vitro</i>	63
4.2.3.6. Efficacité de transfection <i>in vivo</i>	63
4.2.3.7. Les principaux polymères cationiques.....	64
4.2.3.7.1. La poly-L-lysine.....	64
4.2.3.7.2. La polyéthylèneimine.....	65
4.2.3.7.3. Les dendrimères.....	68
4.2.3.7.4. La chitosane.....	69
4.2.4. Fonctionnalisation des molécules de transport.....	70
4.2.4.1. Ligand spécifique.....	70
4.2.4.2. Composante endo-lysomo-lytique.....	70
4.2.4.3. Séquence de localisation nucléaire.....	72
4.3. Molécules immunostimulantes	73
4.3.1. Cytokines.....	74
4.3.1.1. Induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	74
4.3.1.2. Induction d'une réponse immunitaire humorale.....	74
4.3.1.3. Induction générale de la réponse immunitaire.....	75
4.3.2. Molécules de co-stimulation	75
4.3.3. Molécules d'adhésion et chimiokines.....	76
4.3.4. Récepteur fas	76
4.3.5. Motifs CpG non-méthylés d'origine bactérienne.....	76
4.4. Combinaison de vaccins.....	77
4.5. Ciblage des cellules dendritiques	77

		xii
III. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....		79
IV. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....		81
ARTICLE I	Résumé.....	82
	Synthesis and Characterization of New Permanently Charged Poly(amidoammonium) Salts and Evaluation of their DNA Complexes for Gene Transport.....	84
ARTICLE II	Résumé.....	119
	Synthesis and preliminary biological studies of hemifluorinated bifunctional bolaamphiphiles designed for gene delivery.....	121
ARTICLE III	Résumé.....	163
	A Structure-Activity Investigation of Hemifluorinated Bifunctional Bolaamphiphiles Designed for Gene Delivery.....	165
ARTICLE IV	Résumé.....	207
	Tail-End (Dimethylamino)pyridinium-Containing Polymethacrylates for Gene Delivery.....	208
ARTICLE V	Résumé.....	238
	Strategies for the improvement of a genetic vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus.....	240
V. DISCUSSION GÉNÉRALE.....		265
VI. CONCLUSION GÉNÉRALE		276
BIBLIOGRAPHIE.....		278

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE III : A Structure-Activity Investigation of Hemifluorinated

Bifunctional Bolaamphiphiles Designed for Gene Delivery

Tableau I	Physicochemical properties of bolaamphiphiles.....	181
Tableau II	The ζ -potential and mean diameter of A-F bolaplex.....	192

ARTICLE IV: Tail-End Amphiphilic Dimethylaminopyridinium-Containing

Polymethacrylates for Gene Delivery

Tableau I	Size and ζ potential obtained by quasielastique light scattering (DLS)	221
-----------	--	-----

ARTICLE V: Strategies for the improvement of a genetic vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus

Tableau I	Schematic diagram of the pBudCE4.1 backbone vector, representation of the different E2 protein expression cassettes and construction of Δ E2-2.....	260
Tableau II	Virus neutralizing antibodies to BVDV/890 strain in DNA- vaccinated mice serum collected after the third and fourth vaccination of mice.....	261

LISTE DES FIGURES ET SCHÉMAS

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1	Le virus de la diarrhée virale bovine.....	5
Figure 2	Comparaison de séquences de 36 fragments codant pour la protéine E2 par la méthode de "Maximum Likelihood".....	6
Figure 3	Effets sur le fœtus lors de l'infection de la mère par un virus du BVD non cytophagène en fonction du stade de gestation de la vache gestante.....	11
Figure 4	Schématisation du transport nucléaire par un CPN.....	39
Figure 5	Représentation tri-dimensionnelle d'un complexe de pore nucléaire...	39
Figure 6	pSIN1.5, vecteur dérivé des <i>Alphavirus</i>	43
Figure 7	Condensation de l'ADN par la poly-L-lysine.....	54
Figure 8	Structure toroïdale.....	55
Figure 9	Structure chimique et schématisation de l'organisation physique des principaux polymères cationiques.....	65

ARTICLE I

Figure 1	Schematic route for the synthesis of poly(amidoammonium) salts of the Sm, Bp and BpAz series.....	89
Figure 2	¹ H and ¹³ C APT NMR spectra of polymer S0.....	98
Figure 3	¹ H and ¹³ C NMR spectra of polycation B98.....	99
Figure 4	Representative gel electrophoresis shift assay of poly(amidoammonium) salts of the Sm, Bp, and BpAz series bound to the pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid.....	101
Figure 5	Representative TEM images showing the morphology of poly(amidoammonium) salt-DNA complexes under physiological salt conditions.....	104
Figure 6	<i>In vitro</i> cytotoxicity of poly(amidoammonium) salt-DNA complexes against COS7 cells.....	107
Figure 7	Transfection of COS7 cells using the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT complexed with various poly(amidoammonium) salts of the Sm, Bp and BpAz series.....	108

ARTICLE II

Figure 1	Schematic representations of dissymmetric bolaamphiphiles	122
Figure 2	Chemical structure of hybrid dissymmetric bolaamphiphiles A-E ...	123
Figure 3	Representative gel electrophoresis shift assays of naked DNA and bolaplexes.....	129
Figure 4	Representative TEM images showing the morphology of Bolaamphiphiles.....	130
Figure 5	<i>In vitro</i> transfection data of C/pBudCE4.1LacZ/CAT bolaplexes and relative cell viability (%)......	133
Schéma 1	Synthesis of hemifluorinated central segment.....	125
Schéma 2	Synthetic pathway of bolaamphiphiles A and B.....	126
Schéma 3	Synthetic pathway of bolaamphiphiles C and D.....	127
Schéma 4	Synthetic pathway of bolaamphiphile E.....	128

ARTICLE III

Figure 1	Schematic representation of a polyfunctionalized bolaplex.....	167
Figure 2	Schematic representation of dissymmetric bolaamphiphiles.....	168
Figure 3	Chemical structure of hybrid dissymmetric bolaamphiphiles A-F....	169
Figure 4	TEM micrographies of the self-assembled structure formed in water from bolaamphiphiles.....	182
Figure 5	Representative gel electrophoresis shift assay showing themigration of bolaplexes formed with pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid.....	185
Figure 6	Representative gel electrophoresis shift assay of bolaamphiphiles E and F complexed with pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid.....	187
Figure 7	Ethidium bromide spectrofluorimetric displacement assays.	187
Figure 8	Stability of bolaplexes against <i>in vitro</i> DNase I treatment.....	190
Figure 9	Representative TEM images showing the morphology of bolaplexes..	193
Figure 10	Lamellar complexation of DNA plasmide by C-bolaamphiphiles membrane.....	195
Figure 11	Complexation of DNA plasmide with F-bolaamphiphile micelles.....	195
Figure 12	<i>In vitro</i> cells viability of COS7 cells treated with bolaamphiphiles alone and bolaplexes.....	198

Figure 13	Transfection efficiency of the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT complexed with bolaamphiphile.....	199
Schéma 1	Synthetic pathway to bolaamphiphile F.....	173

ARTICLE IV

Figure 1	Chemical structure of the polyamphiphiles (PnDMAP-Br) and polyamphiphile–surfactant complexes (PnDMAP-S8).....	211
Figure 2	Representative TEM negative stain images showing the morphology of the amphiphilic polymethacrylates	216
Figure 3	Representative gel electrophoresis shift assay of polymethacrylates of the PnDMAP-X series bound to the pBudCE4.1 plasmid.....	218
Figure 4	Representative negative-stain TEM images showing the morphologies of the PnDMAP-Br/DNA polyplexes:	223
Figure 5	Representative negative-stain TEM images showing the morphology of the PnDMAP-S8/DNA polyplexes.....	224
Figure 6	The relative cell viability of the COS7 cells after a 24 h exposure as a function of the polycation concentration for the PnDMAP-X polyamphiphiles in comparison with PEI.....	226
Figure 7	Transfection of COS7 cells using the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT complexed with various PnDMAP-X polymethacrylates series	227

ARTICLE V

Figure 1	<i>In vitro</i> expression of BVDV E2-2 proteins following transient transfection of COS7 cells.....	262
Figure 2	Impact of cellular localization of E2 encoded-antigen on the humoral immune response induced in mice model.....	263
Figure 3	Impact of the E2 dicistronic plasmid construct on the IL-2 specific cytokine production in mouse model.....	264

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
T aux :	cellule T auxiliaire
APC :	cellule présentatrice d'antigène (antigen presenting cell)
BDV :	virus de la maladie des frontières (border disease virus)
BVDV	virus de la diarrhée virale bovine
Ca ²⁺ :	calcium
CD :	cellule dendritique
CHO :	cellules d'ovaires de hamster chinois (chinese hamster ovary cells)
CKP :	promoteur de la créatine kinase (creatin kinase promotor)
Cl ⁻ :	chlorure
cm :	centimètre
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	cytomégalovirus
CO ₂ :	dioxyde de carbone
CpG :	Cytosine-phosphate-Guanine
CPN :	complexe de pore nucléaire
CSFV :	peste porcine classique (classical swine fever disease)
CTL :	lymphocyte T cytotoxique (cytotoxic T lymphocyte)
CTLA-4:	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DOPE :	dioleoylphosphatidylethanolamine
DOTAP :	dioléoyloxy-3-(triméthylammonio) propane
DOTMA :	bromure de dioléoyloxy-propyl-triméthylammonium
DOGS :	dioctadécylamidoglycyl-spermine
EF-1α:	facteur d'élongation humain 1-alpha (elongation factor 1-α)
GM-CSF:	facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages (granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor)
gp :	glycoprotéine
H ⁺ :	proton
HGH :	hormone de croissance humaine (Human Growth Hormon)
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
IL	interleukine

Ig:	immunoglobuline
IMP:	importine- α
INF- γ :	interferon gamma
K ⁺ :	potassium
kDa:	kilo Dalton
LDL:	low-density lipoprotein
LFA-3:	lymphocyte function-associated antigen-3
MDBK:	Madin-Darby bovine kidney cell
MIP-1 α :	monocyte chemotactic protein-1 alpha
Na ⁺ :	sodium
NIAID:	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
SLN :	séquence de localisation nucléaire
MET :	microscopie électronique à transmission
NK:	natural killer
NSP :	protéine non structurale (non structural protein)
nm :	nanomètre
O ₂ :	oxygène
ODN:	oligodéoxynucléotide
PAMAM :	poly(amidoamine)
PAMPs:	pathogen associated molecules pattern
pb:	paire de bases
pCDs:	plasmacytoïdes
pDMAEMA:	poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate)
PEI :	polyéthylèneimine
PEP :	phosphoenolpyruvate
PGK :	phosphoglycérate kinase
PLL :	poly-L-lysine
PI :	animaux immunotolérants infectés de manière persistante
PL :	prolactine
Poly(A) :	polyadénylation
p(TMAEMA):	poly(2-(triméthylamino)éthyl méthacrylate chloride)
PVA :	polyvinyl alcool

PVP :	polyvinylpyrrolidone
PGA :	polyglycolate
PLGA:	polylactate-co-glycolate
PEG :	polyéthylène glycol
RANTES:	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
RE :	réticulum endoplasmique
RS :	séquence rybozyme (rybozym sequence)
VSR :	virus du sarcome de Rous
VRS :	virus respiratoire syncitial
SV40 :	virus Simien
TAT:	transactivateur de transcription (trans-acting activator of transcription)
Tf :	ligand transferrine
TLR-9:	récepteur de type « toll-like » 9 (toll-like receptor 9)
TNF :	facteur de nécrose des tumeurs (tumor necrosis factor)
UbC :	ubiquitine humain
VHB :	virus de l'hépatite B
VHC :	virus de l'hépatite C
VHS :	virus de l'herpes simplex (herpes simplex virus)
VIH :	virus de l'immunodéficience humain
VIS :	virus d'immunodéficience simien
VPH :	virus du papillome humain

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, et plus particulièrement :

Le docteur Sylvette Laurent, attachée de recherche de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal qui m'a guidée et épaulée tout au long de ce projet ;

Le docteur Youssef Elazhary, professeur titulaire au département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour sa co-direction pendant mes études et ses conseils avisés dans le domaine de l'immunisation;

Le docteur Brian Talbot, professeur titulaire au département de Biologie de l'Université de Sherbrooke, pour sa direction et ses conseils;

Monsieur Pascal Vuillaume pour son étroite collaboration au niveau des molécules de transport, son écoute et ses conseils ;

Madame Brigitte Bousquet, technicienne au laboratoire de virologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour son aide technique et les discussions d'ordre scientifique... culinaire et artisanale mais surtout pour son amitié ;

Denis St-Martin, Marie-Hélène Venne, Diane Frenette du département de virologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour leur soutien ;

David Ferland pour son support, son écoute, sa vision positive des événements, son esprit analytique et "analogue";

Nancy Courtemanche et Geneviève Benoit pour sa grande amitié, son écoute, sa joie de vivre et nos soupers ;

Suzanne Lapalme, Bernard Arguin, Mystie pour leur présence à mes côtés, leur soutien moral, leur écoute et leurs encouragements ;

Michael Adam, Charlotte et Henri pour votre présence à mes côtés lors du dépôt final.

Cette étude a été rendue possible grâce au support financier de Valorisation Recherche Québec (VRQ).

J'ai reçu une bourse de rédaction de thèse de l'Université de Montréal.

À ma mère qui est toujours présente pour moi

I. INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un virus enveloppé de la famille *Flaviviridae* du genre *Pestivirus* très répandu parmi les ruminants. Il existe deux génotypes du BVDV : le génotype I et le génotype II. De hauts niveaux de variabilités existent entre les deux génotypes. En outre, suivant leur effet en culture cellulaire, des biotypes cytopathogènes et non cytopathogènes existent pour chacun des génotypes.

La pathologie associée à une infection par le BVDV va de manifestations sub-cliniques à de la diarrhée, immunosuppression et leucopénie, des défauts congénitaux, et même à l'avortement. Un des facteurs épidémiologiques les plus importants associés au BVDV est représenté par les animaux immunotolérants infectés de manière persistante (PI) par une souche non-cytopathogène de BVDV. Ceci survient lors d'une infection par le virus durant les stades précoces du développement fœtal, et ce avant la maturation immunitaire du fœtus. Dans le troupeau, les PI excrètent de grandes quantités de virus dans leur environnement même s'ils ne présentent généralement aucun signe clinique. Il existe aussi une forme mortelle de l'infection, la maladie des muqueuses, qui surgit lors de l'infection d'un PI, cette fois, par une souche cytopathogène de BVDV.

Pour une réponse immunologique protectrice contre le BVDV, le vaccin idéal devrait permettre l'induction d'anticorps neutralisants et l'induction d'une réponse à médiation cellulaire. De plus, le vaccin devrait surmonter la forte variabilité antigénique du virus pour une protection croisée contre les souches hétérologues et finalement, prévenir les infections intra-utérines liées à la génération de PI. Les vaccins de type atténués et inactivés sont utilisés pour contrer les infections au BVDV. Les vaccins atténués induisent généralement une meilleure réponse immunologique que les vaccins inactivés mais représentent, un danger potentiel d'infections prénatales lorsque utilisés pour la vaccination des vaches gestantes. Il y a aussi une possibilité d'interférence avec les anticorps maternels lors de la vaccination d'un nouveau-né et l'induction d'une immunosuppression transitoire. Étant donné les désavantages des vaccins traditionnels et leur efficacité, des vaccins de types sous-unitaires et à base d'ADN [virus recombinant et vecteur d'expression eucaryote] ont été développés.

Plusieurs études d'immunisation par ADN chez les animaux de laboratoire ont démontré que l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique induit le développement d'une immunité humorale et cellulaire efficace contre le pathogène ciblé. Par contre, les expériences d'immunisations par ADN chez les humains et les grands animaux se sont avérées beaucoup moins efficaces. Au niveau de la vaccination par ADN contre le BVDV chez le bovin, l'équipe du laboratoire du Dr Elhazary a été la première à démontrer la possibilité d'induire une certaine protection immunitaire contre le virus suite à l'injection intramusculaire d'ADN codant pour la glycoprotéine E2. Elle a cependant indiqué que le vaccin ne permettait qu'une protection immunitaire partielle (signes atténués de la maladie et période de signes cliniques plus courte) suite au challenge et qu'une quantité considérable d'ADN était nécessaire (3 inoculations de 1.0 mg/veau).

Malgré leur relative efficacité chez les grands animaux et l'homme, l'engouement pour les vaccins à ADN s'est poursuivi à cause de leurs nombreux avantages comparativement aux vaccins conventionnels. Leur principal avantage est de permettre une synthèse endogène de l'antigène assurant les processus de glycosylation et de modifications post-traductionnelles similaires à ceux subis par la protéine au cours d'une infection virale. Les vaccins à ADN ont aussi le grand avantage de permettre l'induction d'une immunité humorale et cellulaire. De plus, au niveau de la commercialisation, les vaccins à ADN sont très intéressants pour leur facilité et leur faible coût de production et de purification, leur stabilité, leur standardisation et leur entreposage.

De nombreuses approches innovatrices ont été investiguées pour augmenter l'efficacité des vaccins à ADN, entre autres: l'utilisation de moyens mécaniques (gene gun et électroporation), l'optimisation des séquences codantes et des composantes du vecteur d'expression eucaryote, l'adjonction de molécules immunostimulantes etc... Une part importante du succès des vaccins à ADN et de la thérapie génique provient du développement des molécules de transport aussi nommées, systèmes de livraison. Les stratégies d'optimisation des vaccins à ADN indiquent des résultats fort encourageants laissant briller l'espoir de l'utilisation de cette technologie pour contrer différents pathogènes chez l'humain et les grands animaux.

II. Recension de la littérature

1. Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et la pathologie associée

1.1. Le BVDV

Les symptômes associés à la diarrhée virale bovine ont été décrits pour la première fois en 1946 mais ce n'est que dix ans plus tard que l'agent pathogène responsable des symptômes a été identifié comme étant un virus ^{1,2}. Le BVDV a une distribution mondiale avec une prévalence d'anticorps sériques de 60% à 90% chez le bovin ³. Le virus de la diarrhée virale bovine est économiquement une des maladies les plus importantes chez le bovin. Les statistiques américaines indiquent que les pertes économiques annuelles associées au BVDV sont de \$7 milliards, soit 20 à 57\$ par animal/an selon la virulence de la souche.

1.1.1. Classification

Le BVDV est un petit virus enveloppé d'un diamètre de 40-60 nm (Figure 1) de la famille *Flaviviridae* du genre *Pestivirus* ⁴. Le genre *Pestivirus* regroupe aussi le virus de la maladie des frontières (BDV) et le virus de la peste porcine classique (CSFV). Le CSFV infecte seulement le porc, tandis que le BVDV et le BDV ont été isolés dans plusieurs espèces telles que le bovin, le porc, le mouton, le cerf et la girafe ⁵. Les souches de BVDV démontrent une hétérogénéité prononcée exprimée par différents phénotypes (biotype et virulence) et deux génotypes distincts. Les deux génotypes du BVDV sont: le génotype I et le génotype II ⁶, eux-mêmes divisés en deux sous génotypes (Ia et Ib, IIa et IIb) ^{7,8,9}.

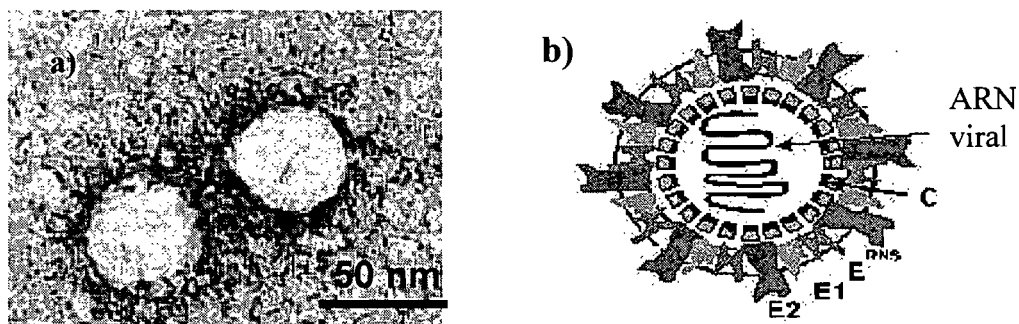


Figure 1. Le virus de la diarrhée virale bovine. a) Microscopie à transmission du virus du BVDV. b) Représentation schématique de l'arrangement des protéines structurales dans un virion du BVDV.

Aux États-Unis, les deux génotypes sont présentes de façon égale ¹⁰. En Amérique du Nord, les souches appartenant aux sous génotypes Ib et IIa sont les plus répandues alors que l'isolement de souches appartenant aux sous génotypes Ia et IIb est un évènement rare. Des différences géniques et antigéniques importantes existent entre les souches de BVDV I et II ⁶. Entre autres, des distinctions considérables sont rapportées au niveau de la structure secondaire de la région 5' non traduite et de la séquence en acides aminées ^{6, 9, 11}. Le plus haut niveau de variabilité génique et antigénique est observé au niveau de la séquence de la glycoprotéine de l'enveloppe virale E2 ¹². L'homologie de séquence en nucléotides entre les génotypes est de 60-65% (Figure 2). Cette différence a un impact au niveau de l'efficacité de neutralisation des souches BVDV II par des antisérums BVDV I spécifiques et vice-versa et explique pourquoi la majorité des anticorps protecteurs produits suite à une infection par une souche du génotype I sont très peu efficaces pour neutraliser des souches du génotype II ^{6, 13}.

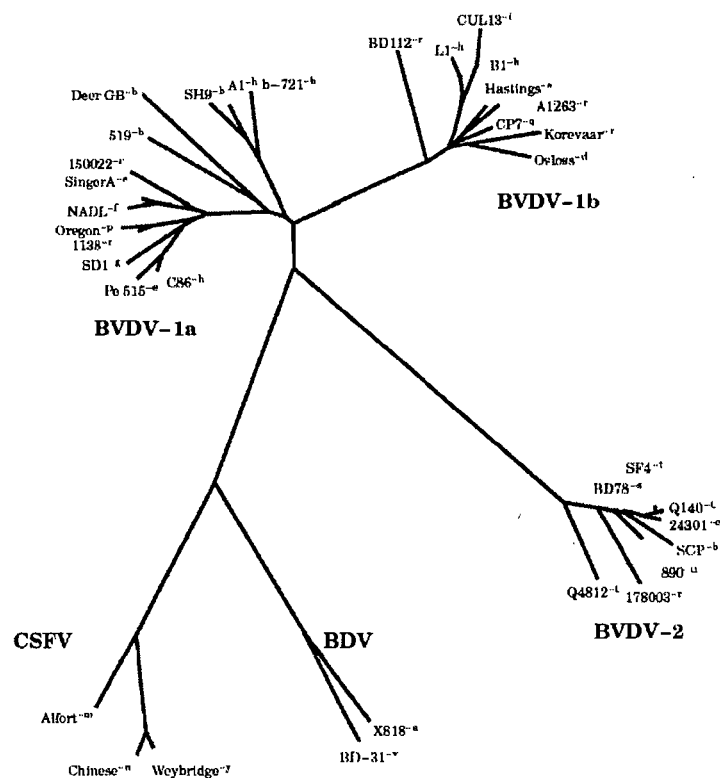


Figure 2. Comparaison de séquences de 36 fragments codant pour la protéine E2 par la méthode de "Maximum Likelihood"¹⁸. Les longueurs des branches sont proportionnelles à la différence entre les souches.

Pour chacun des génotypes, il existe des biotypes cytopathogènes et non cytopathogènes qui sont déterminés suivant leurs effets en culture cellulaire ¹⁴. *In vitro*, les virus cytopathogènes causent la vacuolisation cytoplasmique et la mort des cellules infectées alors que le biotype non cytopathogène n'induit aucun effet apparent sur les cellules. Le biotype cytopathogène est généralement isolé chez les animaux souffrant de la maladie des muqueuses et son apparition chez les PI pourrait par des mutations d'une souche non cytopathogène. Soulignons que le biotype cytopathogène n'est pas relié à la virulence de la souche puisque les virus les plus virulents appartiennent au biotype non cytopathogène ¹⁵. *In vivo*, la différence majeure au niveau des biotypes est que seul le biotype non cytopathogène peut établir des infections persistantes chez les animaux lors d'une infection intra-utérine. Les infections persistantes sont caractérisées par une immunotolérance spécifique à la souche infectieuse. Les souches non cytopathogènes causeraient une immunosuppression chez l'animal infecté par l'inhibition des fonctions de son système immunitaire inné (production d'interféron) permettant ainsi le développement d'une immunotolérance et d'une infection persistante ^{16,17}.

1.1.2. Génome et protéines virales

Le génome viral est composé d'un ARN simple brin de polarité positive d'approximativement 12.5 kilo base (kb). La région 5' non traduite (composée ≈ 300 nucléotides) ne possède pas de coiffe 5' mais forme un élément hautement structuré servant de site interne d'entrée des ribosomes. L'ARN viral contient un seul cadre de lecture ouvert codant pour une polyprotéine de 4000 acides aminés. L'ordre des protéines après clivages co- et post-traductionnels par des protéases d'origine virale ou cellulaire est : NH₂-p20-p14-gp48-gp25-gp53-p125(p54/80)-p10-p30-p133(p58/p75)-COOH ¹⁹.

La partie N-terminale code pour p20 (Npro) qui a une activité de protéase et autoprotéolytique responsable du clivage entre p20 et p14 et de celui des quatre protéines structurales : p14 (C), gp48 (E^{ms}), gp25 (E1) et gp53 (E2). La protéine p14 (C) constitue la nucléocapside virale. Il s'agit d'une protéine hautement basique, riche en résidus lysine, avec une charge nette positive permettant des interactions essentielles avec l'ARN viral lors du processus d'encapsulation. gp48 (E^{ms}), gp25 (E1) et gp53 (E2) sont les trois glycoprotéines de l'enveloppe virale (Figure 1 b). E^{ms} contient 7-9 sites de N-glycosylation,

elle est soit associée à l'enveloppe virale de façon non covalente, soit présente à l'état libre dans l'environnement extracellulaire. E^{ms} possède une activité RNase. E1 possède 2 à 3 sites de N-glycosylation, est ancrée dans l'enveloppe virale par un domaine hydrophobe présent en C-terminal et serait à peine accessible à la surface externe de l'enveloppe virale²⁰. E2 est la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale. Elle est composée d'environ 370 acides aminés (~ 41 kilo Dalton (kDa)) et contient 4 sites de N-glycosylation lui conférant une masse de ~ 53 kDa²¹. Les glycoprotéines membranaires forment des complexes liés par des ponts disulfures ; E^{ms} forme un homodimère (100 kDa), E1 forme un hétérodimère avec E2 (75 kDa), et E2 forme aussi un homodimère (100 kDa). Au niveau du virion, les formes monomériques et dimériques de E2 sont présentes²².

La partie C-terminale de la polyprotéine contient les protéines non structurales. p125 est impliquée dans le "processing" des protéines non structurales et la réplication virale. Elle possède deux domaines responsables d'activités distinctes. Le domaine situé en N-terminal est responsable de l'activité sérine-protéase impliquée au niveau du clivage des protéines non structurales alors que le domaine C-terminal est relié à l'activité hélicase impliquée dans le déroulement du duplex d'ARN lors de la réplication^{23, 24}. Dans certains cas, p125 peut être le précurseur de p54/p41 et p80. La fonction de p54/p41 est inconnue alors que la génération de p80 est reliée au phénotype cytopathogène. L'induction de l'expression de p80 peut avoir lieu suite à une insertion, une délétion, un réarrangement ou une mutation du génome d'une souche non cytopathogène. La protéine p125 est suivie par les protéines p10 et p30 dont les fonctions dans la réplication virale sont peu connues. La protéine p133 est le précurseur des protéines p58 et p75. p75 serait l'ARN polymérase ARN-dépendante virale.

1.1.3. Mécanisme d'infection

La transmission du virus d'un animal à l'autre a lieu principalement par contacts oro-nasaux. Neuf heures après l'infection, le virus se réplique déjà dans les cellules épithéliales de la muqueuse nasale et des amygdales. Par la suite, le virus atteint les tissus lymphoïdes et le thymus. La phagocytose du virus par les cellules mononucléaires permet sa dissémination et sa rétention dans les tissus lymphoïdes alors que le transport sanguin

permet la dissémination systémique du virus et l'infection du tractus gastro-intestinal (rate, jéjunum et Plaques de Peyer) ²⁵.

1.1.3.1. Entrée du virus dans la cellule

Les mécanismes cellulaires permettant la liaison et l'entrée du BVDV dans les cellules sont peu connus. Les glycoprotéines de l'enveloppe virale seraient impliquées dans le tropisme cellulaire, l'attachement à un récepteur cellulaire spécifique, à la fusion avec la membrane cellulaire, à la pénétration et l'emplacement du bourgeonnement viral ²⁶. La liaison du BVDV aux cellules cibles implique des interactions entre les glycoprotéines virales E^{ms} et E2 ^{27, 28} et les glycosaminoglycans et les protéines membranaires de la cellule infectée, respectivement ²⁹⁻³¹. L'hétérodimère E1–E2 plutôt que l'homodimère E2–E2 serait responsable de l'entrée du virus ³². Étant donné la similarité avec les Flavivirus, il est supposé que les *Pestivirus* entrent dans la cellule hôte par un mécanisme d'endocytose spécifique de type clathrine-dépendente ³³. Suite à l'internalisation, l'environnement acide de l'endosome permettrait la fusion de l'enveloppe virale à la membrane endosomale pour la libération du virion dans le cytoplasme ^{34, 35}.

Bien que les composantes spécifiques impliquées dans l'entrée du virus dans les cellules ne soient pas clairement élucidées, plusieurs structures protéiques à la surface des cellules bovines ont été proposées comme étant un récepteur cellulaire potentiel pour les *Pestivirus* : une protéine de 50 kDa ^{31, 36}, des protéines de 60 et 93 kDa ³⁰ ainsi que récemment, le récepteur CD46 retrouvé à la surface de toutes les cellules nucléées. Soulignons que CD46 était reconnu depuis longtemps pour son rôle de cofacteur pour la sérine protéase responsable du clivage des facteurs C3b et C4b du complément ^{35, 37}. De plus, le récepteur LDL (low-density lipoprotein) serait impliqué dans l'entrée du virus puisque l'infection *in vitro* de cellules MDBK (Madin-Darby bovine kidney) avec le BVDV est inhibée par la présence d'anticorps dirigés contre ce récepteur ³⁴.

1.1.3.2. Traduction et réplication

Les protéines virales sont produites dans le cytoplasme par la combinaison de clivages co- et post- traductionnels par des protéases cellulaires ou virales. La réplication de l'ARN viral par les protéines non structurales virales est rendue possible grâce à la synthèse d'un ARN intermédiaire de polarité négative. Les étapes suivantes du cycle de réplication virale sont peu connues. Cependant, l'absence des glycoprotéines virales à la surface de la membrane cellulaire de la cellule infectée suggère que la maturation et l'assemblage du virion se produisent par bourgeonnement dans des vésicules cytoplasmiques³⁸. Finalement, la voie normale de sécrétion de l'hôte serait utilisée, les vésicules fusionneraient avec la membrane plasmique et seraient relâchées dans le milieu extracellulaire par exocytose.

1.2. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques associées à une infection par le BVDV sont diverses allant d'infections sub-cliniques jusqu'à une forme mortelle (la maladie des muqueuses). La majorité des infections au BVDV chez un animal immunocompétent adulte sont sub-cliniques. Les signes cliniques de la diarrhée virale bovine sont généralement observés chez des animaux dont l'âge varie de six mois à deux ans. L'animal peut montrer de la diarrhée, une fièvre transitoire, des écoulements oculo-nasaux, de l'anorexie, une leucopénie, une diminution de la production de lait ainsi qu'une période d'immunosuppression. La multiplication et la réplication du virus dans les lymphocytes B et T, les cellules polymorphonucléaires et les neutrophiles affectent fortement le développement de la réponse immunitaire et expliquent la leucopénie et l'immunosuppression passagères observées lors d'une infection par le BVDV. Dans ce type d'infection, la morbidité est élevée mais le taux de mortalité est faible.

Une forme aiguë de la maladie [le syndrome hémorragique] de la diarrhée virale bovine chez l'animal adulte a été rapportée suite à une épidémie catastrophique en Amérique du Nord au début des années 90. Des signes cliniques sévères tels que des hémorragies ecchymotiques des muqueuses, des diarrhées liquides profuses et de hauts taux de mortalité avaient été rapportés. À cette époque, l'analyse des souches responsables de cette forme sévère a permis de classer les souches responsable de cette forme aiguë sous un

nouveau génotype, le génotype II ⁶. Il est important de noter que ce n'est pas toutes les souches appartenant au génotype II qui sont associées au syndrome hémorragique.

Chez une vache gestante séronégative, une infection au BVDV peut conduire à l'infection intra-utérine du fœtus. L'impact de cette infection dépend de l'âge du fœtus (Figure 3) et de la souche infectieuse. Seuls les virus du biotype non cytopathogène semblent être capables d'envahir le placenta, de se répliquer et d'infecter le fœtus ³⁹. Durant le premier trimestre de gestation [avant le développement de l'immunocompétence du fœtus], la réplication du virus dans le fœtus peut causer selon le stade de l'organogenèse : la mort de l'embryon, l'avortement, des effets tératogènes non fatals ou la naissance d'animaux immunotolérants infectés de façon persistante (PI). L'immunotolérance des PI semble être spécifique à la souche infectieuse et n'empêche pas le développement d'une réponse immunitaire contre d'autres souches de BVDV ⁴⁰. Ils représentent une source élevée de dissémination du virus au sein du troupeau en excréant une grande quantité de virus dans leur environnement alors qu'ils ne présentent généralement aucun signe clinique. Si les PI âgés de 6 mois à 2 ans sont exposés au courant de leur vie à une souche de biotype cytopathogène, ils peuvent développer la maladie des muqueuses. La maladie des muqueuses est caractérisée par des signes cliniques tels que : anorexie, diarrhée profuse sanguinolente et déshydratation. La morbidité est faible mais le taux de mortalité est très élevé et d'autant plus si les deux souches présentes chez l'animal [cytopathogène et non cytopathogène] ont une forte homologie ⁴¹.

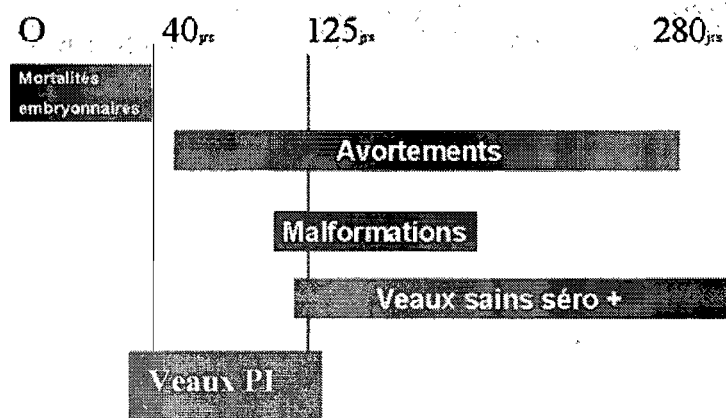


Figure 3. Effets sur le fœtus lors de l'infection de la mère par un virus du BVD non cytopathogène en fonction du stade de gestation de la vache.

1.3. Réponse immunitaire induite suite à une infection par le BVDV

Les infections expérimentales permettent d'étudier l'effet d'un virus sur les paramètres cliniques, hématologiques et immunologiques de l'animal infecté. Elles ont démontré que le BVDV cause une diminution significative des leucocytes (neutrophiles, lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ et monocytes) du sang à partir du jour 3 ou 5 post-infection ainsi qu'une baisse significative du nombre de plaquettes sanguines en circulation à partir et au-delà du jour 10 post-infection ⁴². Les résultats immunologiques démontrent qu'il faut compter environ trois semaines avant l'apparition d'une réponse humorale spécifique. La lenteur de l'induction des anticorps est expliquée par l'effet immunosuppresseur du virus et par l'absence de virémie durant les 3-10 jours après l'infection. Par la suite, le titre d'anticorps augmente pour les dix à douze semaines suivantes pour atteindre un plateau et redescendre graduellement ⁴³. Le titre en anticorps persiste durant plusieurs années, probablement pour la vie complète de l'animal et explique la protection de l'animal contre les réinfections. La réponse immunitaire à médiation cellulaire impliquée dans la protection contre le BVDV est plus difficile à évaluer. Actuellement, peu de renseignements sont disponibles sur le rôle des lymphocytes T impliqués dans la résolution de l'infection. Il a été démontré que l'absence des cellules CD4⁺ augmente la durée de la virémie ⁴⁴ alors que l'absence des cellules T CD8⁺ chez le bovin n'a aucun effet au niveau de la réponse immunitaire suite à l'infection. Une étude d'immunisation par ADN a démontré que seuls les animaux pour lesquels une prolifération lymphocytaire est observable avant le challenge développent des signes atténués de la maladie et une période de signes cliniques plus courte suite au challenge ⁴⁵.

1.3.1. Rôle immunologique des protéines virales

Une infection chez le bovin par une souche de BVDV génère la production d'anticorps spécifiques dirigés contre gp53, gp48 et p125 (et/ou p80) ⁴⁶. Une faible quantité d'immunoglobuline G (IgG) spécifiques à gp25 est quelque fois induite chez une petite proportion des individus infectés ⁴⁷. Les anticorps neutralisants directement impliqués dans la protection sont principalement dirigés contre la glycoprotéine de l'enveloppe virale E2 ^{44, 47, 49} et aussi contre la glycoprotéine gp48 (E^{ms}) ⁴⁸.

1.3.1.1. La glycoprotéine E2 (E2)

La protection contre le BVDV est étroitement corrélée à l'induction d'anticorps neutralisants dirigés contre la glycoprotéine de l'enveloppe E2 ^{44, 47, 49}. À l'intérieur d'un même génotype, la variabilité des séquences de E2 est relativement faible. Par exemple, une homologie d'environ de 90% est observée au niveau de la séquence de E2 des différentes souches appartenant au génotype II ⁵⁰. Cependant, une variabilité génétique et antigénique importante existe au niveau de la séquence de la protéine E2 entre les génotypes. Cette variabilité a un impact considérable au niveau de la protection croisée entre des souches appartenant à des génotypes différents, les titres d'anticorps neutralisants sont de 15 à 80 fois plus bas vis-à-vis une souche hétérologue ⁹.

Dans l'objectif de déterminer la structure antigénique de la protéine E2 et les épitopes spécifiques et neutralisants, des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine E2 ont été utilisés. Des différences importantes au niveau des épitopes spécifiques et neutralisants ont été rapportées entre les génotypes ⁵⁰⁻⁵². Dans le cas du génotype I, les épitopes neutralisants sont très peu conservés entre les souches et l'analyse des séquences de virus mutants échappant à la neutralisation indique que les acides aminés situés à la position 71-74 sont essentiels à la neutralisation virale des souches du génotype I ⁵¹. Dans le cas du génotype II, les épitopes neutralisants sont hautement conservés entre les souches et sont situés dans 3 domaines antigéniques totalement différents ⁵⁰.

À cause du rôle important de la protéine E2 au niveau de la protection immunitaire contre le BVDV, elle est le candidat de choix pour la mise au point de vaccins sous-unitaires et de vaccins à ADN [virus recombinant et vecteur d'expression eucaryote]. Plusieurs travaux portant sur des vaccins sous-unitaires composés de protéines E2 recombinantes du BVDV I et sur des vecteurs d'expression eucaryote codant pour la protéine E2 du BVDV I démontrent que l'utilisation de E2 permet une protection partielle contre un challenge avec des souches hétérologues ^{53, 45, 54}. La protection partielle serait expliquée par la forte variabilité antigénique des anticorps neutralisants.

1.3.1.2. La protéine de la nucléocapside

La protéine de la capsid virale possède une séquence hautement conservée entre les géotypes de BVDV. Bien que p14 ne semble pas être impliquée dans la protection humorale contre le BVDV (puisque les sérums d'animaux convalescents ne contiennent aucun anticorps p14-spécifique ou neutralisant), une immunisation expérimentale avec un adénovirus recombinant contenant la séquence codante de p14 a démontré des résultats potentiels chez la souris. L'expression endogène de p14 chez les sujets inoculés semble permettre l'induction d'anticorps spécifiques non neutralisants ainsi qu'une réponse cellulaire spécifique contre des souches homologues et hétérologues de BVDV ⁵⁵.

1.3.1.3. La protéine non-structurale p125 (p54/80)

Dans le cas de p125, une homologie de 90% au niveau de la séquence en acides aminés existe entre les deux géotypes ¹¹. Il a été démontré que lorsque exposés à un virus répliatif du BVDV, les bovins développent une forte concentration d'anticorps spécifiques non neutralisants contre la protéine p125 des souches non cytopathogènes et contre p125 et p80 des souches cytopathogènes ^{56, 57}. Toutefois, l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le BVDV par les vaccins inactivés (n'incluant pas la production d'anticorps p125 (p54/80) spécifiques produit seulement chez les virus répliatifs) suggère que p125 n'est pas essentielle pour la protection contre le BVDV ⁵⁸. Malgré cette dernière observation, la protéine non-structurale p125 a été étudiée pour la mise au point d'un vaccin capable de protéger l'animal contre des souches hétérologues. Une vaccination expérimentale chez le bovin avec un vecteur d'expression eucaryote codant pour la protéine p125 (p54/80) a permis de démontrer l'induction d'une réponse immunitaire protectrice suite à un challenge avec une souche hétérologue ⁵⁹. Selon cette étude, le niveau de protection induit par ce vaccin est similaire à celui rapporté pour des constructions plasmidiques codant pour le gène E2 ⁵⁹. Bien que les mécanismes immunitaires impliqués dans l'induction de la protection contre le BVDV ne soient pas clairs, les résultats préliminaires soulignent le potentiel de p125 pour de futurs vaccins protecteurs contre des souches hétérologues de BVDV.

1.4. Traitement et contrôle des infections au BVDV

1.4.1. Programme d'éradication

L'impact du BVDV dans l'industrie bovine a été accentué au milieu des années 90 par la mise en place de programmes d'éradication dans plusieurs pays scandinaves européens dont la Suède, la Norvège, la Finlande et le Danemark ^{60, 61}. Les programmes d'éradication sont possibles dans des régions où la densité bovine est relativement faible et où la vaccination n'est pas une pratique courante pour le contrôle du virus. Ces programmes sont basés sur une politique de non-vaccination pour permettre la détection indirecte des infections par le BVDV. Les animaux testés positifs pour la présence d'anticorps sont des indicateurs d'une infection. Les programmes d'éradication sont fondés sur la prévention des infections intra-utérines par l'identification et l'élimination des PI, sur le contrôle des embryons et des semences importés et sur une augmentation de la biosécurité du troupeau par l'éleveur ⁶². Environ une décennie après la mise en place de tels programmes, les statistiques indiquent que 96.3% des troupeaux suédois sont exempts de BVDV, comparativement à la prévalence initiale estimée à 40%.

1.4.2. Vaccination

Dans les régions où la densité bovine est importante et le commerce d'animaux intense, la prévalence des animaux séropositifs et des PI est habituellement très élevée. Parallèlement aux programmes d'éradication, l'"Academy of Veterinary Consultants" a réclamé l'adoption de mesures de contrôle basées sur la vaccination systématique des animaux pour contrôler et minimiser la circulation du virus ⁶³. La vaccination réduit l'incidence des PI par la protection fœtale des vaches gestantes pouvant être exposées au virus. Présentement, les vaccins disponibles dans le commerce contre le BVDV sont de types inactivé ou atténué. Ils sont principalement efficaces pour améliorer la santé du troupeau et empêcher la forme clinique de la maladie. Bien qu'ils confèrent un niveau de protection immunitaire raisonnable contre le BVDV, il reste beaucoup d'amélioration à faire pour fournir une protection adéquate. Premièrement, leur spectre de protection vis-à-vis des variants antigéniques (génotype I et II) est relativement étroit ^{64, 65}. De plus, les vaccins atténués sont un danger potentiel d'infections prénatales lors de la vaccination d'une vache gestante : ils occasionnent des interférences avec les anticorps maternels lors

de la vaccination d'un nouveau-né et ils peuvent aussi induire une immunosuppression transitoire. Les vaccins inactivés sont beaucoup plus sécuritaires, mais ils induisent une courte période de protection et interfèrent aussi avec les anticorps maternels.

De nouvelles stratégies de vaccination sont à l'étude pour contrer les désavantages des vaccins traditionnels. L'efficacité d'un vaccin en deux étapes basé sur l'utilisation d'un vaccin inactivé et sur l'administration subséquente (4 semaines plus tard) d'un vaccin atténué ⁶⁶ a été démontrée. Ce vaccin permet l'induction d'une protection immunitaire de longue durée de même que la prévention de l'infection fœtale suite au challenge avec des souches homologues et hétérologues chez des vaches gestantes vaccinées. De plus, plusieurs groupes de recherche travaillent sur la mise au point de vaccins sous-unitaires ou à ADN pour contrer les infections par le BVDV. Les vaccins sous-unitaires sont sécuritaires mais ils doivent être utilisés en formulation avec un adjuvant puisqu'ils sont peu immunogènes comparativement aux vaccins vivants et atténués. Les vaccins à ADN sont intéressants puisqu'ils ne causent ni d'infection prénatale lors de la vaccination d'une vache gestante, ni d'interférence avec les anticorps maternels lors de la vaccination d'un nouveau-né, ni d'immunosuppression transitoire. De plus, ils ont la particularité de permettre l'induction d'une immunité humorale et cellulaire importantes dans la protection contre le BVDV ⁶⁷⁻⁷⁰.

2. Les vaccins à ADN

La première étape dans la mise au point d'un vaccin efficace contre un pathogène débute par la compréhension de la réponse immunitaire nécessaire pour induire la protection. Pour la majorité des infections bactériennes, la protection primaire est induite par la production d'anticorps spécifiques alors que pour les infections intracellulaires virales, bactériennes ou parasitaires, telle que *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major* et d'autres parasites, la protection nécessite une immunité cellulaire. Pour les virus, les parasites et les bactéries intracellulaires, la réponse immunitaire cellulaire est nécessaire pour induire une protection adéquate.

L'utilisation de vecteurs viraux ou des vecteurs d'expression eucaryote est une stratégie de vaccination sous investigation intensive dans plusieurs laboratoires du monde entier. Ces vecteurs impliquent l'expression endogène de l'antigène par les cellules de l'hôte permettant que les processus de glycosylation et de modifications post-traductionnelles soient les mêmes que ceux subis par la protéine virale lors d'une infection naturelle.

2.1. Choix de l'antigène lors de l'élaboration d'un vaccin

L'analyse des protéines ciblées par la réponse immunitaire naturelle suite à l'infection par le pathogène permet la sélection de l'antigène. Par exemple, des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) possèdent des anticorps neutralisants dirigés contre la glycoprotéine de l'enveloppe virale *env* et des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) reconnaissant spécifiquement des épitopes de la protéine structurale *gag*. Par conséquent, de nombreux vaccins expérimentaux à ADN contre le VIH contiennent les séquences codantes de *env* ou/et de *gag*.^{71,72,73}

Un avantage important des vaccins à ADN est qu'il est possible d'intégrer plusieurs gènes dans un même vecteur ou d'administrer un mélange de plusieurs gènes (vaccin multivalent). Ainsi, au lieu de présenter un seul antigène au système immunitaire, plusieurs séquences codantes différentes peuvent être sélectionnées pour l'induction d'une réponse immunitaire se rapprochant de celle développée suite à une infection naturelle. Il s'agit d'une approche intéressante pour élargir le spectre de protection contre un pathogène présentant des variations antigéniques importantes; des versions multiples du même gène ainsi que pour induire une protection contre une combinaison de gènes, contre différentes souches microbiennes ou contre différents stades du cycle de vie du pathogène. Par exemple, une étude récente a démontré l'efficacité d'un vaccin à ADN composé de quatre vecteurs d'expression eucaryote différents, pour l'induction d'une protection contre l'influenza, le virus respiratoire syncytial et le virus de l'herpes simplex 1⁷⁴. L'utilisation d'un seul plasmide multi-promoteurs permettant l'expression de plusieurs gènes semble être une stratégie d'immunisation plus efficace que la co-injection d'une combinaison de plasmides^{75,76}.

2.2. Choix du vecteur d'expression

2.2.1. Les vecteurs d'expression d'origine virale

La méthode de fabrication des vecteurs viraux consiste au remplacement dans le génome viral d'un gène par le transgène d'intérêt. Le transgène peut alors être exprimé de façon endogène par les mécanismes cellulaires naturellement utilisés par le virus suite à l'infection. Ces systèmes ont les avantages de permettre : i) la protection de l'ADN dans le milieu extra- et intra-cellulaire, (ii) un haut niveau d'internalisation dans les cellules, (iii) la libération de l'endosome suite à l'endocytose, (iv) la localisation nucléaire (v) et une rapide transcription du matériel inséré dans le génome viral.

Les vecteurs viraux les plus utilisés dans les études de vaccinations expérimentales sont les rétrovirus, le virus de l'herpes simplex, les poxvirus et les adénovirus ⁷⁷. Des gènes de plusieurs pathogènes humains et animaux tels que le virus de l'herpes simplex (VHS), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus du papillome humain (VPH), le virus de la rougeole, le VIH, le virus d'immunodéficience simien (VIS), et le virus de la rage ont été efficacement exprimés par ce type de système ⁷⁸. Deux démonstrations très prometteuses proviennent d'études indiquant l'induction d'une résistance contre le virus Ebola et le VIH suite à une immunisation de primates avec des vecteurs viraux codant pour la glycoprotéine Z de l'enveloppe virale ou la protéine *gag*, respectivement ^{79, 80}.

Cependant, certains dangers potentiels sont liés à l'utilisation des vecteurs viraux tels que la possibilité de recombinaison et retour de virulence, des effets oncogéniques, de la mutagenèse insertionnelle et le développement d'une réponse immunitaire contre le vecteur lui-même suite à des inoculations répétées. De plus, les vecteurs viraux sont limitants au niveau de la quantité totale de matériel génomique que l'on peut y introduire ⁸¹.

2.2.2. Les vecteurs d'expression eucaryote

L'engouement entourant l'expression endogène d'une protéine codée dans un vecteur d'expression eucaryote découle de travaux effectués au début des années 1990. Il avait été démontré pour la première fois que l'injection intramusculaire chez la souris d'un vecteur d'expression eucaryote codant pour un gène rapporteur, permettait le transfert du gène, la transcription au noyau et la synthèse de la protéine recombinante par les cellules musculaires. Des études subséquentes ont démontré que les cellules du coeur, du foie, de la peau et de la thyroïde peuvent être transfectées par l'injection directe d'ADN plasmidique⁸²⁻⁸⁵. Par la suite, l'efficacité des vecteurs d'expression eucaryote pour l'induction d'une réponse immunitaire a été démontrée. L'injection d'ADN plasmidique [codant le gène de l'hormone de croissance humaine (HGH)] permet l'induction d'anticorps spécifiques chez la souris.

2.2.2.1. Les composantes

Un vecteur d'expression eucaryote est composé du gène d'intérêt cloné dans un plasmide bactérien modifié pour une expression optimale dans les cellules eucaryotes. Le plasmide contient essentiellement une origine de répllication active dans *E.coli*, un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection des bactéries transformées, un promoteur pour une forte expression de l'antigène dans les cellules de mammifères ainsi que des séquences de polyadénylation pour la stabilisation des transcrits d'ARN messenger (ARNm) et pour la stimulation de l'expression autant *in vivo* qu'*in vitro*⁸⁶.

2.2.2.2. Efficacité immunologique

Depuis la dernière décennie, plus de 1000 publications rapportent l'habilité des vecteurs d'expression eucaryote à induire une réponse immunitaire, entre autre, contre la malaria, la tuberculose, le virus de la rage, le VHB, le VHS, le virus Ebola et le VIH^{87, 88}. L'efficacité des vaccins à ADN pour l'induction d'une protection immunitaire a principalement été démontrée chez les animaux de laboratoire et les primates. Ces études démontrent que l'expression endogène d'un antigène permet la présentation des épitopes antigéniques par les complexes majeur d'histocompatibilité (CMH) I et II des cellules et explique l'efficacité et la particularité des vaccins à ADN de stimuler autant une réponse

immunitaire humorale que cellulaire. Par contre, très peu de résultats concluants ont été rapportés chez les grands animaux et les humains⁸⁹⁻⁹¹.

Actuellement, aucun vaccin à ADN n'est disponible sur le marché. Cependant, trois vaccins à ADN doivent bientôt faire leur apparition. Un vaccin à ADN efficace chez les chevaux contre le virus du Nil risque d'être le premier vaccin à ADN sur le marché⁹². Les deux autres vaccins à ADN ont déjà reçu une licence d'évaluation de commercialisation de la "National Institutes of Health" (NIH). Il s'agit de vaccins à ADN humains dirigés contre le virus Ebola [Vical Incorporated] ou contre le VIH [National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)].

2.3. Méthodes d'inoculation des vecteurs d'expression eucaryote

2.3.1. Méthodes traditionnelles

L'injection intramusculaire ou intradermique d'une solution saline contenant l'ADN plasmidique est la méthode d'inoculation la plus utilisée⁹³. La majorité des cellules transfectées au site d'inoculation par cette méthode sont les myocytes lors d'une inoculation intramusculaire ou les kératinocytes et les fibroblastes lors d'une inoculation intradermique. Les quelques cellules présentatrices d'antigènes (APCs) présentes au site d'injection peuvent aussi être transfectées lors de l'injection.

2.3.2. Méthodes mécaniques

2.3.2.1. L'électroporation

L'électroporation est utilisée *in vivo* pour permettre la diffusion et l'internalisation des plasmides dans les cellules du tissu ciblé⁹⁴. Cette technique est très efficace pour le transfert de gènes dans le muscle^{95, 96}, la peau⁹⁷, les poumons⁹⁸, la cornée⁹⁹ et le foie^{99, 100}. L'efficacité de l'électroporation est expliquée par l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire en créant plusieurs pores temporaires (d'une taille de 1 à 120 nm) et par une meilleure distribution du plasmide dans le tissu inoculé¹⁰¹. L'effet adjuvant de l'électroporation pourrait aussi s'expliquer par la production de cytokines pro-inflammatoires qu'elle déclenche au site d'inoculation¹⁰². De plus, il a été démontré que l'électroporation au site d'inoculation suite à l'injection intramusculaire d'ADN permet

d'augmenter la stabilité, la durée et le niveau d'expression du transgène, comparativement à l'injection intramusculaire seule. L'augmentation de l'expression du gène par l'électroporation a un impact important au niveau de la réponse immunitaire. L'électroporation permet (avec des doses d'ADN beaucoup plus petites) l'induction d'une réponse immunitaire de 10–100-fois supérieure à celle induite par l'administration d'un plasmide seul¹⁰²⁻¹⁰⁴ et permet de diminuer les variations interindividuelles de la réponse immunitaire normalement observées après l'injection intramusculaire d'ADN chez un groupe d'animaux^{105, 106}.

2.3.2.2. Le "gene gun"

Le "gene gun", initialement utilisé pour le transfert de gènes chez les plantes, a été adapté pour l'utilisation chez les animaux. L'ADN est recouvert de microparticules d'or (d'une taille de 1 µm) et est bombardé directement dans le cytoplasme des cellules du tissu visé, en utilisant de l'hélium¹⁰⁷. La peau (derme et épiderme), le foie, les muscles et le pancréas ont été efficacement transfectés par cette technique¹⁰⁸⁻¹¹¹. Le "gene gun", permet d'utiliser des quantités beaucoup moindres d'ADN pour induire une réponse immunitaire relativement comparable à celle induite par l'inoculation à l'aiguille. Seulement quelques nanogrammes par immunisation sont nécessaires lors de l'utilisation du "gene gun", comparativement à 50-100 µg d'ADN lors d'une injection traditionnelle¹⁰⁹⁻¹¹¹.

L'immunisation au "gene gun" permet généralement l'induction d'une réponse immunitaire préférentiellement de type T auxiliaires (T_{aux2}), comparativement à l'inoculation intramusculaire ou intradermique avec ou sans électroporation^{110, 112, 113, 114-116}. L'induction préférentielle d'une réponse de type T_{aux2} serait expliquée par le fait que la faible quantité d'ADN utilisée ne contient et ne présente pas suffisamment de motifs CpG responsables de l'induction de la réponse T_{aux1} et/ou que la livraison de l'ADN directement dans le cytosol cellulaire ne permet tout simplement pas la présentation des motifs CpG (Se référer à la section 2.4.1.)¹¹⁷.

En dépit de l'utilisation répandue du "gene gun" dans les systèmes expérimentaux, plusieurs inconvénients limitent son utilisation. Premièrement, une quantité limitée de plasmide (~1 µg) peut être administrée à la fois. Deuxièmement, la préparation des

particules d'or recouvertes d'ADN comporte de nombreux problèmes tels que l'instabilité des complexes particules d'or/ADN, la difficulté d'adhésion de l'ADN aux particules d'or, la modification de la structure de l'ADN et l'entreposage. De plus, bien que l'efficacité de l'utilisation du "gene gun" soit rapportée chez la souris; peu de résultats pertinents ont été rapportés chez les grands animaux ^{118,119-121}. Chez ces derniers, l'épaisseur de la peau limite les endroits où ce type d'inoculation peut avoir lieu. Par exemple, les meilleurs résultats chez le bovin sont obtenus lorsque l'inoculation a lieu à la surface des muqueuses de la vulve ¹²².

2.4. Réponse immunitaire à la vaccination par ADN

Les vaccins à ADN induisent une réponse cellulaire autant qu'une réponse humorale puisque l'expression endogène de l'antigène par les cellules transfectées permet une présentation simultanée de l'antigène sur les CMH I et les CMH II. La réponse immunitaire induite par un vaccin à ADN est généralement proportionnelle à la quantité d'ADN injecté et parallèle à la quantité de protéines exprimées. La dose optimale d'ADN à injecter pour l'induction d'une réponse immunitaire dépend de plusieurs paramètres dont la méthode d'inoculation, le type de l'antigène et l'espèce immunisée. Chez la souris, une dose de 25 à 150 µg d'ADN nu est généralement suffisante alors que chez l'humain 500-2500 µg d'ADN sont nécessaires par injection intramusculaire et deux à trois injections pour l'induction d'une réponse immunitaire "protectrice" ^{123,124}.

2.4.1. Propriété immunostimulante intrinsèque des vecteurs d'expression eucaryote

La présence de motifs CpG non-méthylés dans les composantes bactériennes des vecteurs d'expression eucaryote joue un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire ^{117, 125}. Les motifs CpG non méthylés sont des séquences palindromiques de dinucléotides particulières à l'ADN bactérien qui agissent en tant que "Pathogen Associated Molecules Pattern" (PAMPs). Ils sont reconnus spécifiquement par un récepteur particulier à la surface de certaines cellules du système immunitaire, les récepteurs de type « toll-like » 9 (TLR9) ¹²⁶. L'interaction des motifs CpG avec les TLR9 des macrophages et/ou des CD8 active une série coordonnée de réponses immunitaires incluant l'immunité innée

[macrophages, CD8, et cellules "natural killer" (NK)], l'immunité humorale, et l'immunité cellulaire^{127, 128-130}. La reconnaissance de ces motifs par le système immunitaire initie la réponse immunitaire en générant la production d'interféron α et β (INF- α - β), d'IL-12 et d'IL-18 par les macrophages et les monocytes et d'IL-18 et d'INF- γ par les cellules NK. L'IL-12 stimule les cellules NK à produire de l'INF- γ ^{126, 131} qui favorise alors le développement d'une immunité de type T_{aux}1¹³². Les motifs CpG ont aussi un effet adjuvant sur les cellules B. Ils stimulent la production de facteur de nécrose des tumeurs α (TNF- α) et d'IL-18 qui favorisent la production d'anticorps, la survie des cellules B et la stimulation des cellules CTL. De plus, les motifs CpG stimulent la production d'IL-12, l'expression de CD86, CD80 et des CMH II par les CD8^{117, 133}.

L'importance de ces motifs au niveau de l'induction de la réponse immunitaire des vecteurs d'expression eucaryote a initialement été démontrée par l'incorporation d'un ou deux motifs CpG dans la section non codante d'un plasmide d'ADN codant pour la β -galactosidase. Leur présence cause, chez la souris, une induction dose dépendante de la réponse cellulaire et humorale, comparativement au vecteur standard¹³⁴.

2.4.1.1. Les récepteur de type « toll-like » 9 (TLR9)

Le patron d'expression, la séquence codante, la structure et la spécificité des TLR9 semblent particuliers à chaque espèce animal¹³⁵ et les cellules qui expriment les TLR9 varient selon l'espèce¹³⁶. Ainsi, les motifs CpG immunostimulants chez la souris ne sont pas actifs chez l'humain et les grands animaux et vice-versa^{135,137}. La synthèse chimique de différents oligodéoxynucléotides a démontré que la séquence et le nombre de répétitions de motifs CpG immunostimulants sont spécifiques à l'espèce. Par exemple, des oligonucléotides de 30 mers contenant des répétitions de la séquence palindromique 5'-GACGTT-3' sont très immunostimulants chez la souris et le lapin^{126, 138, 139,138, 140-142}; l'inoculation d'ADN plasmidique contenant de tels motifs active les macrophages murins¹³¹, stimule les CD8 et les cellules B murines^{143, 144}; alors qu'ils ont très peu d'effets immunostimulants sur les leucocytes humains et de d'autres mammifères^{145, 146,147}. Pour le bovin, les études *in vitro* indiquent que les motifs CpG stimulent les cellules B, les CD8 myéloïdes (dérivées de monocytes CD14⁺), les monocytes et les macrophages^{148, 149}. Pour

la souris, les cellules B, les plasmacytoïdes (pCD), les CD_s myéloïdes et les macrophages répondent directement aux motifs CpG¹⁵⁰. Ces différences importantes au niveau des cellules impliquées dans la reconnaissance des motifs CpG expliquent, entre autre, les variations d'efficacité des vaccins à ADN selon l'animal utilisé.

2.4.2. Maturation et présentation de l'antigène

Les différentes méthodes d'inoculation permettent l'introduction de l'ADN dans des endroits distincts de la surveillance immunitaire, ce qui cause un impact significatif au niveau du type de stimulation du système immunitaire. Par exemple, l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique permet préférentiellement l'induction d'une forte immunité cellulaire de type T_{aux1} associée à l'induction des CTL spécifiques et à la production d'IgG2a¹⁵¹ alors que l'injection intradermique permet l'induction d'une réponse humorale caractérisée par une rapide progression des cellules T_{aux2} et la production de l'IgG1^{152, 153}.

2.4.2.1. Cellules présentatrices d'antigènes (APCs)

Plusieurs études suggèrent que les quelques APCs dérivées de la moelle osseuse présentes au site d'inoculation jouent un rôle clé au niveau du développement de la réponse immunitaire après une injection d'ADN plasmidique puisqu'elles ont la particularité de présenter très efficacement des antigènes sur leur CMH aux cellules T_{aux} naïves et de permettre leur activation¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

2.4.2.2. Cellules dendritiques (CDs)

Dans les tissus périphériques, les CDs immatures ont une forte activité phagocytaire caractérisée par un faible niveau d'expression des CMH et des molécules de co-stimulation et sont de mauvaises inductrices de la réponse immunitaire. Les CDs matures constituent un ensemble hétérogène de cellules ayant en commun une forte expression de molécules du CMH II, de molécules d'adhésion et de costimulation (CD40, CD80, CD86) et une capacité élevée à stimuler les lymphocytes T. Lors d'une vaccination par ADN, l'induction des cytokines pro-inflammatoires stimule fortement les CDs immatures et permet leur migration dans les ganglions avoisinants. Durant leur migration, il y a maturation des CDs leur permettant d'activer efficacement les cellules T_{aux} CD4⁺ naïves. La communication

avec les cellules $T_{aux} CD4^+$ permet l'expression de la molécule de co-stimulation CD40 nécessaire aux CD8 pour activer les cellules T $CD8^+$ naïves^{157, 158} ainsi que l'établissement d'une forte réponse de longue durée des $CD4^+$ mémoires.

Bien que ces cellules soient retrouvées en faible quantité (< 1%), de plus en plus d'études démontrent qu'elles jouent un rôle dominant dans l'initiation de la réponse immunitaire des vaccins à ADN¹⁵⁹. Premièrement, une étude *in vitro* a démontré qu'une très faible quantité (< 0,4%) de CD8 transfectées avec de l'ADN plasmidique est suffisante pour présenter efficacement l'antigène aux cellules T_{aux} ¹⁶⁰. Deuxièmement, une étude *in vivo* a démontré que suite à une injection intradermique d'ADN, il y a migration des quelques CD8 transfectées vers les ganglions lymphatiques pour la présentation de l'antigène¹⁶¹. Troisièmement, plusieurs études ont démontré que l'inoculation d'ADN plasmidique permet l'activation générale et la migration d'un grand nombre de CD8 non-transfectées aux ganglions^{123, 160, 162}. La maturation des CD8 semble être influencée par la méthode d'inoculation utilisée ainsi que par les propriétés immunostimulantes intrinsèques de l'ADN plasmidique. Par exemple, l'utilisation du "gene-gun" ou de l'injection à la seringue pour l'inoculation intradermique cause des microdommages physiques qui stimulent le recrutement des cellules de Langerhans¹⁶².

Les CD8 jouent trois rôles essentiels dans la stimulation du système immunitaire, soit : (i) la présentation de peptides antigéniques sur leur CMH II suite à la capture de l'antigène exprimé par les cellules transfectées; (ii) la présentation des peptides antigéniques sur leur molécules CMH I suite à leur transfection directe et (iii) la présentation de peptides provenant d'antigènes sécrétés présentés normalement sur des CMH II et de peptides non sécrétés présentés dans les cellules somatiques transfectées, pour une stimulation adéquate des cellules $CD8^+$ par un mécanisme particulier nommé "cross presentation"¹⁶³.

La première évidence *in vivo* du mécanisme de "cross presentation" provient de la démonstration que le transfert de myoblastes exprimant une nucléoprotéine du virus de l'influenza chez des souris hybrides, permet l'induction d'une réponse CTL restreinte à l'haplotype de la souris receveuse^{164, 165}. Les antigènes non sécrétés produits par les cellules somatiques peuvent aussi être présentés par les CD8 aux cellules $CD8^+$ par le

mécanisme de "cross presentation" suite à la récupération des corps apoptotiques ou nécrotiques des cellules somatiques transfectées par les CDs ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. De plus en plus d'études indiquent que le mécanisme de "cross presentation" par les CDs est responsable de l'activation de la réponse à médiation cellulaire et que les cellules somatiques seraient seulement des "usines de fabrication" et des réservoirs d'antigènes pour l'induction et le maintien de la réponse immunitaire à cause de leur implication dans le mécanisme de "cross presentation" ¹⁷⁹.

2.4.2.3. Cellules somatiques

La première étude impliquant l'inoculation d'ADN plasmidique a démontré que l'inoculation des cellules musculaires avec de l'ADN plasmidique permettait l'expression de protéines par les cellules transfectées ¹⁶⁹. Par la suite, il fut démontré que l'inoculation intramusculaire d'ADN plasmidique permettait l'induction d'une forte réponse des cellules T cytotoxiques ¹⁷⁰. Au site d'inoculation, la transfection et l'expression protéique sont majoritairement confinées aux cellules des tissus périphériques; les myocytes et kératinocytes. Par exemple, l'injection intramusculaire d'un plasmide induit l'expression du transgène en moins de 2 minutes par les myocytes de souris ¹⁷¹. La rapidité avec laquelle le plasmide est introduit et exprimé par les cellules musculaires s'explique par l'entrée favorisée de l'ADN par les microtubules T et par le nombre important de noyaux par cellule musculaire ^{172, 173}.

La transfection des cellules somatiques permet la présentation de l'antigène sur leur CMH I aux cellules T CD8⁺ et dans le cas d'une protéine soluble/sécrétée, la libération de l'antigène dans l'environnement extracellulaire. L'antigène soluble est phagocyté par les APCs et présenté sur leur CMH II aux cellules T_{aux} CD4⁺. La suggestion que les cellules somatiques agissent à titre d'inducteur de la réponse immunitaire a suscité des questionnements puisque bien qu'elles aient la capacité de présenter des épitopes sur leurs CMH I, elles ne possèdent pas les signaux de co-stimulation nécessaires et ne peuvent pas produire les molécules immunostimulantes (cytokines) pour l'expansion des cellules T CD8⁺ ¹⁷⁴.

Une équipe a démontré que le transfert de myocytes transfectés de façon stable *ex vivo* protégeait aussi efficacement contre le challenge que l'injection intramusculaire chez la souris ¹⁶⁴. Cependant, il a été démontré que le retrait du muscle dans les 10 minutes qui suivent l'inoculation intramusculaire n'altère en rien la force de la réponse immunitaire et indique que les myocytes ne seraient donc pas directement impliqués dans l'induction de la réponse immunitaire ¹⁷⁵. Ces études suggèrent que la réponse immunitaire observée suite à la l'inoculation intramusculaire serait expliquée par l'entrée du matériel dans le système lymphatique ou circulatoire plutôt que par la transfection directe des myocytes. Par la suite, des études d'immunisations intramusculaires ont été effectuées chez des souris dépourvues de toutes APCs. Les résultats indiquent que la transfection des myocytes ne permet pas l'induction d'une réponse spécifique des cellules CTL à moins que les myocytes soient co-transfectés avec un gène codant pour une molécule de co-stimulation (CD86) ^{176, 177}. À la lumière de ces résultats, il est établi que les myocytes sont seulement des usines de production d'antigènes.

Dans l'objectif de déterminer l'implication des kératinocytes et des cellules de Langerhans dans la réponse immunitaire induite suite à une inoculation intradermique, il a été démontré que le retrait immédiat de la peau suite à l'inoculation empêche le développement de la réponse immunitaire, contrairement au retrait du muscle ¹⁷⁵. De plus, la transplantation de peau inoculée avec de l'ADN plasmidique 12 heures auparavant permet une réponse immunitaire alors que si la période de transplantation excède 24 h, peu ou pas de réponse immunitaire n'est observée ¹⁷⁸. Ces résultats suggèrent que les cellules impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire primaire émigrent de l'épiderme.

2.4.3. Réponse des cellules T_{aux} CD4⁺

Selon le type et la concentration des cytokines produites suite à la présence d'un élément pathogène, les cellules CD4⁺ primaires se différencient en T_{aux1} et T_{aux2}. Une production importante d'IL-12 par les APCs -associée un antigène intracellulaire- permet la différenciation préférentielle des cellules T naïves en T_{aux1} alors qu'une production élevée d'IL-4 -associée à un antigène soluble/sécrété- stimule la différenciation des cellules T_{aux2}. Chaque type de cellules T_{aux} matures est responsable de la production de cytokines

spécifiques reliée à l'induction d'une réponse immunitaire précise. Les cellules T_{aux1} produisent principalement de l'INF- γ et sont associées à une réponse à médiation cellulaire impliquant les cellules $CD8^+$, alors que les T_{aux2} produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 et sont principalement associées à une réponse humorale.

Plusieurs études démontrent que l'inoculation intramusculaire d'ADN plasmidique favorise préférentiellement le développement d'une réponse immunitaire de type T_{aux1} . Cette préférence s'explique par la présence de l'antigène dans le cytoplasme cellulaire lors de son expression endogène et par la présence de motifs CpG non-méthylés dans le vecteur d'expression. La présentation de tels motifs aux cellules du système immunitaire déclenche la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires qui stimulent les cellules NK à produire de l'INF- γ et favorise ainsi le développement des cellules T_{aux1} ¹⁴⁰. Les vaccins à ADN peuvent dans certain cas, stimuler le développement préférentiel d'une réponse immunitaire de type T_{aux2} . Par exemple, une réponse de type T_{aux2} sera favorisée par l'utilisation du "gene gun" pour la livraison de l'ADN¹⁸⁰ et l'expression d'un antigène sous forme sécrétée¹⁸¹.

2.4.4. Réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs)

Le succès de la vaccination par ADN provient surtout de son aptitude à générer une réponse immunitaire des CTLs. Il s'agit d'un avantage considérable en raison des soucis de sécurité associés aux vaccins atténués couramment utilisés lorsque ce type de réponse est important. L'expression endogène de l'antigène permet la présentation des épitopes à la surface cellulaire par les CMH I et la stimulation des cellules T $CD8^+$ spécifiques impliquées dans la réponse cellulaire¹⁷⁰. Selon le modèle expérimental utilisé, les immunisations par ADN indiquent que la réponse des CTLs protectrices peut être détectée soit après l'immunisation (comme dans le cas des vaccins atténués), soit après l'étape de challenge¹⁸²⁻¹⁸⁴.

2.4.5. Réponse immunitaire humorale

Les antigènes solubles ou sécrétés produits par les cellules transfectées au site d'inoculation sont capturés par les cellules phagocytaires (macrophages, CD8 et cellules B), transformés en de petits peptides et présentés sur leur CMH II aux cellules $T_{aux} CD4^+$ pour

permettre l'activation et la différenciation des cellules T naïves en T_{aux2} . La production de cytokines par les cellules T_{aux2} activées et leur interaction spécifique avec les cellules B permettent la production d'anticorps spécifiques à l'antigène ¹⁸⁵. Les anticorps induits suite à une vaccination par ADN sont les IgG2a, IgG1a, les IgM et les IgA. La présence des motifs CpG d'origine bactérienne dans l'ADN vaccinal induit la production d'INF- γ par les cellules T_{aux1} et a comme effet de favoriser la production d'IgG2a, comparativement à l'isotype IgG1 plutôt induit par la présence d'IL-4. La nature de l'antigène peut influencer la nature de l'isotype majeur; un antigène sécrété peut générer des niveaux plus élevés d'IgG1 ¹⁸¹.

La démonstration que l'expression endogène d'une protéine codée par un vecteur d'expression eucaryote et que sa présentation au système immunitaire permet l'induction d'une réponse humorale protectrice n'est pas en soi exceptionnelle puisque les vaccins sous-unitaires, inactivés et atténués le permettent déjà. De plus, la réponse humorale induite par les vaccins à ADN est relativement faible, comparativement aux vaccins traditionnels ^{186, 187}. Par contre, la vaccination par ADN est très efficace en terme de quantité totale d'anticorps produits par rapport à la quantité totale de protéines présentées au système immunitaire. L'inoculation de microgrammes d'ADN résulte en la production de l'ordre des nanogrammes d'antigènes. De plus, une seule immunisation par ADN est généralement nécessaire pour induire un titre maximal d'anticorps contre l'antigène ciblé ¹⁸⁷ et selon le vaccin à ADN et le modèle animal utilisé, la période de protection humorale spécifique peut durer toute la vie de l'animal ^{111, 187}. Enfin, la vaccination par ADN permet de générer des anticorps neutralisants similaires à ceux produits lors d'une infection naturelle. Cet avantage énorme réside dans la synthèse endogène de l'antigène qui permet les processus de glycosylations et les modifications post-traductionnelles. La configuration de la protéine produite est donc similaire à la protéine native du pathogène et assure ainsi la production d'anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels.

2.4.6. Réponse immunitaire mémoire

2.4.6.1. Réponse immunitaire mémoire humorale

Un vaccin efficace a la capacité d'induire une réponse mémoire à long terme. Les vaccins traditionnels (sous-unitaire, atténué, inactivé) parviennent à produire une réponse humorale durable. Les études ont démontré que les vaccins à ADN peuvent aussi permettre l'induction d'une réponse humorale à long terme. Cependant, la réponse mémoire humorale semble particulière à l'antigène utilisé. Par exemple, des souris vaccinées avec de l'ADN codant pour l'hémagglutinine (HA) de l'influenza développent des anticorps anti-HA persistant plus d'un an ^{111, 187} alors que celles immunisées avec un vecteur d'expression eucaryote codant pour la nucléocapside du virus démontrent une réponse humorale fortement affaiblie 4 mois après l'inoculation ¹⁸⁴.

2.4.6.2. Réponse immunitaire mémoire cellulaire

Bien qu'il a été démontré que le nombre de cellules $T_{aux} CD4^+$ spécifiques peut demeurer élevé jusqu'à 40 semaines après une vaccination par ADN ¹⁸⁸, comment la réponse mémoire est produite et maintenue n'est pas clair. Un élément important expliquant l'induction de la réponse mémoire des cellules $T CD8^+$ suite à une vaccination par ADN est que les motifs CpG sont d'excellents inducteurs de la production des INF de type 1 et d'IL-12 ^{189, 190}. Expérimentalement, très peu d'études ont évalué l'induction de la réponse des cellules $T CD8^+$ sur une longue période. Une étude indique qu'une réponse des CTL est encore observée 6 mois après l'injection intradermique d'ADN codant pour la nucléoprotéine du virus de grippe ¹⁹¹.

Contrairement aux études initiales qui avaient démontré que l'inoculation intramusculaire d'ADN permettait l'expression d'antigènes pendant plus d'un an ¹⁹², plusieurs évidences actuelles semblent indiquer que la réponse immunitaire à long terme induite par un vaccin à ADN est maintenue en absence d'un niveau détectable d'antigènes ¹²³. Ces résultats opposés soulèvent des mécanismes différents quant à la façon dont les vaccins à ADN induisent une réponse cellulaire à long terme. Les hypothèses sont que l'antigène est exprimé continuellement au-dessous de la limite de la détection mais suffisamment pour une présentation au système immunitaire ou que, l'ADN plasmidique et

l'antigène ont complètement disparu et que la réponse est indépendante de la présence d'antigènes¹²³ ; et/ou que les cellules mémoires induites par les vaccins à ADN diffèrent qualitativement de celles induites par les autres types de vaccins.

2.5. Risques et problèmes associés à la vaccination par ADN

Étant donné que la vaccination par ADN est une technique relativement récente, les effets secondaires à long terme associés à son administration répétée ne sont pas déterminés. La communauté scientifique a été fortement questionnée à propos des risques associés à l'utilisation de matériel génétique dans le domaine de la vaccination et de la thérapie génique¹⁹³.

2.5.1. Intégration aléatoire

L'intégration chromosomale aléatoire du matériel génétique utilisé lors de la vaccination pouvant causer des transformations cellulaires dangereuses est un élément de crainte. En réalité, la recombinaison homologue est un phénomène peu probable suite à l'inoculation d'un vecteur d'expression eucaryote puisqu'il n'y a aucune homologie entre l'ADN des mammifères et l'ADN d'origine bactérien. De plus, l'utilisation d'ADN sous forme plasmidique diminue les chances d'intégration puisque des extrémités d'ADN linéaires sont généralement nécessaires pour l'intégration. Des techniques très précises (permettant la détection de 1 copie/150 000 noyaux) ont permis de démontrer que l'intégration chromosomique est un phénomène extrêmement peu probable suite à l'inoculation d'ADN plasmidique par voie intramusculaire chez la souris^{193,194,195}.

2.5.2. Induction d'une tolérance

L'induction d'une tolérance immunologique lors de la vaccination par ADN plutôt qu'une immunité protectrice est aussi une inquiétude soulevée puisque la quantité d'antigène produit et présenté est relativement faible et qu'il peut y avoir persistance de l'expression de l'antigène pendant des semaines ou des mois. Pour répondre à cette hypothèse de risque, il a été démontré que plusieurs facteurs sont à considérer pour l'induction de la réponse immunitaire et du fait même de l'induction d'une tolérance (l'âge, l'espèce des animaux

immunisés et la méthode d'administration sont des variables importantes). Par exemple, l'injection d'ADN plasmidique (codant pour un antigène de la malaria) chez des souris de 2–5 jours d'âge prévient le développement d'une réponse immunitaire lors d'une injection subséquente du même vecteur 6 semaines plus tard. Cependant, l'injection d'ADN plasmidique [codant pour un antigène de surface du virus de l'hépatite B] chez les chimpanzés naissants et à 2 et 4 mois permet le développement d'une réponse immunitaire identique à celle du groupe contrôle vacciné seulement à 2, 4 et 6 mois ¹⁹⁶.

2.5.3. Induction d'une réponse autoimmune

Un risque théorique de l'utilisation de vecteurs d'expression eucaryote est qu'elle peut causer une réaction autoimmune chez les sujets vaccinés par la destruction massive et le relargage des constituants des cellules transfectées présentant les peptides antigéniques. Cet évènement se produit lors d'infections virales et bactériennes naturelles et il est théoriquement peu probable que les vaccins à ADN soient un plus grand danger immunologique. De plus, étant donné que le nombre total de myocytes transfectés suite à une inoculation intramusculaire d'ADN est relativement faible ¹⁶⁹, il est peu probable que la destruction d'un si petit nombre de cellules cause une forte réaction autoimmune.

Le développement d'une réaction autoimmune dirigée contre l'ADN plasmidique lui-même est aussi un élément de risques qui a été soulevé. Plusieurs évidences indiquent que cet évènement a très peu de chance de se produire. Premièrement, l'ADN purifié double brin ne permet pas l'induction d'anticorps anti-ADN double brin, ¹⁹⁷ à moins d'être dénaturé, complexé avec l'albumine bovine méthylée et co-administré avec l'adjuvant complet de Freund. Deuxièmement, des méthodes récentes très sensibles permettant la détection d'anticorps anti-ADN indiquent que très peu ou aucun anticorps anti-ADN double brin n'est détectable suite à l'inoculation d'ADN plasmidique ^{198, 199}.

2.5.4. Inconvénients actuels des vaccins à ADN

La majorité des démonstrations actuelles de l'efficacité des vaccins à ADN a été rapportée chez les animaux de laboratoire. Jusqu'à ce jour, les essais cliniques chez les humains et les grands animaux indiquent des résultats encourageants mais très peu de résultats totalement concluants ont été rapportés ^{54, 89, 90, 200}. Un des problèmes majeurs des

vaccins à ADN est que chez l'humain et les grands animaux des doses importantes d'ADN ainsi que plusieurs rappels sont habituellement nécessaires pour obtenir une réponse immunitaire adéquate. Bien que des doses élevées d'ADN aient la capacité d'induire une réponse des CTL chez les humains et les grands animaux, la production des anticorps et des cytokines de type T_{aux1} sont plus problématiques.

3. Mécanismes cellulaires impliqués dans la vaccination par ADN

Pour une expression efficace du transgène dans des conditions *in vivo*, l'ADN plasmidique doit franchir plusieurs barrières. Chacune d'elles diminue la quantité finale d'ADN disponible pour la production de protéines. Par exemple, le premier obstacle rencontré par l'ADN plasmidique suite à son injection est sa rapide dégradation par les désoxyribonucléases extracellulaires^{201, 202}. Dans l'objectif d'optimiser les vaccins à ADN, les mécanismes cellulaires impliqués de l'entrée à l'expression du vecteur d'expression eucaryote sont résumés dans les sections suivantes.

3.1. Mécanismes cellulaires : de l'internalisation de l'ADN plasmidique à l'expression de l'antigène

3.1.1. Internalisation du vecteur d'expression eucaryote

La membrane cellulaire est composée d'une double couche de phospholipides comprenant de nombreuses protéines insérées et associées. Elle possède une charge nette négative expliquée par la présence de nombreuses glycoprotéines. La répulsion électrostatique entre la membrane cellulaire et l'ADN (tous deux chargés négativement) est une barrière importante à l'internalisation de ce dernier²⁰³.

L'expression du transgène suite à l'injection d'une solution saline contenant de l'ADN plasmidique est un évènement qui se produit seulement *in vivo* et qui prend plusieurs heures²⁰⁴. Les phénomènes responsables de l'internalisation et de l'expression de l'ADN représentent alors des mécanismes difficiles à étudier chez des modèles expérimentaux *in vitro*. Une équipe a tenté de déterminer le mécanisme d'internalisation de l'ADN dans les cellules en utilisant un modèle *in vitro* composé de cultures primaires matures de myotubes de rats ou d'hépatocytes²⁰⁴. Leur étude a démontré que l'internalisation de l'ADN semble être complètement inhibée lorsque les cellules sont

retirées de leur environnement tissulaire. Malgré l'absence de modèle *in vitro* jusqu'à ce jour, différents mécanismes hypothétiques ont été proposés et présentés dans les sections suivantes.

3.1.1.1. Rupture de la membrane cellulaire

Une rupture temporaire de la membrane cellulaire causée par une pression hydrostatique élevée d'une injection rapide d'un volume important dans un endroit restreint est une hypothèse proposée pour l'internalisation de l'ADN dans les cellules. Cette hypothèse provient de l'observation que l'injection intramusculaire d'une solution saline contenant de l'ADN plasmidique permet une forte expression du transgène par les myocytes situés à proximité du site d'inoculation. En raison de leur grande taille et de leur nombre important de noyaux, les grandes fibres musculaires pourraient survivre à la perturbation d'une partie de leur membrane contrairement aux autres types de cellules. Cependant, ce mécanisme n'est pas suffisant pour expliquer pourquoi des cellules situées loin du site d'injection expriment aussi le transgène^{169, 172}.

3.1.1.2. Formation de larges pores membranaires

Une seconde hypothèse proposée pour l'internalisation de l'ADN serait que des pores de grande taille formés temporairement dans la membrane cellulaire lors de l'inoculation seraient responsables de l'internalisation²⁰⁵. Il a été démontré grâce à un système de membranes artificielles, que des pores pouvant atteindre quelques micromètres de rayon, peuvent être formés temporairement (8 secondes) dans la membrane cellulaire²⁰⁶. Ces pores permettraient le transport de l'ADN et le temps d'ouverture laisserait largement le temps à l'ADN de trouver le pore et d'y pénétrer (basé sur le coefficient de diffusion de l'ADN dans l'eau qui est de 4×10^{-8} cm²/sec et 10^{-8} cm²/sec dans le cytoplasme)²⁰⁷. Suite à la publication de ces résultats, une étude a par contre démontré que l'entrée de l'ADN dans les cellules est un mécanisme beaucoup plus lent que celui proposé par la formation de larges pores membranaires²⁰⁴.

3.1.1.3. Formation de petits pores membranaires

La troisième hypothèse proposée pour l'internalisation de l'ADN dans les cellules est que de petits pores membranaires formés temporairement à la surface cellulaire

serviraient de porte d'entrée. De petits pores transitoires d'un diamètre comparable à celui de l'ADN plasmidique superhéliçoïdal (~ 10 nm) dans la membrane cellulaire seraient formés par l'injection d'un volume important avec une forte pression. Il s'agit d'un mécanisme limitant puisque l'ADN doit trouver le pore et pénétrer rapidement puisque les pores s'ouvrent et se referment en quelques secondes ²⁰⁸. De plus, la formation de petits pores membranaires est un phénomène rare et très peu probable qui ne permettrait pas d'expliquer l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules ²⁰⁴.

3.1.1.4. Endocytose

Les cellules eucaryotes utilisent une variété de mécanismes regroupés sous le terme endocytose (phagocytose, macropinocytose/pinocytose, endocytose clathrine-dépendante, endocytose caveolae-dépendante, endocytose adsorptive et l'endocytose clathrine/caveolae-indépendante) pour l'internalisation de matériel extracellulaire de taille importante. L'endocytose permet la prise de nutriments extracellulaires, d'antigènes, de facteurs de croissance et de pathogènes, la régulation de l'expression des récepteurs cellulaires et la maintenance de la polarité cellulaire ²⁰⁹.

L'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose caveolae-dépendante, la macropinocytose/pinocytose et endocytose adsorptive sont des mécanismes soulevés par la communauté scientifique pour expliquer l'internalisation de l'ADN plasmidique dans les cellules. L'évidence la plus plausible jusqu'à présent à propos de l'internalisation de l'ADN est la démonstration qu'un récepteur saturable est responsable de l'internalisation. Effectivement, la co-injection dans des cellules musculaires ou du foie de vecteurs d'expression avec des molécules polyanioniques (par exemple, de l'ADN de sperme de saumon soniqué), démontre l'existence d'une compétition au niveau de l'internalisation ^{204,210,211}.

L'endocytose clathrine-dépendante est la voie principale d'entrée de plusieurs molécules dans les cellules ²¹² et est aussi utilisée par de nombreux virus tels que les rétrovirus, virus de l'herpes, orthomyxovirus, paramyxovirus, alphavirus, rhabdovirus, togavirus, adénovirus, papovavirus, réovirus et les picornavirus ²⁰⁹. L'endocytose clathrine-

dépendante utilise un récepteur spécifique à la surface des cellules. Plus de 20 récepteurs différents impliqués dans l'internalisation clathrine-dépendante ont été identifiés. Il s'agit d'un évènement spécifique et constitutif très bien caractérisé ²¹³. L'existence d'un récepteur spécifique à la surface des cellules responsables de l'internalisation de l'ADN plasmidique par endocytose clathrine-dépendante a été suspectée suite à la détermination de récepteurs responsables de l'internalisation des courts fragments d'ADN ^{214, 215}. Une étude a démontré que les leucocytes humains ont la capacité de lier et d'internaliser de l'ADN de phage lambda grâce à un récepteur particulier de 30 kDa ²¹⁶ alors qu'une autre a plutôt décrit la présence de trois protéines (28, 59 et 79 kDa) sur les leucocytes humains impliqués dans la liaison et l'internalisation de l'ADN ²¹⁷. Les récepteurs "scavenger" (CD36, CD68) présents sur les macrophages et les neutrophiles ont aussi été suggérés pour l'internalisation de l'ADN puisqu'ils ont la particularité de lier une variété de ligands polyanioniques et que l'ajout de ligands spécifiques aux récepteurs "scavenger" inhibe la prise de l'ADN par les cellules ²⁰¹. Cependant, l'utilisation de ce dernier mécanisme pour expliquer l'internalisation de l'ADN plasmidique est questionnée depuis la démonstration que l'internalisation et l'expression de l'ADN plasmidique ne sont pas affectées chez des souris mutantes n'exprimant pas le récepteur "scavenger". Ce même groupe de recherche a suggéré un mécanisme particulier d'endocytose impliquant le système des microtubules T et les caveolae pour expliquer l'internalisation de l'ADN ^{172, 173, 204, 218, 210}.

La macropinocytose permet l'internalisation de matériaux d'une taille pouvant atteindre 2 µm de diamètre ²¹⁹. Elle est aussi exploitée par les bactéries pour envahir les cellules épithéliales et les macrophages ²²⁰. La macropinocytose est déclenchée généralement grâce à une stimulation; sauf dans le cas des CDs où il s'agit d'un mécanisme constitutif et important pour l'ingestion et la présentation d'antigènes ²²¹. Dans le cas de l'internalisation de l'ADN plasmidique, le mécanisme de macropinocytose a été proposé suite à l'observation de l'internalisation d'oligonucléotides par les hépatocytes de souris ²¹⁴. De plus, l'internalisation de l'ADN par ce mécanisme a été appuyée par la démonstration que l'inhibition de la macropinocytose (par l'utilisation d'amiloride et de N,N-diméthyl amiloride) réduit la prise de l'ADN plasmidique de plus de 85%, alors que l'inhibition de la formation des puits de clathrine et des caveolae (par l'utilisation de chlorpromazine et de nystatin/filipin III, respectivement) n'a aucun impact ²²².

3.1.2. Les compartiments intracellulaires

3.1.2.1. L'endosome et le lysosome

Si nous considérons que l'internalisation de l'ADN à l'intérieur de la cellule a lieu par endocytose, l'ADN plasmidique internalisé est acheminé vers la voie classique endosome/lysosome et y sera rapidement dégradé. Les mécanismes par lesquels l'ADN est libéré de la voie endosomale suite à son internalisation par endocytose sont très peu élucidés, mais théoriquement existants puisque l'expression *in vivo* a lieu.

3.1.2.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme représente une barrière importante pour la livraison et l'expression de l'ADN plasmidique au noyau^{173, 223-225}. Des études indiquent effectivement que l'expression de l'ADN plasmidique est plus efficace lorsque celui-ci est directement micro-injecté dans le noyau, comparativement à sa micro-injection dans le cytoplasme^{173, 224, 226}. Le cytoplasme est caractérisé par une forte concentration de protéines (100 mg/mL), plusieurs organelles (RE, appareil de Golgi, mitochondrie, réseau de filaments d'actine) occupant de 10-15 % de l'environnement²²⁷ en plus de plusieurs molécules multivalentes et cationiques lors de la mitose (histone et spermine)²²⁸. La viscosité de la phase fluide du cytoplasme est d'environ 1.2-1.4 fois plus grande que celle de l'eau et influence beaucoup la mobilité des macromolécules^{229, 230}. À titre indicatif, la mobilité translationnelle de macromolécules inertes d'une taille inférieure à 500-750 kDa (Ficoll ou Dextran) est 3 à 4 fois inférieure à celle observée dans l'eau²³¹. De plus, la diffusion cytoplasmique des protéines et autres macromolécules tel que de l'ADN plasmidique est habituellement plus lente que celle des particules inertes à cause de la possibilité de liaison avec des composantes intracellulaires. Le coefficient de diffusion cytoplasmique (vitesse à laquelle se déroule la diffusion dans le cytoplasme) des protéines et autres macromolécules n'est pas directement en corrélation avec leur taille²²⁸.

À propos du passage de l'ADN plasmidique dans le cytoplasme, une étude a démontré que sa demi-vie suite à sa micro-injection dans le cytoplasme est de 50-90 minutes et qu'elle est indépendante du nombre de copies (1000–10,000 plasmides/cellule) et de la conformation du plasmide²²⁵. La disparition rapide de l'ADN dans le cytoplasme

s'explique principalement par la présence de nucléases cytosoliques plutôt que par la division cellulaire puisque ce phénomène a aussi été observé dans des cellules quiescentes. De plus, la majorité du matériel injecté dans le cytoplasme reste séquestré au site d'injection. Les obstacles immobiles et/ou la possibilité d'association avec des protéines cytosoliques expliquent la mobilité restreinte de l'ADN dans le cytoplasme^{207, 232, 233}. Il a été démontré que la mobilité de l'ADN plasmidique dans le cytoplasme est très faible et inversement proportionnelle à sa taille^{173,234}. Par exemple, le coefficient de diffusion de l'ADN dans le cytoplasme diminue de 65-fois avec l'augmentation de la taille de l'ADN de 21 à 6000 paires de base (bp)²⁰⁷. Une étude a démontré que la réduction au maximum de la taille du vecteur d'expression ("minicercle") favorise sa diffusion dans le cytoplasme et induit de façon significative l'efficacité de transfection *in vitro* que *in vivo*²³⁵.

3.1.2.3. Le noyau

L'enveloppe nucléaire est constituée de deux bicouches de phospholipides, d'une lamina nucléaire et est perforée par environ 3000 à 4000 Complexes de Pore Nucléaire (CPNs). L'enveloppe nucléaire sépare le contenu nucléaire du cytoplasme. Durant la division cellulaire, l'enveloppe nucléaire des cellules se dissout pour permettre la libération de matériel nucléaire dans le cytoplasme puis se reforme. Excepté durant ce phénomène, l'accès à l'intérieur du noyau est limité par le passage des molécules au travers des CPNs de la membrane nucléaire.

Les CPNs sont des structures de 120 nm de diamètre composées de 30 nucléoprotéines distinctes. Chaque CPN possède une symétrie octogonale ressemblant à un panier de basket-ball (Figure 4). Les CPNs contiennent un ou plusieurs canaux aqueux à travers lesquels les particules solubles non polaires d'une taille inférieure à 9 nm (< 40-60 kDa) peuvent traverser rapidement la membrane nucléaire par diffusion passive. Les CPNs possèdent aussi un canal central de 40 nm impliqué dans l'entrée ou la sortie sélective du noyau des macromolécules telles que protéines et ribonucléoprotéines^{236, 237}. Pour être internalisées par les CPNs, les macromolécules doivent posséder une séquence signal spécifique, appelée séquence de localisation nucléaire (SLN)^{238, 239, 240}. Cette séquence permet des interactions spécifiques avec des protéines impliquées dans la translocation

nucléaire des macromolécules (les kariophilines). Les principales étapes du mécanisme de translocation nucléaire sont déterminées (Figure 5). Brièvement, le cargo à transloquer possédant une SLN situé dans le cytoplasme est reconnu par une protéine cytoplasmique, l'importine- α (IMP- α). Par la suite, une interaction du cargo-SLN/IMP- α avec l'IMP- β permet la présentation du cargo-SLN à la face cytoplasmique du CPN²⁴¹. L'interaction du cargo-SLN/IMP- α /IMP- β avec la protéine Ran guanosine diphosphatase (Ran/GDP) permet la translocation énergie-dépendante du cargo vers le noyau. Suite à la translocation, le cargo-SLN/IMP- α /IMP- β est défait et la conversion de Ran/GDP en Ran/GTP permet aux importines de retourner dans le cytoplasme²⁴².

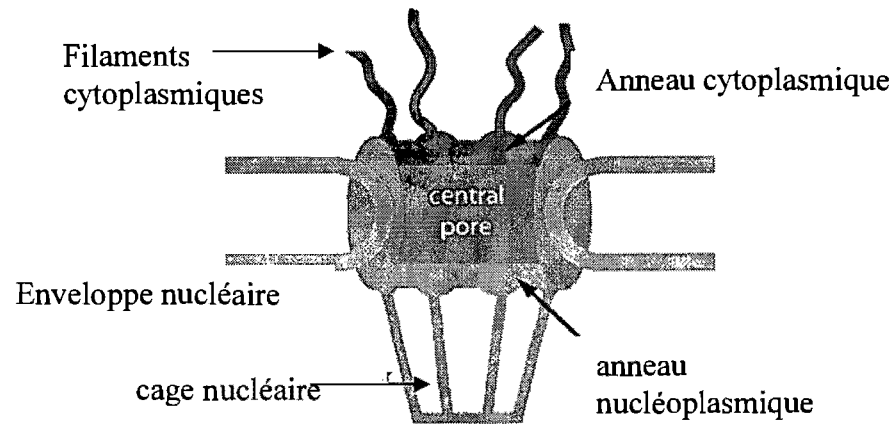


Figure 4. Schématisation du transport nucléaire par un CPN.

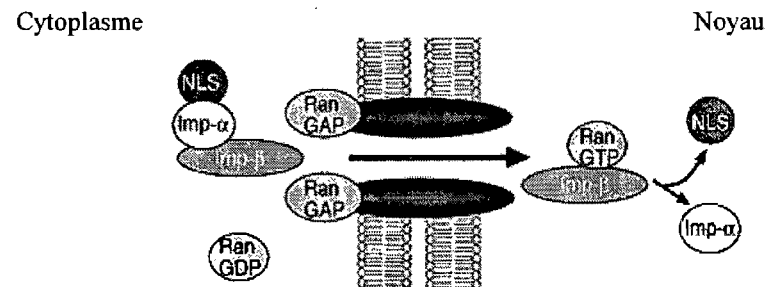


Figure 5. Représentation tri-dimensionnelle d'un complexe de pore nucléaire²⁵⁰.

L'expression *in vivo* d'un transgène par un vecteur d'expression eucaryote existe mais les mécanismes impliqués dans l'internalisation nucléaire de l'ADN plasmidique sont peu élucidés. La mitose peut théoriquement permettre l'entrée aléatoire de matériel génique

exogène présent dans le cytoplasme dans le noyau et ainsi expliquer l'expression de transgènes dans les cellules en division suite à l'inoculation d'ADN plasmidique ²⁴³. Cependant, dans le cas des cellules quiescentes, telles que les myocytes et les kératinocytes, la membrane nucléaire représente théoriquement un obstacle considérable ²⁴⁴. Très peu d'études proposent des mécanismes expliquant l'internalisation nucléaire de l'ADN dans les cellules quiescentes. De plus, des hypothèses contradictoires ont été rapportées suite à des expériences *in vitro*. Premièrement, une équipe a démontré [grâce à une technique de reconstitution nucléaire *in vitro*], que le transport nucléaire de fragment d'ADN linéaire ne nécessite pas d'énergie ²⁴⁵. L'équipe suggère que l'accumulation de l'ADN au noyau se produit par un transport passif via les CPNs gouverné par la rétention de l'ADN initialement entré à l'intérieur du noyau. La rétention de l'ADN exogène s'expliquerait par la capacité de condensation de la chromatine dans l'environnement nucléaire ou par des interactions avec des composantes nucléaires (lamine et chromatine). Cette hypothèse est peu réaliste puisque le transport passif ne permet théoriquement que la diffusion rapide de particules solubles non polaires d'une taille inférieure à 9 nm (40-60 kDa) alors que les vecteurs d'expression eucaryote ont une taille pouvant varier de 2 à 10 MDa. Deuxièmement, une équipe a suggéré que la translocation nucléaire de l'ADN plasmique serait assurée par un mécanisme actif (énergie dépendant) impliquant les CPNs ²⁴⁶. Cette hypothèse a été appuyée par plusieurs groupes de recherches différents. Ils ont tous démontré que l'attachement de signaux de localisation nucléaire (SLNs) à des plasmides d'une taille variant de 4000 pb à 14 kpb permet et ce, en absence de division cellulaire, d'augmenter l'accumulation nucléaire et l'expression des plasmides ²⁴⁷⁻²⁴⁹.

3.1.2.4. Transcription et expression du transgène

Ce n'est pas tout de se rendre au noyau, encore faut-il que tous les obstacles rencontrés aient préservé la structure superhéliçoïdale l'ADN plasmidique ; essentielle pour un bon niveau d'expression.

La transcription du transgène dans les cellules de mammifères est effectuée par les ARN-polymérase ADN-dépendantes. L'ARN polymérase II est impliquée dans la transcription de la forme précurseur de l'ARNm. Suite à son importation dans le cytoplasme, l'ARNm est transcrit en protéine. Selon les caractéristiques de la protéine synthétisée, la protéine est

relargée dans le milieu extracellulaire et/ou acheminée vers le protéasome pour sa dégradation et son éventuelle présentation en association avec les CMH I à la surface de la cellule.

4. Optimisation des vaccins à ADN

L'éclaircissement des mécanismes et des barrières reliés au transport de l'ADN du site de son injection jusqu'à son expression a permis le développement de différentes stratégies pour augmenter la livraison et l'expression du transgène ainsi que l'amélioration du potentiel immunologique des vaccins à ADN ²⁵¹.

4.1. Le vecteur d'expression eucaryote

Les vecteurs d'expression eucaryote offrent l'avantage d'être très flexibles lors de l'élaboration d'un vaccin à ADN puisqu'ils sont facilement modifiables par des techniques de biologie moléculaire. Pour une expression maximale de la protéine immunogène, des optimisations au niveau du dispositif de transcription du vecteur d'expression eucaryote et/ou au niveau de la séquence codante de l'antigène se sont avérées très intéressantes autant pour augmenter la quantité d'antigènes exprimés que la réponse immunitaire ²⁵².

4.1.1. L'appareil transcriptionnel

4.1.1.1. Le promoteur eucaryote

Le promoteur eucaryote contenu dans les vecteurs d'expression eucaryote est responsable de la transcription du gène. Une séquence "enhancer" ou un intron peut être utilisé pour augmenter l'efficacité de transcription du promoteur. La séquence "enhancer" permet la liaison de facteurs de transcription spécifiques, augmente le niveau d'expression du gène, alors que la présence d'un intron permet la régulation de la transcription et l'induction de l'expression du gène ²⁵³. Généralement, des promoteurs d'origine virale sont utilisés pour assurer une expression forte de l'antigène mais des promoteurs eucaryotes responsables de l'expression de gènes cellulaires spécifiques sont aussi utilisés ^{254, 255, 256}. Lors de la construction d'un vecteur d'expression, le choix du promoteur est très important puisque son efficacité d'expression peut varier en fonction du tissu visé. Par exemple,

l'activité du promoteur du CMV est 1000 fois plus élevée dans les cellules musculaires que dans les cellules de l'épiderme alors que celle de la phosphoenolpyruvate (PEP) est aussi efficace que celle du promoteur CMV pour l'expression dans les cellules du derme²⁵⁷.

Dans le cas des promoteurs d'origine virale, le promoteur du CMV, du virus Simien (SV40), de l'adénovirus et du virus du sarcome de Rous (VSR) sont couramment utilisés dans la construction des vecteurs d'expression eucaryote²⁵⁸⁻²⁶⁰. Le promoteur viral CMV est le promoteur le plus employé puisqu'il permet de très forts niveaux d'expression dans plusieurs types de cellules utilisées *in vitro* et dans plusieurs types de tissus de différentes espèces de mammifères *in vivo*^{253, 257, 258, 261}, comparativement aux autres promoteurs viraux. Le seul côté négatif de l'utilisation des promoteurs d'origine virale est la possibilité d'une régulation négative de la transcription du transgène par la production d'INF- γ stimulée par la présence de motifs CpG d'origine bactérienne dans les composantes intrinsèques du vecteur d'expression²⁶².

Une alternative intéressante aux promoteurs viraux est l'utilisation de promoteurs cellulaires permettant de cibler l'expression de l'antigène seulement dans le tissu désiré. Plusieurs études rapportent que l'utilisation de promoteurs cellulaires spécifiques [le promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), du gène de la PEP, du gène de la desmine, du gène de la créatine kinase (CKP), du gène du facteur d'élongation humain 1 α (EF-1 α), de la β -lactoglobuline bovine, de la β -actine, de l' α globine ou de la prolactine bovine (PL)] permet, dans certains cas, des niveaux d'expression *in vitro* et *in vivo* similaires à ceux du célèbre promoteur viral CMV^{257, 263-267}. Cependant, l'efficacité de ces promoteurs semble varier en fonction du transgène à exprimer. Par exemple, dans le cas de l'utilisation du promoteur du gène ubiquitine humain (UbC) pour l'expression "tissu spécifique" de la neurotoxine de *Clostridium botulinum* de type F, ce promoteur permet une induction d'anticorps spécifiques et une protection contre le challenge supérieure à la même construction sous le contrôle du promoteur CMV alors qu'un résultat immunologique inverse est observé pour le gène V de *Yersinia pestis* cloné dans les mêmes constructions²⁶⁷.

4.1.1.2. Nouveauté : appareil de transcription dérivé des alphavirus

L'utilisation de nouveaux types de vecteurs d'expression dérivés des alphavirus permet d'augmenter la quantité totale de protéines produites. Le mode d'expression d'un gène contenu dans ce type de vecteur diffère de celui des plasmides conventionnels. Les vecteurs dérivés des alphavirus contiennent des séquences spécifiques du Sindbis virus (*Alphavirus*) qui codent pour les protéines non structurales virales (NSP1-4) responsables du mécanisme de répllication auto-amplificative de l'ARN dans le cytoplasme (réplicon). Au lieu de conduire directement à l'expression du gène, la transcription primaire d'un vecteur d'expression dérivé des *Alphavirus* produit un ARN servant de patron pour la synthèse d'un brin complémentaire négatif par les protéines NSP1-4 qui permet une forte amplification du nombre de copies d'ARN positifs dans le cytoplasme cellulaire et par conséquent, une production amplifiée de la protéine. pSIN1.5 est le vecteur dérivé des *Alphavirus* le plus étudié (Figure 6). Il est composé du promoteur CMV suivi de: (i) l'extrémité 5' du génome viral nécessaire à la répllication en cis, (ii) les gènes codant pour les protéines non structurales (NSP1-4), (iii) un promoteur subgénomique du Sindbis virus (SP) fortement actif pour l'expression du gène, (iv) le gène codant pour l'antigène à exprimer (gène x), (v) l'extrémité 3' du génome viral impliquée dans la répllication en cis et (vi) des séquences additionnelles [une séquence synthétique de polyadénylation (poly (A)), une séquence rybozyme (RS) du virus de l'hépatite et une séquence du signal de terminaison de transcription de l'hormone de croissance bovine (TT)]²⁶⁸.

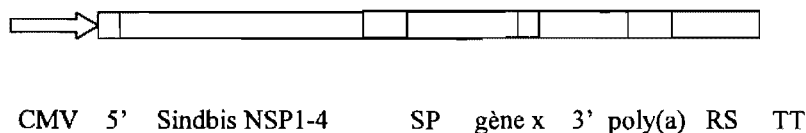


Figure 6. pSIN1.5, vecteur dérivé des *Alphavirus*.

4.1.2. Séquence de l'antigène

4.1.2.1. Optimisation des codons

Les différences dans la fréquence d'utilisation des codons entre le virus ciblé et l'animal immunisé ont initialement été un obstacle dans le développement des vaccins à ADN car elles influençaient largement le niveau d'expression protéique du transgène. L'optimisation des codons de la séquence codante consiste à l'élimination des codons rarement utilisés et le remplacement par ceux les plus utilisés par les cellules de l'espèce ciblée afin de maximiser l'expression du gène microbien. L'efficacité de l'optimisation des codons a été démontrée pour des gènes de parasites^{269, 270} ainsi que pour plusieurs virus^{271-274, 273, 275, 276}. L'optimisation des codons a un impact significatif au niveau de l'efficacité immunologique des vaccins à ADN^{273, 275, 276}. Les immunisations expérimentales ont démontré que cette procédure augmente la production de protéines, accélère la séroconversion, augmente le titre d'anticorps de 100 fois et induit de manière générale la réponse immunitaire. Actuellement, il s'agit d'une procédure standard pour optimiser l'expression d'un gène. Des logiciels publics existent pour faciliter le processus²⁷⁷.

4.1.2.2. Optimisation de la présentation de l'antigène

Un critère important lors du "design" d'un vaccin à ADN pour assurer une induction maximale de la réponse immunitaire est l'habilité de l'antigène à moduler la réponse des cellules T_{aux}. La séquence microbienne peut être modifiée pour moduler la localisation finale de la protéine exprimée et ainsi ajuster le type de réponse immunitaire désirée²⁷⁸. Par exemple, l'inoculation d'un plasmide exprimant une forme sécrétée de la glycoprotéine gE de l'enveloppe du virus Varicella zoster chez la souris, permet l'induction préférentielle d'une réponse humorale alors que la forme native (non sécrétée) favorise plutôt une réponse cellulaire^{279, 280}. Parallèlement à ce résultat, une étude a démontré que la délétion de la portion transmembranaire de la séquence codante permettant ainsi la sécrétion de la protéine E de l'enveloppe du Japanese encephalitis virus ou des antigènes de surface du virus de l'hépatite B induit significativement le titre d'anticorps et la protection immunitaire contre le virus, comparativement aux protéines sauvages^{281, 282}. Une autre exemple, l'addition d'une séquence ubiquitine en C-terminal de la séquence de l'antigène [permettant de diriger la protéine synthétisée dans le cytoplasme vers le protéasome pour

une présentation sur les CMH I] s'est avérée très intéressante pour diriger le développement d'une réponse immunitaire des CTLs^{283, 284}.

La modification de la présentation naturelle d'une protéine microbienne par l'addition d'une séquence de translocation permettant, suite à son expression dans les cellules transfectées, sa dispersion dans les cellules avoisinantes est une stratégie employée pour augmenter la présentation de l'antigène aux APCs et l'intensité de la réponse immunitaire. Le phénomène de translocation a initialement été démontré par la capacité particulière de la protéine TAT (Transactivateur de transcription) du VIH-1 de pénétrer à l'intérieur de cellules en culture^{285, 286}. Par la suite, la propriété de translocation a été déterminée chez d'autres protéines telles que l'hélice-alpha de l'homéodomaine d'Antennapedia de la drosophile, VP22 du virus de l'herpes simplex, E^{ms} des pestivirus, etc.²⁸⁶⁻²⁸⁹. Un domaine de translocation est généralement caractérisé par une courte séquence (20-35 acides aminés) riche en résidus hydrophobes. La translocation est essentiellement un mécanisme non spécifique qui ne nécessite ni récepteur particulier ni énergie²⁹⁰. Les séquences de translocation sont utilisées *in vitro* pour la translocation de protéines, de peptides, d'oligonucléotides et de nanoparticules au travers des membranes cellulaires^{290, 291}. Cependant, les démonstrations *in vivo* rapportant l'utilisation de séquences de translocation sont plutôt rares^{287, 289 292-295} mais quelques résultats immunologiques intéressants ont été démontrés dans le cadre de vaccinations par ADN²⁹⁶⁻³⁰⁰. Des immunisations expérimentales chez la souris et le bovin indiquent que la présence d'une séquence de translocation à la suite du gène d'intérêt permet d'augmenter le potentiel immunogène des plasmides utilisés grâce à : (1) la propagation de l'antigène dans les cellules avoisinantes et (2) l'induction de la présentation de l'antigène sur les CMH I des APCs²⁹⁶⁻³⁰⁰. La présence d'une séquence de translocation sur l'antigène permet une induction significative de la réponse des cellules T_{aux1}, de la réponse des cellules T cytotoxiques antigène-spécifiques et dans la majorité des cas, de l'augmentation considérable du niveau de protection suite à un challenge²⁹⁶⁻³⁰⁰.

4.2. Livraison de l'ADN : molécules de transport

Une part importante du succès des vaccins à ADN et de la thérapie génique provient du développement des molécules de transport aussi nommées, systèmes de livraison. Les molécules de transport ont été largement étudiées pour la livraison *in vivo*³⁰¹ et *in vitro*³⁰² de matériel génétique dans les cellules. Malgré une efficacité de transfection inférieure à celle des vecteurs viraux recombinants, un engouement important pour les molécules de transport non virales, naturelles ou synthétiques persiste dans la communauté scientifique. Les molécules de transport non virales sont non immunogènes, elles permettent la livraison de gènes de très grande taille, elles sont facilement synthétisables, modulables et modifiables, peu dispendieuses, biocompatibles et biodégradables. Différents types de molécules de transport existent, il y a les vecteurs viraux recombinants et les vecteurs non viraux naturels et synthétiques. En protégeant l'ADN injecté lors de son voyage vers le noyau, les molécules de transport augmentent le niveau d'expression de l'ADN et permettent de diminuer considérablement la quantité d'ADN nécessaire pour le développement d'une réponse immunitaire adéquate³⁰³. Par exemple, l'injection intramusculaire chez des souris de 1 µg d'ADN plasmidique absorbé sur des molécules de transport synthétiques permet une induction significative de la réponse humorale comparativement à une quantité 10 fois plus importante d'ADN injecté dans la saline en plus de permettre l'induction d'une réponse cellulaire des CTLs³⁰³.

Selon leurs caractéristiques chimiques, les molécules de transport peuvent être classées en deux grandes familles différentes: les systèmes neutres et les systèmes cationiques (polymère, peptide ou lipide). Les polymères cationiques ont la particularité de permettre la formation spontanée de nanocomplexes avec une charge de surface positive grâce à des interactions électrostatiques entre leurs groupements chargés positivement et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN³⁰⁴. La condensation de l'ADN par les polymères cationiques a plusieurs avantages; elle permet la protection de l'ADN de la dégradation par les DNases, favorise la livraison et l'internalisation de l'ADN dans les cellules et permet une forte expression de l'antigène. Les mécanismes de transfection particuliers des principaux systèmes de livraisons naturelles et synthétiques sont discutés dans les prochaines sections.

4.2.1. Les polymères neutres

Les polymères neutres sont des molécules amphiphiles possédant à la fois une portion hydrophile et une portion hydrophobe³⁰⁵. En solution, ce type de polymère a la particularité de s'autoassembler en micelles dont le corps est formé de composantes hydrophobes et la couronne de segments hydrophiles³⁰⁶. La portion hydrophile du polymère interagit avec l'ADN plasmidique principalement par des liaisons hydrogènes mais des interactions de van der Waals et/ou des interactions ioniques peuvent aussi avoir lieu alors que les unités hydrophobes s'organisent entre elles par des interactions de van der Waals pour permettre la formation d'un revêtement hydrophobe de vinyl autour de l'ADN.

Le polyvinyl alcool (PVA) et la polyvinylpyrrolidone (PVP) furent les deux premiers polymères neutres non condensants rapportés dans la littérature pouvant permettre la livraison et l'expression de matériel génétique dans les cellules musculaires *in vivo*. Par exemple, chez la souris et le rat, l'injection intramusculaire d'une formulation PVP/ADN permet une induction significative ($> 10 \times$) de l'expression d'un transgène, comparativement à l'injection d'ADN dans la saline³⁰⁷. Actuellement, les systèmes neutres non condensants sont les seuls systèmes de livraison non viraux, capables de permettre la livraison et l'expression de matériel génétique dans les cellules musculaires *in vivo*.

Récemment, une nouvelle classe de polymères neutres permettant la livraison de gènes dans les cellules musculaires *in vivo* a été synthétisée³⁰⁸. Le nombre de segments hydrophiles et hydrophobes peut être modifié pour faire varier la taille, l'hydrophilicité et la lipophilicité du polymère. Comparativement à la première génération de polymères neutres, cette classe de polymères permet une grande stabilité et une faible précipitation des complexes en solution. De plus, ils permettent l'utilisation d'une quantité moindre d'ADN que la première génération des polymères neutres pour la production de la même quantité de protéines. Par exemple, l'injection intramusculaire chez la souris d'une combinaison de polymères neutres/ADN plasmidique permet d'observer une augmentation jusqu'à 20 fois de l'expression de l'antigène, comparativement à l'administration d'ADN dans de la saline³⁰⁸. De plus, certains polymères neutres non condensants peuvent, lorsque utilisés en co-

formulation avec des systèmes de livraison cationiques, augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* de ces derniers³⁰⁹⁻³¹¹.

Aucune étude explique les mécanismes impliqués dans la transfection des cellules musculaires *in vivo* par ce type de polymères. Il a été suggéré que l'efficacité de transfection de ce type de système pourrait être reliée à : (i) la protection de l'ADN des nucléases présentes dans l'environnement extracellulaire, (ii) la dispersion de l'ADN dans le tissu, (iii) la rétention de l'ADN dans le muscle ainsi (iv) qu'à l'augmentation de l'internalisation de l'ADN à l'intérieur des cellules grâce à des interactions hydrophobes avec la membrane cellulaire³¹².

Actuellement, sur le marché, une formulation de polymères neutres efficace pour la transfection *in vivo* des cellules musculaires est disponible sous le nom SP1017 (Supratek Pharma Inc., Montréal)^{308, 313}. À noter, l'efficacité de transfection du SP1017 est observable seulement *in vivo* dans des modèles animaux et non *in vitro*, dans des cellules en culture³⁰⁶.

4.2.2. Les lipides cationiques

Les lipides cationiques en formulation avec différents lipides neutres [liposomes cationiques] ont été durant plusieurs années les molécules de transport non virales les plus étudiées. La Lipofectamine™ 2000 (formée d'un mélange de lipide polycationique 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate et le lipide neutre dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE)) est sans aucun doute, la molécule commerciale la plus connue et utilisée pour la transfection de gènes *in vitro*. Les liposomes cationiques se présentent comme des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides possédant un compartiment aqueux qui peut accueillir des molécules hydrophiles telles que l'ADN, des composés pharmacologiques ou des protéines. Les lipides cationiques entrant le plus souvent dans la composition des liposomes cationiques comprennent la dioctadécylamidoglycyl-spermine (DOGS ou Transfectam), le bromure de dioléoyloxy-propyl-triméthylammonium (DOTMA), le dioléoyloxy-3-(triméthylammonio) propane (DOTAP). Les phospholipides tels que la

dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le cholestérol et ses dérivés, sont les molécules neutres les plus utilisées³¹⁴.

4.2.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des complexes ADN/liposomes cationique (lipoplexes)

Plusieurs hypothèses différentes ont été proposées à propos des mécanismes de formation et de la structure des particules formées par la complexation de l'ADN et de liposomes cationiques. Certains groupes de recherche suggèrent qu'au lieu de condenser l'ADN, les liposomes cationiques ne feraient que s'absorber à la surface de l'ADN chargé négativement ; la taille et la structure originales de l'ADN étant ainsi préservées^{315, 316}. Cependant, d'autres groupes de recherche soutiennent plutôt qu'à une densité critique de liposomes, l'ADN plasmidique cause la fusion des liposomes induisant la condensation de l'ADN en nanostructures, l'encapsulation de l'ADN entre une bicouche lipidique et la formation de lipoplexes avec une charge nette positive. Les interactions responsables du phénomène de condensation seraient principalement de type ionique³¹⁷. L'observation de la formation et de la structure des lipoplexes par microscopie électronique à transmission (MET) a permis de vérifier ces hypothèses contradictoires³¹⁸⁻³²¹. Les résultats indiquent que lors de l'ajout des liposomes cationiques à l'ADN, il y a formation d'agrégats de grande taille composés d'un assemblage de plusieurs petites vésicules denses et très condensées, ou formation de systèmes hétérogènes composés de structures sphériques irrégulières et agrégées et de fibres d'ADN entourées de lipides (structure spaghetti).

4.2.2.2. Internalisation cellulaire des lipoplexes

La nature de la membrane cellulaire variant d'un type de cellules à l'autre et la possibilité de différents mécanismes d'internalisation en fonction de la composition des lipoplexes rendent difficile l'établissement d'un seul et unique mécanisme explicatif pour l'internalisation cellulaire par ces molécules de transport. Des hypothèses contradictoires ont été proposées à propos des mécanismes impliqués dans la livraison intracellulaire de l'ADN par les systèmes lipidiques. Premièrement, il fut suggéré qu'une fusion entre les lipoplexes et la surface cellulaire permettait l'internalisation de l'ADN dans la cellule^{315, 322-324}. Deuxièmement, un mécanisme d'endocytose a été suggéré suite à la démonstration, que des

lipoplexes sont présents dans les compartiments endosomaux suite à la transfection de cellules en culture³²⁵. Par contre, étant donné l'incompatibilité entre la taille des lipoplexes (souvent de l'ordre de 1 µm) et celle des vésicules de clathrine impliquées dans l'endocytose clathrine-dépendante (~100 nm), il a été suggéré qu'un type particulier d'endocytose clathrine-indépendante serait responsable de l'internalisation des lipoplexes³²⁶⁻³²⁸. Des interactions électrostatiques entre les charges positives des lipoplexes cationiques et la charge négative de la membrane cellulaire pourraient permettre un mécanisme d'endocytose adsorptive^{320, 329}. Troisièmement, une étude a démontré indirectement qu'il est peu probable que les lipoplexes soient internalisés par un mécanisme d'endocytose puisque l'utilisation de la chloroquine [une substance chimique utilisée *in vitro* pour induire le bris des vésicules endosomales et pour inhiber les nucléases lysosomiales] ne permet pas d'augmenter l'efficacité de transfection des lipoplexes³³⁰.

4.2.2.3. Efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* des lipoplexes

In vitro, les lipides cationiques sont largement utilisés pour leur forte efficacité de transfection. Leur efficacité de transfection *in vitro* dépend largement de la formulation chimique du système lipidique utilisé et du type de cellules transfectées³³¹. *In vivo*, selon la formulation utilisée, l'expression de gènes exogènes par l'utilisation de lipoplexes a été démontrée au niveau des muqueuses nasales, des poumons, du cerveau, de différents types de tumeurs, du foie, du thymus, des ganglions, du côlon, du cœur et de la peau³³²⁻³³⁵. Quelques liposomes cationiques ont aussi fait l'objet d'essais cliniques dans le cadre du traitement de certains cancers^{336, 337}, de la fibrose kystique³³⁸ et de problèmes cardiovasculaires³³⁹. De plus, des immunisations expérimentales par ADN chez la souris, indiquent que l'injection intramusculaire d'une formulation liposomes cationiques/ADN augmente l'immunogénicité du vaccin^{340, 341}. L'effet adjuvant des liposomes sur le système immunitaire dépend du lipide cationique utilisé et est caractérisé par le relâchement systémique de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12, TNF-α et l'INF-γ³⁴².

L'efficacité *in vivo* des lipoplexes s'avère relativement basse comparativement aux vecteurs viraux³⁴³. De plus, les lipoplexes sont fortement toxiques avec l'utilisation répétée³⁴⁴ en plus de causer une réponse inflammatoire importante³⁴⁵.

4.2.3. Les polymères cationiques

Suite à la détermination des inconvénients liés à l'utilisation *in vivo* des lipides cationiques, les polymères cationiques (polycations) ont été largement étudiés comme système de livraison. Ce système de livraison cationique a la particularité de condenser très efficacement l'ADN, de permettre la formation de complexes avec une charge nette de surface positive et de former des particules beaucoup plus stables en solution que les lipoplexes³⁴⁶. Les principaux polymères cationiques rapportés dans la littérature sont la polyéthylèneimine (PEI) et ses dérivés³⁰², les dendrimères de poly(amidoamine)s (PAMAM)³⁴⁷, la poly-L-lysine (PLL)³⁴⁸ et la chitosane³⁴⁹.

4.2.3.1. Propriétés de surface des complexes

Lors de l'ajout progressif de polycation à l'ADN, les charges positives du polymère masquent graduellement les charges négatives de l'ADN. La charge électrique nette à la surface du complexe (le potentiel zeta (ξ)) est largement influencée par le rapport (φ) de charges positives du polycation sur celui des charges négatives de l'ADN. En absence de sels, il y a formation de complexes avec une charge nette négative lorsqu'un nombre supérieur de charges négatives est présent ($\varphi < 1$), des complexes neutres sont formés lorsque des quantités équimolaires de charges positives et négatives sont présentes ($\varphi = 1$) et des complexes positifs sont formés lorsque les charges négatives de l'ADN sont en majorité neutralisées ($\varphi > 1$).

4.2.3.1.1. Potentiel ζ des complexes et internalisation cellulaire

Le potentiel ζ peut être une caractéristique utilisée pour prédire l'efficacité de transfection des complexes; il représente en quelque sorte le niveau d'affinité des complexes avec la membrane cellulaire^{351, 353, 354}. Généralement, l'efficacité de transfection

in vitro est optimale pour des valeurs positives élevées de potentiel ζ ^{351,330, 355, 356}. Le potentiel ζ optimal pour s'assurer d'une efficacité de transfection maximale est propre à chaque polycation utilisé. En général, les polycations doivent permettre la formation de complexes avec un potentiel ξ d'environ 20-40 mV ^{330, 355}.

La formation de complexes avec un potentiel ξ positif facilite les interactions non spécifiques avec les composantes anioniques de la membrane cellulaire (protéoglycans, glycoprotéines et glycolipides) et augmente le niveau d'internalisation des complexes dans la cellule par un mécanisme d'endocytose absorbante non spécifique. Ce mécanisme est caractérisé par des interactions électrostatiques entre les particules cationiques et les composantes anioniques présentes à la surface des cellules ³⁵⁰⁻³⁵². Ces dernières servent de "récepteur non spécifique" aux particules cationiques. L'efficacité de transfection des cellules d'ovaires de hamster chinois mutantes (CHO), déficientes en protéoglycans, par des complexes chargés positivement est 53× plus faible que la transfection des cellules sauvages. La concentration variable des protéoglycans à la surface des différents types de cellules pourrait expliquer pourquoi certains des cellules sont plus susceptibles que d'autres à la transfection par ce type de molécules ³⁵⁰.

4.2.3.2. Diamètre et morphologie des complexes

L'ADN est un biopolymère semi-flexible caractérisé par une structure chimique très organisée et une certaine rigidité expliquée par la présence de répulsions électrostatiques mutuelles entre les groupements phosphates adjacents chargés négativement. En présence d'ions cationiques multivalents, l'ADN subit une compaction spectaculaire et spontanée en une structure dense et très ordonnée ³⁵⁷⁻³⁶². Dans cette conformation, l'ADN n'occupe que 10^{-3} - 10^{-4} de son volume initial ³⁵⁸. Il y a une diminution des forces répulsives entre les brins d'ADN par la neutralisation des charges négatives et/ou la réorientation des molécules d'eau près de l'ADN et une augmentation des forces attractives entre les brins d'ADN favorisant l'enroulement de l'ADN sur lui-même. Approximativement 85-90% des charges de l'ADN doivent être neutralisées pour un état de condensation optimal ³⁶³. Lors du phénomène de condensation de l'ADN, la réorientation des molécules d'eau peut modifier l'état d'hydratation de l'ADN, ce qui aura un impact au niveau de la structure secondaire et

de l'expression de l'ADN. La majorité des polycations préservent la conformation de type B de l'ADN lors du phénomène de condensation ³⁶⁴ bien que différentes conformations résultant de différents états d'hydratation aient été rapportées ^{365, 366, 367, 368, 369}.

Dans le cas du transfert de gènes, la condensation de l'ADN diminue significativement la dimension du matériel à internaliser, masque les charges négatives de l'ADN nuisant aux interactions électrostatiques avec la membrane cellulaire et protège l'ADN des nucléases ³⁷⁰. Règle générale, la seule exigence pour qu'un cation condense l'ADN est qu'il possède au minimum trois charges positives; peu importe le type d'ions multivalents ou de polymères cationiques utilisés, l'ADN subira le même processus de condensation ³⁵⁵. Généralement, à un ϕ particulier à chacun, tous les cations peuvent former des nanoparticules d'ADN d'un diamètre moyen de 100 nm ^{355, 362, 364, 371, 372}.

La masse moléculaire du polycation influence la taille des complexes. Par exemple, la chitosane d'une masse moléculaire de 7000 Da permet la condensation de l'ADN en des nanostructures de 150 nm alors que la chitosane de 540 kDa forme des complexes d'un diamètre > 500 nm ³⁷³. Le même phénomène est observé avec la PLL ³⁷¹. Des complexes formées avec de la PLL d'une masse moléculaire de 224 kDa ont un diamètre variant de 120-300 nm, alors que de la PLL de 3970 Da produit des complexes d'un diamètre de 20-30 nm ³⁷¹.

Les nanoparticules ont principalement une structure toroïdale mais des structures intermédiaires ("rods-like") sont quelque fois observées en faible proportion (Figure 7 b) ^{321, 374}. La morphologie toroïdale est un modèle idéal pour l'étude de la formation de particules par le repliement d'un polymère semi-flexible, pour la compréhension des systèmes biologiques nécessitant un niveau d'empaquetage important du matériel génétique (capside virale, spermatozoïde) et pour son potentiel d'utilisation dans les systèmes de livraison de gènes. D'excellentes revues de littérature ont été publiées à propos de l'architecture toroïdale adoptée par l'ADN et des mécanismes impliqués dans la formation de ce type de structure ^{358, 375, 376}.

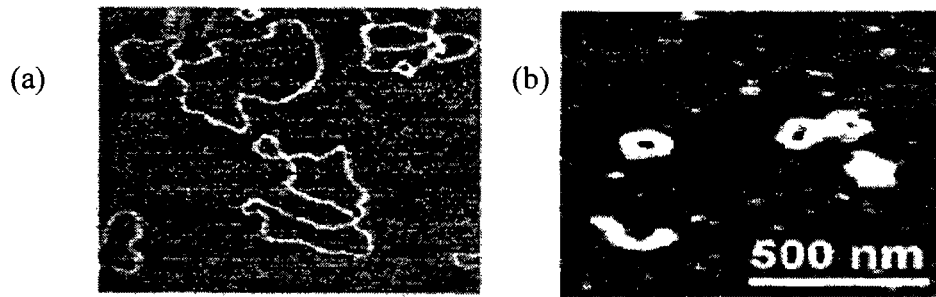


Figure 7. Condensation de l'ADN par la poly-L-lysine. Microscopie à force atomique. (a) ADN plasmidique seul (6800 pb), (b) Toroïdes et "rod-like" structures formés par la complexation de l'ADN plasmidique par la poly-L-lysine³⁷⁴

La morphologie toroïdale suggère que les brins d'ADN sont enroulés successivement autour d'un cercle imaginaire en ne passant jamais par le centre de ce cercle, tel que l'enroulement d'une corde ou d'un boyau d'arrosage autour d'un cylindre. De plus, pour un compactage maximum, les brins d'ADN doivent théoriquement être empacés en un réseau hexagonal hautement ordonné (Figure 8). Cette disposition particulière a été démontrée grâce à des études en microscopie électronique à transmission (MET) de type "freeze-fracture"³⁷⁷. L'ADN semble effectivement s'enrouler "circonférentiellement" à la surface de la structure toroïdale. La diffraction des rayons X a permis de confirmer l'arrangement structural de l'ADN dans les toroïdes. L'espace inter-hélice de l'ADN dans les toroïdes supporte l'hypothèse de la condensation hexagonale³⁷⁸. Finalement, la MET cryogénique a permis d'observer l'architecture tridimensionnelle de l'ADN à l'intérieur des nanoparticules et de confirmer définitivement l'organisation hexagonale de l'ADN dans les toroïdes³⁷⁹⁻³⁸².

La formation de toroïdes est indépendante de la nature de l'agent condensant, de la séquence et de la taille de l'ADN³⁵⁹. Par exemple, des particules toroïdales de 100 nm ont été observées pour des fragments d'ADN variant de 1 à 50 kb³⁵⁹. L'ADN de 50 kb formerait des toroïdes monomoléculaires alors que des toroïdes résultant de la condensation de fragments d'ADN de petite taille seraient polymoléculaires^{359, 383}. À partir des dimensions des toroïdes et de l'empaquetage hexagonal de l'ADN (Figure 8), il a été déterminé que le nombre moyen de molécules d'ADN par toroïde serait de 13 +/- 4 et 26 +/- 11 pour des condensats formés avec de l'ADN de 2700-bp et 1350-bp, respectivement^{359, 383}.

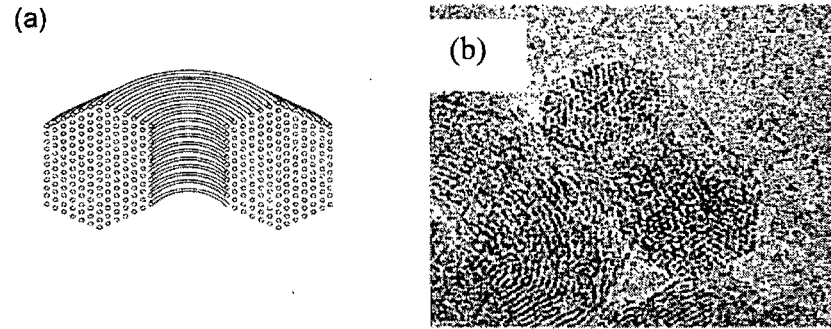


Figure 8. Structure toroïdale. (a) Schématisation idéalisée d'un toroïde dans lequel l'ADN est "circonférentiellement" empaqueté dans un treillis hexagonal ³⁷⁶, (b) Image de MET cryogénique de l'organisation hexagonale de l'ADN à l'intérieur d'un toroïde ³⁸¹.

Bien que la séquence et la taille de l'ADN aient peu d'impact sur la formation des toroïdes, l'impact de la topologie de l'ADN semble cependant contradictoire. Alors que qu'il a été démontré que le diamètre des particules est relativement équivalent lorsque de l'ADN linéaire, superenroulé ou circulaire est utilisé ³⁸⁴, d'autres groupes de recherche ont plutôt démontré que les vecteurs superenroulés et circulaires forment des toroïdes avec un diamètre inférieur de 25-30% par rapport aux vecteurs linéaires ^{359, 383}.

Le large éventail de conditions permettant la formation de toroïdes d'une taille limite et constante suggère que cette morphologie particulière représente un état d'énergie minimum, thermodynamiquement favorable, pour l'ADN condensé ³⁵⁹. Initialement, les études avaient cherché à expliquer la formation des toroïdes par un modèle purement thermodynamique ^{359, 366, 385}. En réalité, la formation des toroïdes s'est avérée être un mécanisme beaucoup plus complexe; regroupant à la fois des facteurs thermodynamiques et cinétiques ^{379, 386}. L'existence de facteurs cinétiques pour expliquer la formation et la taille limite des toroïdes a été proposée ³⁷⁹. La dynamique de la formation d'une boucle initiale (phénomène de nucléation) serait le facteur déterminant du diamètre interne du toroïde et dicterait la taille des boucles suivantes. La nucléation se produit par un contact étroit entre deux régions d'une molécule d'ADN. Par la suite, plusieurs recherches ont appuyé l'hypothèse de ce modèle et ont ajouté des évidences supportant que la formation de toroïdes d'ADN serait initialement induite par des contraintes cinétiques ³⁸⁷⁻³⁹².

4.2.3.2.1. Diamètre et efficacité de transfection

À la lumière des différents mécanismes cellulaires [présentés à la section 3.1] permettant l'internalisation de particules dans la cellule et des contraintes associées à la taille des particules internalisées, le diamètre des complexes est un paramètre important puisqu'il influencera son niveau d'internalisation. Des corrélations entre la taille des complexes, l'efficacité de transfection *in vitro* et les mécanismes responsables de leur internalisation ont rarement été rapportées dans la littérature. La majorité des études rapportent seulement l'efficacité de transfection en fonction de la taille des complexes et ne suggèrent pas de mécanismes particuliers pour expliquer l'internalisation.

Les complexes d'un diamètre variant de 100 à 200 nm ont d'excellents niveaux de transfection *in vitro*³⁹³⁻³⁹⁵. Par exemple, une forte corrélation entre la taille de complexes formés de PLL, d'un ligand transferrine (permettant la liaison à un récepteur particulier pour une endocytose spécifique des complexes) et d'ADN (PLL-Tf/ADN), et l'internalisation cellulaire a été démontrée. Les complexes PLL-Tf/ADN d'un diamètre de 80-100 nm ont une forte efficacité de transfection, comparativement à des complexes de tailles supérieures³⁹⁶. Des résultats similaires ont été rapportés pour une banque de 70 polycations (poly(beta-amino esters)) différents : les complexes de petits diamètres (< 200 nm) transfectent nettement mieux que les plus larges (≥ 400 nm)³⁵¹.

Cependant, plusieurs études ont démontré le phénomène contraire^{330, 397, 398}. Des complexes de PLL d'un diamètre de 500 nm ont des niveaux d'expression supérieurs à des complexes de PLL d'un diamètre de 50 nm³⁹⁸. Il a aussi été démontré que l'efficacité d'expression de petits complexes de PEI de 30-60 nm est 10 à 100 fois plus faible que celle d'agrégats de PEI d'un diamètre de ~ 1000 nm³⁹⁷. Pour expliquer la plus faible efficacité des petits complexes de PEI, il a été suggéré que : (i) les petits complexes ont plus de difficulté à déstabiliser l'endosome à cause de leur faible concentration en PEI, comparativement aux agrégats et que (ii) les petits complexes doivent rester plus longtemps en suspension et avoir ainsi moins de chance de rencontrer la membrane cellulaire, comparativement aux plus grosses particules qui auraient plutôt tendance à rapidement sédimenter sur les cellules. Pour vérifier cette hypothèse, il a été démontré grâce à une

technique de cytométrie en flux que les complexes PEI/ADN d'un diamètre de 100 nm sont rapidement internalisés, comparativement aux complexes agrégés qui ont plutôt tendance à se déposer à la surface de la membrane cellulaire et à être peu internalisés³⁹⁹. Cependant, au niveau de l'expression du gène rapporteur, les résultats de la même étude indiquent que les complexes PEI/ADN agrégés ont une efficacité supérieure comparativement aux plus petits, malgré qu'ils soient moins bien internalisés.

Récemment, des résultats intéressants ont été publiés à propos des mécanismes cellulaires impliqués dans l'internalisation de complexes formés avec de la PLL ou de la PEI en fonction de leur taille⁴⁰⁰. La MET et la microscopie confocale ont été utilisées pour examiner le transport intracellulaire des complexes *in vitro*. Les complexes d'une taille inférieure ou égale à 100 nm sont internalisés par un mécanisme d'endocytose caveolae-dépendante, et acheminés par la suite vers le RE. Cette observation est consistante avec la taille des caveolae (50-80 nm)⁴⁰¹. Pour les complexes > 200 nm, la macropinocytose est responsable de l'internalisation. Finalement, dans le cas des complexes contenant un ligand pour une endocytose récepteur-spécifique et d'une taille intermédiaire (100-200 nm), les résultats indiquent que l'internalisation est rapide et a principalement lieu grâce à une endocytose spécifique clathrine-dépendante⁴⁰⁰. Dans le cas des complexes chargés positivement d'une taille inférieure à 150-200 nm ne possédant pas de ligands spécifiques, plusieurs études ont démontré qu'ils sont internalisés par macropinocytose ou par un mécanisme d'endocytose absorbante non spécifique^{351, 396, 402, 403}.

4.2.3.2.2. Diamètre et transport cytoplasmique

La taille des complexes est aussi un facteur à considérer lors de leur transport cytoplasmique vers le noyau. Théoriquement, des particules d'un diamètre supérieur à 54 nm sont complètement immobiles dans le cytoplasme⁴⁰⁴ mais la migration de complexes d'un diamètre supérieur dans le cytoplasme vers le noyau s'expliquerait par des interactions avec les microtubules ou les filaments d'actine⁴⁰⁵. Plusieurs études supportent cette hypothèse. Premièrement, des expériences *in vitro* ont démontré que les complexes PEI/ADN ont une forte attraction pour les microtubules purifiés (observations non publiées mais discutées dans⁴⁰⁶). Deuxièmement, une étude rapporte que les microtubules

permettent un transport actif et rapide des complexes PEI/ADN d'une taille de 156 ± 9 nm vers la région périnucléaire ⁴⁰⁷. Finalement, l'implication des microtubules pour l'accumulation nucléaire des complexes PEI/DNA et de PLL/ADN a été démontrée par l'inhibition complète du transport périnucléaire des complexes par l'induction de la dépolymérisation des microtubules par la présence d'un composé chimique (la colchicine) ⁴⁰⁸.

4.2.3.2.3. Diamètre, morphologie et internalisation nucléaire

Dans le cas des complexes formés de polymères cationiques et d'ADN, de nombreuses études ont démontré que l'ADN et les polymères sont présents dans le noyau ^{223, 400, 409-411}, comparativement aux lipoplexes dont les évidences actuelles suggèrent que seul l'ADN est internalisé dans le noyau ^{320, 329, 412}.

Pour être internalisées au noyau, les particules d'un diamètre supérieur à 9 nm doivent utiliser la mitose ou le transport actif via les CPNs (section 3.1.2.3.). Le diamètre des complexes devient alors une caractéristique importante pour assurer un transfert efficace dans le noyau. Théoriquement pour être importées par transport actif à travers les CPNs, les particules doivent avoir au maximum un diamètre de 25 à 40 nm. En réalité très peu de complexes polymères/ADN démontrant une bonne efficacité de transfection possèdent la taille théorique requise. La majorité des études ne suggèrent pas de mécanismes pour l'internalisation nucléaire des complexes d'un diamètre supérieur à 40 nm mais rapportent seulement l'efficacité de transfection et la cinétique de l'apparition nucléaire des complexes (l'ADN plasmidique est présent dans le noyau entre 1h et 6h après l'initiation de la transfection). Par exemple, bien qu'il a été démontré que l'efficacité de transfection de complexes de PEI de 30-60 nm de diamètre est 10 à 100 fois plus faible que celle des agrégats de PEI d'un diamètre de ~ 1000 nm, aucune explication n'est disponible a propos du fait que l'internalisation nucléaire devrait théoriquement être supérieure pour les petits complexes ³⁹⁷.

Point intéressant, certaines études ont souligné que la morphologie des complexes serait une caractéristique physico-chimique plus importante que la taille ^{223, 353, 405}. Des

particules d'un diamètre de 40-60 nm possédant une morphologie toroïdale permettent des niveaux d'expression plus élevés que des particules circulaires et irrégulières de 27 nm^{223, 353, 405, 413}

4.2.3.3. Stabilité des complexes

La nature de l'agent condensant influence fortement la stabilité et l'agrégation des complexes en solution. La stabilité des particules en solution s'explique par la dominance de forces répulsives, majoritairement de type électrostatique, qui éloignent les particules les unes des autres. Les forces attractives, généralement des forces de van der Waals, sont responsables de l'agrégation des particules. L'agrégation se produit lorsque les forces de répulsion sont réduites et que les forces attractives sont augmentées; il y a alors association physique entre les particules. Généralement, les complexes agrégés observés par MET sont composés d'un ensemble de toroïdes interconnectés par des segments d'ADN non condensés. Très peu d'études démontrent les éléments impliqués dans le mécanisme d'agrégation et les conditions particulières sous lesquelles il se produit; les études indiquent seulement que la ligne est fine entre la stabilisation et l'agrégation des particules en solution.

Tang et Szoka ne sont pas en accord avec le modèle "attraction/répulsion" électrostatique pour décrire le phénomène d'agrégation observé dans le cas des polymères cationiques³⁵⁵. Selon eux, les caractéristiques intrinsèques du polycation influencent la stabilité et l'agrégation des complexes en solution. Ils ont démontré que des complexes d'une taille de 40-60 nm formés avec des dendrimères "intacts" ou de la PLL ont tendance à agréger rapidement en des particules de $\sim 1 \mu\text{m}$, alors que les complexes formés avec de la PEI ou des dendrimères "fracturés" [avec le même potentiel ξ , la même morphologie et la même taille que ceux formés avec la PLL et les dendrimères intacts] ne démontrent pas de phénomène d'agrégation en solution.

Des complexes stables sont formés lorsqu'il y a un excès de charges positives ou négatives [ξ positif ($\varphi > 1$) ou ξ négatif ($\varphi < 1$)] alors que les complexes insolubles sont généralement observés près de la zone d'électroneutralité ($\xi = 0$, $\varphi = 1$). Une étude rapporte l'évolution du diamètre et de la stabilité des complexes formés avec de la PLL en fonction

du φ ³³⁰. Elle rapporte que lorsque $\varphi < 1$, le diamètre des complexes (~ 200 nm) augmente progressivement et atteint un maximum (~ 700 nm) à l'électroneutralité ($\varphi = 1$). Pour des $\varphi > 1$, le diamètre des particules diminue progressivement et à un $\varphi > 3$, des particules stables de 200 nm sont formées. Habituellement, pour favoriser la stabilité d'un complexe, son potentiel ξ doit être $\sim 20-40$ mV^{330, 355}.

Un exemple de l'influence de la nature de l'agent condensant sur la stabilité des complexes et le phénomène d'agrégation des particules est la différence qui existe entre les complexes formés avec des cations multivalents de faible masse moléculaire (spermine, spermidine) et ceux formés avec des polymères cationiques. Bien que les cations multivalents de faible masse moléculaire forment des particules toroïdales similaires à celles formées par des polymères cationiques^{355, 357-359, 362}; ils ont une affinité relativement faible pour l'ADN⁴¹⁴. L'association et la dissociation rapides des cations multivalents avec l'ADN diminuent la stabilité des complexes en solution. Même en excès, ils ont seulement la capacité de former des particules avec une charge nette de surface près de l'électroneutralité ($\varphi=1$). Contrairement aux cations multivalents, les polymères cationiques ont une forte affinité de liaison pour l'ADN. En excès, ils forment des complexes avec une charge de surface fortement positive qui assure les répulsions électrostatiques entre les complexes et la stabilité des particules en solution.

4.2.3.3.1. Méthode de préparation des complexes et stabilité

L'addition du polycation à l'ADN (ou vice-versa), la concentration d'ADN, la concentration en sels de la solution ainsi que la dilution des complexes suite à leur préparation sont des facteurs qui influencent l'efficacité de condensation et la stabilité des complexes⁴¹⁵. Le procédé de complexation est un élément très important : des complexes de petite taille sont facilement obtenus par l'addition graduelle de petites quantités de polymères cationiques à l'ADN, comparativement à l'ajout rapide de tout le polycation ou de l'ajout de l'ADN au polycation⁴¹⁶. L'addition graduelle de polycations à l'ADN, favorise la condensation graduelle de chaque molécule d'ADN en nanoparticules et prévient l'agrégation intermoléculaire de l'ADN. De plus, à forte concentration d'ADN, les

complexes sont instables et ont tendance à agréger facilement. Par exemple, l'ajout PLL à une solution d'ADN à une concentration de 20 $\mu\text{g/mL}$, permet la formation de nanoparticules d'un diamètre variant de 30 à 60 nm avec une faible polydispersité de taille alors qu'à une concentration d'ADN de 400 $\mu\text{g/mL}$, des particules d'un diamètre moyen de ~ 160 nm avec une polydispersité importante sont formées³⁵³. Finalement, l'agrégation des complexes est un problème inévitable à forte concentration de sels (forte force ionique) et dans les conditions de tamponnement physiologiques. L'augmentation des forces ioniques dans un système colloïdal réduit les répulsions électrostatiques et augmente les forces attractives entre les particules favorisant l'agrégation des particules. La précipitation de l'ADN par les polycations augmente graduellement avec l'augmentation de la concentration de sels et à très forte concentration de sel (> 0.12 M), il y a précipitation complète des particules en solution et prévention de la formation de complexes solubles chargés positivement⁴¹⁷.

Pour augmenter la stabilité des complexes en solution et pour diminuer les interactions avec les biomolécules lors de leur utilisation *in vivo*, des polymères hydrophiles non cationiques (tels que le dextran ou le polyéthylène glycol (PEG)) peuvent être ajoutés directement aux complexes ou liés chimiquement lors du processus de synthèse du polymère^{368, 418}. Suite à la complexation avec l'ADN, les segments hydrophiles s'organisent à l'extérieur du complexe et grâce à l'encombrement stérique, favorisent la solubilité des complexes. De nombreuses études rapportent que le greffage de dextran ou de PEG à la PLL permet la formation des complexes solubles et beaucoup plus stables et ce, même à plus forte concentration d'ADN, comparativement à la formation standard de complexes PLL/ADN^{418, 419}.

4.2.3.4. Forces d'association et de dissociation des complexes

La force des interactions électrostatiques liant les polycations à l'ADN est un facteur important tant au niveau de la formation des complexes qu'au niveau de la dissociation de l'ADN des polycations. Si l'affinité entre les deux est trop faible, les complexes peuvent se défaire prématurément durant la livraison du gène au noyau alors que si elle est trop forte, la dissociation peut n'avoir jamais lieu empêchant ainsi l'expression du transgène. Lorsque

la force des interactions électrostatiques est suffisante, elle prévient la dissociation du complexe par les petites molécules anioniques et permet en présence de polyions des échanges ioniques causant la dissociation du complexe ^{357, 419}. Le phénomène "association/dissociation" est un évènement complexe influencé par plusieurs paramètres différents tels que la force ionique du milieu, la nature du contre-ion, la densité de charge du polymère et les paramètres moléculaires des polyions rencontrés ^{357, 420, 421}.

Les caractéristiques d'association et de dissociation des polycations ont un effet crucial sur les propriétés biologiques des complexes, elles influencent la résistance aux nucléases et l'efficacité de transfection. Par exemple, un groupe de recherche a déterminé les caractéristiques d'association et de dissociation de la PLL, du poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate) (pDMAEMA) et du poly(2-(triméthylamino)éthyl chlorhydrate) [p(TMAEMA)] avec l'ADN par l'ajout d'un excès de sels ou de polymères anioniques à la solution de complexation ⁴²². Le p(DMAEMA) et la PLL ont approximativement les mêmes caractéristiques d'association et de dissociation alors que le p(TMAEMA) a une forte affinité d'association pour l'ADN qui nuit au phénomène de dissociation. Cette différence d'affinité pour l'ADN explique la faible efficacité de transfection des complexes de p(TMAEMA), comparativement à celles des complexes de PLL ou de p(DMAEMA). Parallèlement à cette étude, une constante de dissociation (k_d) de la PLL et du p(DMAEMA) ⁴²³ a été déterminée et comparée. La k_d du p(DMAEMA) est plus importante que celle de la PLL et suggèrent que cette différence pourrait expliquer l'efficacité de transfection supérieure du p(DMAEMA), comparativement à celle de la PLL.

La localisation cellulaire où se produit la dissociation du polycation de l'ADN semble varier selon le type de polycation utilisé. Brièvement, dans le cas des systèmes cationiques lipidiques, des techniques de micro-injection permettant de déposer les lipoplexes directement au noyau ont démontré que leur présence au noyau ne permet pas les processus de transcription et/ou de traduction ^{223, 329}. Parallèlement, il a été démontré que l'ADN marqué avec un fluorescent apparaît au noyau alors que le lipide cationique marqué n'y apparaît pas ⁴²⁴. Basée sur ces expériences, l'hypothèse la plus probable est que la décomplexation des lipoplexes se produit avant l'entrée de l'ADN au noyau. Pour les polymères cationiques, il a été démontré qu'en plus de permettre le transport et de protéger

l'ADN jusqu'au noyau⁴⁰⁷, la PEI et PLL permettent l'expression du transgène même s'ils sont initialement complexés à l'ADN dans le noyau^{223, 409}.

4.2.3.5. Efficacité de transfection *in vitro*

L'expression *in vitro* de gènes rapporteurs dans des cellules en culture demeure actuellement le moyen le plus rapide et le moins dispendieux pour l'évaluation de l'efficacité de transfection des complexes et de leur cytotoxicité avant d'envisager leur utilisation *in vivo*. La comparaison directe de l'efficacité de transfection *in vitro* des polymères cationiques rapportés dans la littérature représente cependant une épreuve d'envergure puisque plusieurs différences existent entre les études au niveau : (i) de la méthode de préparation des complexes (concentration en ADN, force ionique de la solution de complexation, etc.), (ii) des caractéristiques physico-chimiques des complexes (taille, morphologie, potentiel ζ , stabilité en solution, force d'association/dissociation), (iii) des conditions de transfection (temps d'incubation, présence ou absence de sérum, etc.), (iv) du plasmide rapporteur (plasmide codant pour le gène de la luciférase, la β -galactosidase, la chloramphénicol acétyl transférase) (v) ainsi que le type de cellules (cellules en suspension, cellules adhérentes, culture de cellules primaires) utilisés^{330, 425, 426}.

4.2.3.6. Efficacité de transfection *in vivo*

Comparativement aux nombreuses études de transfection *in vitro*, un nombre restreint de rapports a été publié à propos de l'efficacité de transfert de gènes par des polycations *in vivo*. L'utilisation *in vivo* de complexes (polymères cationique/ADN) a jusqu'à présent démontré des succès limités et des problèmes de reproductibilité importants. L'extrapolation des résultats positifs obtenus *in vitro* à l'*in vivo* est difficile et l'absence de corrélation entre les efficacités de transfection rend les expériences *in vivo* compliquées⁴²⁷. Des complexes possédant une charge de surface positive pour obtenir des niveaux de transfection élevés *in vitro* réduit fortement l'efficacité *in vivo* des complexes puisqu'elle favorise des interactions avec les protéines sériques en plus de causer une toxicité cellulaire importante. De plus, le potentiel ζ positif des complexes efficaces *in vitro* a un impact immunologique important *in vivo*: un excès de charges positives cause l'activation du complément⁴²⁸.

L'efficacité de transfection *in vivo* des systèmes cationiques semble être particulière au polycation utilisé, au site d'injection ainsi qu'aux cellules ciblées. La majorité des études rapportant l'efficacité de transfection de complexes *in vivo* ont utilisé l'administration intraveineuse de complexes contenant des ligands particuliers (transferrine, galactose, mannose, lactose, peptide, anticorps) pour cibler la transfection des cellules désirées^{396, 429-431}.

4.2.3.7. Les principaux polymères cationiques

4.2.3.7.1. La poly-L-lysine

La PLL est un polymère cationique linéaire (Figure 9 (b)) possédant des amines primaires sur ses chaînes latérales. Au pH physiologique, les amines primaires sont presque totalement protonées. La PLL condense l'ADN plasmidique en des particules d'une taille de ~100 nm. La PLL a été abondamment utilisée pour élucider les mécanismes particuliers de condensation de l'ADN en structures toroïdales³⁵⁸. La PLL disponible sur le marché possède une hétérogénéité au niveau de sa masse moléculaire influençant la taille, la distribution de tailles et la stabilité des complexes formés. L'augmentation de la masse moléculaire de la PLL de 3900 à 244 000 Da élève la taille moyenne des complexes de 20-30 nm à 120-130 nm³⁷¹.

In vitro, les complexes formés avec la PLL ont un très faible pouvoir transfectant comparativement aux autres types de polymères cationiques populaires (PEI branchée ou dendrimères fracturés)^{355, 356,432}. La faible efficacité de transfection *in vitro* de la PLL s'explique par l'emprisonnement des complexes dans l'endosome suite à leur internalisation^{415, 433-435}. La PLL ne possède pas de caractéristiques chimiques intrinsèques permettant la libération des complexes de l'endosome suite à l'internalisation par endocytose.

In vivo, la PLL a très peu été utilisée seule⁴³⁶⁻⁴⁴¹. Cependant, en présence de groupements fonctionnalisés, l'injection intraveineuse de complexes PLL-Transferrine/ADN ou de PLL-galactose/ADN d'une taille homogène de 15 nm, permet d'obtenir une expression à long terme du gène rapporteur dans le foie⁴⁴².

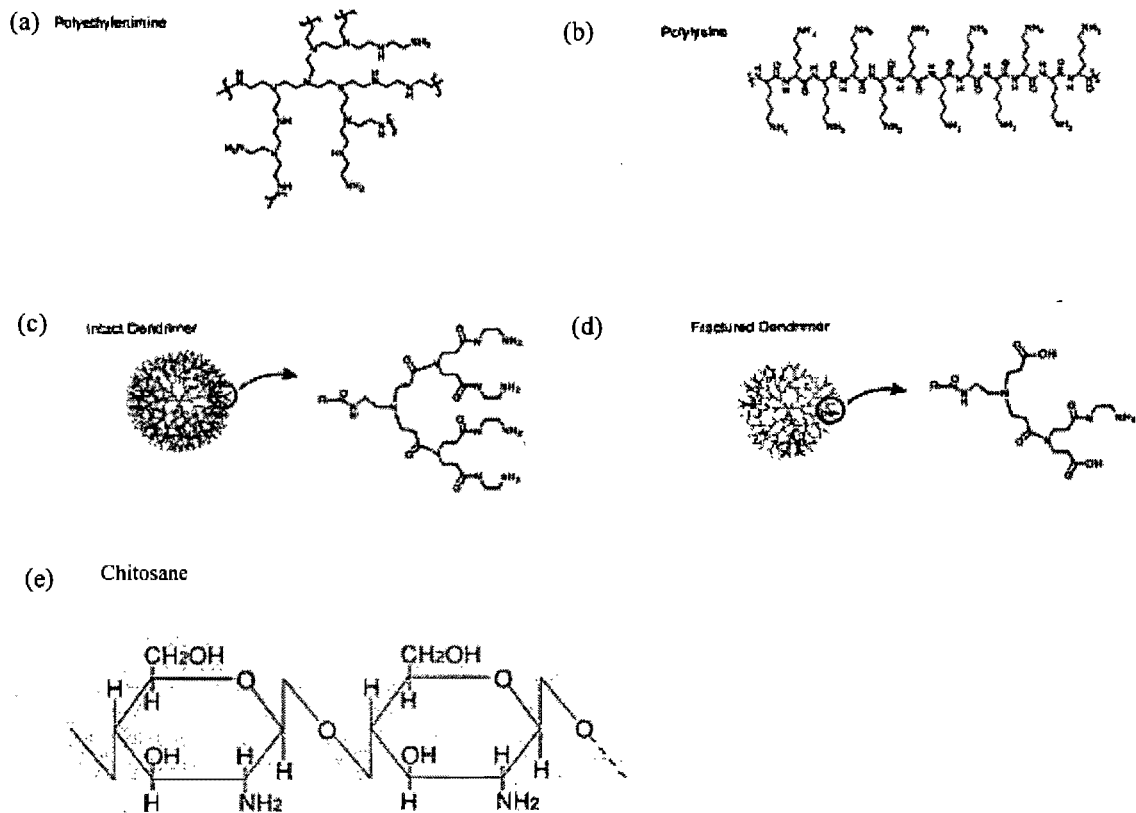


Figure 9. La structure chimique et la schématisation de l'organisation physique des principaux polymères cationiques^{302,355}.

4.2.3.7.2. La polyéthylèneimine

En 1995, la PEI (Figure 9 a) a fait son apparition dans la communauté scientifique comme étant un polycation très polyvalent pour le transfert de gènes³⁰². Actuellement, la PEI est disponible à petit prix sur le marché dans une vaste gamme de poids moléculaires (200-800 000 Da) et de degrés de branchement. La PEI linéaire de 22 kDa et la PEI branchée de 25, 50 et 800 kDa sont les plus utilisées^{443, 444}.

La PEI est un polymère cationique; elle possède un nombre élevé de groupements amines (1 atome sur six est un azote). La PEI branchée de 25 kDa est composée de 25% d'amines primaires, de 50% d'amines secondaires et de 25% d'amines tertiaires³⁰². Au pH physiologique, les amines de la PEI sont partiellement protonées et le niveau de protonation augmente de 20 à 45% pour des valeurs de pH passant de 7 à 5⁴⁴⁵. Il s'agit d'une qualité intrinsèque importante lorsque la PEI se retrouve dans l'environnement acide de l'endosome. Le changement de pH induit la protonation des amines qui cause une cascade de réactions (tamponnement du pH endosomal, accumulation de protons, entrée d'ions chlorure, entrée de molécules d'eau) permettant l'éclatement de l'endosome et la libération des complexes dans le cytoplasme.

Les évidences actuelles suggèrent que l'efficacité de transfection *in vivo* et *in vitro* élevée de la PEI est, entre autre, attribuée à sa nature fortement cationique qui lui permet de condenser efficacement l'ADN en nanoparticules toroïdales stables avec une taille homogène moyenne de ~ 90 nm et à sa capacité de former des particules avec une charge nette de surface positive^{355, 371, 372, 396, 446}. L'efficacité de la PEI est aussi expliquée par une forte internalisation des complexes par les cellules par endocytose absorbante, à sa capacité élevée de protéger l'ADN de la dégradation à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule⁴⁴⁷, à sa nature particulière de permettre la libération des complexes de l'endosome⁴⁴⁸ et à sa capacité de transporter efficacement et rapidement les nanocomplexes vers la région périnucléaire grâce à des interactions avec les microtubules cytoplasmiques⁴⁰⁷.

In vitro, la PEI 25 kDa est actuellement le polymère cationique le plus utilisé pour le transfert de gènes. Plus de 25 lignées cellulaires ont été efficacement transfectées avec la PEI^{302, 449-451}. Au niveau de la corrélation entre l'efficacité de transfection évaluée *in vitro* et le transfert de gènes *in vivo*, les complexes de PEI 50 kDa ou 800 kDa avec un potentiel ζ légèrement positif démontrant une transfection optimale *in vitro*, sont efficaces pour la livraison *in vivo*⁴⁴³. Cependant, dans le cas de la PEI branchée de 25 kDa, l'efficacité de transfection optimale *in vitro* est observée avec des complexes fortement chargés positivement alors que le transfert de gènes *in vivo* est possible avec des complexes au potentiel ζ près de l'électroneutralité^{446, 452, 453}.

In vivo, plusieurs études rapportent que l'injection au cerveau, aux reins, dans les tumeurs et aux poumons de formulations particulières préparées avec de la PEI sont relativement peu cytotoxiques et permettent une expression génique significativement supérieure, dans de nombreux cas, à l'injection d'ADN dans la saline^{443, 446, 452, 454, 455, 456}. L'efficacité de transfection *in vivo* des complexes de PEI est fortement influencée par le type de PEI utilisé (linéaire ou branché, de faible ou de haute masse moléculaire), le potentiel ζ des complexes, le type d'administration et le tissu ciblé. Par exemple, lorsque injectés directement au foie, les complexes formés avec de la PEI linéaire de 22 kDa ont d'excellents niveaux de transfection comparativement à ceux formés avec les formes branchées de PEI⁴⁵⁶. Au niveau des cellules pulmonaires, bien qu'une étude indique que l'efficacité de transfection de complexes formés de PEI linéaire (22 kDa) est supérieure (350 fois) à celle des complexes de PEI branchée (25 kDa)⁴⁵¹, trois autres équipes ont cependant démontré que les complexes formés de PEI 25 kDa permettent des niveaux de transfection supérieurs à l'injection d'ADN dans la saline ou de complexes formés avec d'autres types de PEI^{454, 455, 457, 458}. Finalement, pour le transfert de gènes directement dans le cerveau de souris adultes, l'évaluation de l'efficacité de transfection de la PEI a indiqué que les complexes de PEI 25 kDa/ADN dont le potentiel ζ se situait près de l'électroneutralité permet les plus hauts niveaux de transfert de gènes *in vivo*. Cette étude a aussi démontré que l'efficacité de transfection de la PEI branchée est inversement proportionnelle à sa masse moléculaire; les complexes formés avec la PEI 25 kDa sont significativement plus efficaces que ceux formés avec de la PEI de 50 et 800 kDa⁴⁴⁶. À noter, aucune étude ne rapporte l'efficacité des complexes de PEI au niveau du transfert de gènes *in vivo* dans les cellules musculaires.

Bien que la PEI soit un système de livraison synthétique efficace *in vivo*, il est cependant associé à une toxicité dose dépendante chez la souris et explique pourquoi il n'a pas été utilisé jusqu'à présent chez l'humain⁴⁵⁹. La toxicité de la PEI est en fonction de sa masse moléculaire. La PEI branchée de 25 kDa est particulièrement toxique comparativement aux autres formes branchées de PEI de plus petites masses moléculaires. Lorsque administrés aux poumons de l'animal, les complexes de PEI causent une inflammation par l'infiltration des neutrophiles et une diminution de la saturation d'oxygène artériel^{460, 461}. De plus, l'administration systémique de complexes de PEI cause une nécrose

du foie et une mort rapide (< 30 minutes) de l'animal occasionnées par l'activation du complément et un effet cytolytique important ⁴⁵⁹.

4.2.3.7.3. Les dendrimères

Les dendrimères sont des supramolécules possédant une structure tridimensionnelle branchée et sphérique (Figure 9 c et d). La charge de surface (le nombre d'amines primaires) et le diamètre des dendrimères influencent largement les interactions avec l'ADN lors du processus de condensation. Contrairement à la synthèse des macromolécules linéaires et branchées qui génère des produits avec une masse moléculaire variable, la synthèse des dendrimères permet de contrôler l'architecture du polymère et de générer des macromolécules de tailles homogènes. Le diamètre et la charge de surface des dendrimères sont déterminés par le nombre d'étapes de polymérisation. Des dendrimères dits de cinquième génération ont subi cinq étapes de polymérisation ³⁵⁶

Les dendrimères ont la particularité de condenser l'ADN plasmidique en des structures compactes (dendriplexes) d'environ 1 μm par des interactions électrostatiques entre ses amines primaires terminales et les groupements phosphates de l'ADN. Les dendrimères les plus étudiés sont les dendrimères de PAMAM, communément nommés dendrimères Starburst™. Cette classe particulière de dendrimères possède une structure unique, hautement branchée et sphérique, une taille uniforme (variant de 10 à 130 Å, selon le nombre d'étapes de polymérisation) et une forte densité de charge. Notons qu'au pH physiologique, les amines primaires des dendrimères de PAMAM ont la particularité de n'être que partiellement protonées.

In vitro, les dendrimères sont très efficaces pour la livraison de gènes dans une variété de cellules eucaryotes adhérentes et non-adhérentes ainsi que pour la livraison de gènes dans les cellules primaires ^{462, 463}. Les niveaux de transfection optimums sont obtenus avec des dendriplexes dont le potentiel ζ est positif. Il a été rapporté que la "fracturation" à la chaleur de la structure sphérique tridimensionnelle des dendrimères de type Starburst™ (Figure 9 d) permet une induction significative de leur efficacité de transfection *in vitro* ^{355, 464} et *in vivo* ⁴⁶⁵. L'induction de l'efficacité de transfection des dendrimères fracturés

semble être reliée à l'augmentation de leur flexibilité facilitant les interactions avec l'ADN et permettant une meilleure compaction de l'ADN. Des nanoparticules d'une taille de ~130 nm sont formées avec des dendrimères fracturés, comparativement à celle de 1 µm formées par les dendrimères non fracturés ³⁵⁵. *In vitro*, l'effet cytotoxique des dendrimères est dépendant de leur génération et de leur morphologie. Les dendrimères de haute génération et non fracturés sont plus toxiques ^{466, 467}. Comparativement aux liposomes cationiques et aux autres types de polymères cationiques, les dendrimères sont des molécules de transport peu cytotoxiques et très efficaces *in vitro* ⁴⁶³.

In vivo, plusieurs études rapportent l'efficacité des dendrimères de type Starburst™ de différentes générations pour la livraison d'agents thérapeutiques dans des cellules cancéreuses ⁴⁶⁸, pour la livraison de drogues dans des traitements antibactériens et antiviraux, pour la livraison de gènes dans le muscle cardiaque ^{465, 469} ainsi que pour la livraison d'oligonucléotides aux poumons pour combattre la fibrose kystique ⁴⁷⁰.

4.2.3.7.4. La chitosane

La chitosane est un polysaccharide naturel, non toxique, biocompatible, peu immunogène et biodégradable composé de deux unités (la D-glucosamine et la N-acétyl-D-glucosamine) liés par un lien beta-1,4-glycosidique (Figure 9 e). La densité de charge de la chitosane peut être contrôlée par la préparation d'une solution composée de différentes fractions d'unités N-acétyl-D-glucosamine ainsi que par la variation du pH de la solution de complexation ⁴⁷¹. Dans les conditions optimales, la chitosane cationique permet la condensation de l'ADN plasmidique en structures toroïdales d'une taille moyenne de 100 nm ^{471,472-474}

In vitro, les expériences de transfection ont démontré que l'efficacité de la chitosane est dépendante du type de cellules utilisé ^{349, 475, 476}. Dans certain cas, les complexes chitosane/ADN peuvent permettre des niveaux de transfection similaires à ceux de la PEI, tout en étant beaucoup moins cytotoxiques. ^{477, 478}.

In vivo, la chitosane est utilisée comme molécule de transport à cause de son adhérence efficace aux muqueuses. Des résultats de transfection avec des complexes

chitosane/ADN ont été rapportés dans le cas des muqueuses nasales ⁴⁷⁹, des cellules oculaires, des poumons, de l'épithélium gastro-intestinal et des cellules du système immunitaire des tissus lymphoïdes de l'intestin ⁴⁸⁰⁻⁴⁸³. Par exemple, l'administration intranasale d'un cocktail composé de plasmides d'ADN [codant pour des protéines immunogènes du virus respiratoire syncytial (VRS)] complexés avec de la chitosane chez la souris permet de diminuer significativement l'inflammation pulmonaire causée par le virus ⁴⁸⁴.

4.2.4. Fonctionnalisation des molécules de transport

Puisque les molécules de transport synthétiques et naturelles sont facilement modulables et modifiables, plusieurs stratégies visant à la création de systèmes de livraison fonctionnalisés plus efficaces que les polymères originaux ont été investiguées.

4.2.4.1. Ligand spécifique

Plusieurs ligands différents spécifiques à des récepteurs présents à la surface des cellules ont été incorporés chimiquement aux molécules de transport cationiques pour permettre une endocytose récepteur spécifique et l'expression du transgène seulement dans les cellules possédant le récepteur correspondant. L'asialoglycoprotéine ou des résidus de sucre ⁴⁴², la transferrine ^{396, 397}, différents anticorps dirigés contre des protéines de surface et des facteurs de croissance ^{440, 441} ont été étudiés. Les résultats indiquent que dans les conditions physiologiques *in vivo*, l'ajout de tels ligands au système de livraison favorise généralement l'agrégation des complexes et diminue leur efficacité.

4.2.4.2. Composante endo-lysomo-lytique

La libération des complexes des vésicules endosomales suite à leur internalisation dans la cellule par endocytose est essentielle pour permettre la localisation nucléaire de l'ADN et l'expression du transgène. Lorsque les polymères ne possèdent pas de caractéristiques intrinsèques permettant la libération des complexes de l'endosome, des composantes chimiques particulières stimulant la libération des complexes de l'endosome ou la lyse du lysosome peuvent être utilisées. La chloroquine et le DOPE (un lipide

fusogénique)⁴⁸⁵ sont des substances chimiques utilisées *in vitro* pour induire le bris des vésicules endosomales lors des essais de transfection. La libération des complexes emprisonnés dans l'endosome par ces molécules chimiques augmente le niveau d'expression génique *in vitro*^{330, 397, 418}. Cependant, leur utilisation *in vivo* est limitée puisqu'elles s'avèrent très toxiques.

Dans le cas de la PEI et des dendrimères, il semble que ces polymères possèdent des caractéristiques intrinsèques permettant leur libération de l'endosome^{302, 355}. Il s'agit de l'hypothèse de "l'éponge à protons"⁴⁸⁶. Au pH physiologique (pH 7), les amines de la PEI (pKa 5.5) et des dendrimères (pKa 3.9 et 6.9) sont partiellement chargées et lorsqu'elles se retrouvent dans l'environnement acide de l'endosome, le changement de pH induit leur protonation. Il y a alors tamponnement du pH endosomal accompagné d'une accumulation de protons, de l'entrée d'ions chlorure causant l'entrée de molécules d'eau qui font éclater l'endosome avec la libération des complexes dans le cytoplasme. Pour promouvoir la libération des complexes de l'endosome, l'hypothèse de "l'éponge à protons" a été exploitée lors de la synthèse de nouveaux polymères. La synthèse de polymères contenant des amines tertiaires ou des groupements chimiques dont le pKa est voisin du pH endosomal démontre l'induction de la libération des complexes dans le cytoplasme et une efficacité de transfection élevée⁴⁸⁷.

Des peptides viraux ou des peptides synthétiques particuliers (nommés peptides fusogéniques) sont aussi utilisés en combinaison avec les complexes pour promouvoir la libération de l'endosome et l'induction de l'expression génique^{488, 489}. Par exemple, des séquences précises de l'hémagglutinine (HA-2) du virus de l'influenza et la protéine TAT du VIH sont utilisées sous forme de peptides pour leur efficacité naturelle de permettre la libération du virus du compartiment endosomal suite à son internalisation⁴⁹⁰. Au pH endosomal, ces deux peptides subissent une modification conformationnelle importante ; il y a formation d'une hélice- α amphipatique qui interagit avec les membranes lipidiques endosomales et cause leur bris.

4.2.4.3. Séquence de localisation nucléaire (SLN)

La membrane nucléaire des cellules eucaryotes quiescentes ou post-mitotiques représente une barrière importante pour la livraison nucléaire de l'ADN plasmidique seul ou complexé à des molécules de transport ⁴⁹¹. Dans le cas de la thérapie génique et des vaccins à ADN, l'addition de SLNs permet (la reconnaissance spécifique de l'ADN par les importines cytoplasmiques α et β , le transport vers le CPN et la translocation nucléaire ^{247-249, 492, 493}. La séquence classique de l'antigène grand T du virus SV40 [Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val (PKKKRKV)], des séquences bipartites telles que : KRPAATKKAGQAKKKK de *Xenopus*, des séquences riches en arginine: RQARRNRRRWRERQRQ du VIH-1 ainsi que des protéines d'origines virales ont démontré des résultats intéressants ⁴⁹⁴. Les peptides correspondants aux séquences SLNs peuvent être complexés à l'ADN par des interactions électrostatiques ⁴⁹⁵, par des attachements covalents ^{493, 496}; ou par des sites d'attachements spécifiques ²⁴⁷. L'hybridation *in situ* a permis de démontrer que les plasmides contenant les SLNs sont localisés seulement dans le noyau des cellules alors que les plasmides sans séquences sont dispersés dans l'ensemble du tissu et rapidement éliminés.

Le nombre de peptides SLN requis pour induire la livraison nucléaire de l'ADN est un sujet controversé. Une étude démontre qu'un seul peptide SLN lié chimiquement à l'extrémité d'un plasmide linéarisé est suffisant et nécessaire pour induire la livraison nucléaire alors que plusieurs séquences distribuées sur le même plasmide sont censées inhiber l'internalisation nucléaire en interagissant simultanément avec plusieurs protéines kariophiliques ou avec plusieurs CPNs ²⁴⁷. Par contre, il a aussi été démontré que la présence de ~ 70-100 peptides SLN [liés par une réaction de photoactivation ou par un groupement cyclopropapyrroloindole] par plasmide permet un niveau de localisation nucléaire très élevé ^{249, 493}.

Bien que d'excellents résultats de translocation nucléaire sont démontrés avec l'utilisation de peptides SLN, les études rapportent cependant que les méthodes utilisées pour lier les peptides aux plasmides empêchent généralement la transcription du gène contenu dans le plasmide. De plus, malgré le succès de l'importation nucléaire de l'ADN

plasmidique par les SLNs observé sur des cellules en culture, l'efficacité *in vivo* des SLNs pour l'induction de la livraison nucléaire et de l'expression de l'ADN est très peu rapportée. Les rares études indiquent que l'incorporation d'une séquence de localisation nucléaire à la suite d'un gène rapporteur ou immédiatement après le promoteur du vecteur d'expression eucaryote, permet l'induction de l'expression *in vivo* du transgène de 20 à 200- fois ^{497,498}.

L'efficacité des SLNs a récemment été évaluée pour la translocation nucléaire de complexes polymères cationiques/ADN. La présence de peptides SLN préalablement complexés à l'ADN avant sa condensation par la PEI n'augmente pas l'efficacité de transfection des complexes ⁴⁹⁹. Ce manque de gain d'efficacité s'explique par le fait que les peptides SLN seraient masqués suite à la condensation de l'ADN par le polycation. Pour une présentation efficace des SLNs à la surface des complexes, quelques études ont analysé la liaison de peptides SLN directement sur le polycation ^{500, 501}. Les complexes formés de PEI-SLN ont démontré un niveau d'importation nucléaire élevé et d'expression génique de 10 à 16 fois supérieure aux complexes sans SLN.

4.3. Molécules immunostimulantes

Pour être efficace, un vaccin à ADN doit être internalisé dans les cellules, doit permettre l'expression de l'antigène, doit alerter le système immunitaire et initier la réponse immunitaire. De plus, l'expression et la présentation de l'antigène par les APCs sont importantes au niveau de l'induction de la réponse immunitaire ⁵⁰². Pour maximiser l'expression et la présentation de l'antigène par les APCs, une livraison spécifique du vecteur d'expression à ces cellules grâce à des ligands spécifiques et l'augmentation de la biodisponibilité de l'antigène peuvent être utilisées comme stratégies. De plus, différentes molécules immuno-modulatrices telles que les cytokines, les chimiokines, les molécules de co-stimulation et les molécules d'adhésion permettent d'augmenter l'immunogénicité des vaccins à ADN et/ou diriger la réponse immunitaire vers le type désiré.

4.3.1. Cytokines

Les cytokines sont impliquées dans la régulation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire des cellules du système immunitaire. Dans l'objectif de stimuler, augmenter et/ou diriger la réponse immunitaire des vaccins à ADN, de nombreuses cytokines ont été co-administrées sous forme de protéines recombinantes ou sous forme de séquences codantes clonées dans des vecteurs d'expression eucaryote.

4.3.1.1. Induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire

Pour une protection spécifique contre certains virus et pathogènes intracellulaires, une réponse à médiation cellulaire est essentielle. Ce type de réponse est induit par la production des cytokines IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 et INF- γ . Les séquences codantes ou les protéines recombinantes de ces cytokines ont été utilisées dans des immunisations expérimentales par ADN^{54, 503}. Par exemple, la co-injection de plasmides codant pour l'IL-12 avec des plasmides codant pour un antigène viral chez la souris, stimule la production d'IL-2 et d'INF- γ et augmente ainsi la réponse à médiation cellulaire spécifique⁵⁰⁴. Chez les macaques, la co-administration de plasmides codant pour l'IL-12 ou l'IL-18 avec un vaccin à ADN contre le VIH permet d'augmenter de façon significative la prolifération des cellules T_{aux 1} spécifiques⁵⁰⁵.

4.3.1.2. Induction d'une réponse immunitaire humorale

Dans le cas de pathogènes où la réponse immunitaire de type humorale est importante, la co-administration de plasmides codant pour les cytokines IL-4, IL-5 ou IL-10 s'est avérée très efficace pour le développement des cellules T_{aux 2} et la production d'anticorps^{506, 507}. Par exemple, la co-injection d'IL-4, d'IL-10 et de la chimiokine MIP- α (macrophage-inflammatory protein 1- α) avec un plasmide codant pour la protéine gp120 du VIH chez le chimpanzé, augmente significativement le titre d'anticorps spécifiques⁵⁰⁸.

4.3.1.3. Induction générale de la réponse immunitaire

Une manière intéressante d'augmenter l'immunogénicité générale des vaccins à ADN est de stimuler l'expansion des cellules présentatrices d'antigènes au site d'inoculation par la co-injection de la cytokine du facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages (GM-CSF). La présence de la cytokine GM-CSF au site d'inoculation et au site de production de l'antigène permet le recrutement des cellules présentatrices d'antigènes (CDs et macrophages) impliquées dans le processus de présentation de l'antigène et dans le développement de la réponse immunitaire autant humorale que cellulaire. Son utilisation peut être appropriée lorsque la réponse nécessaire à la protection contre le pathogène est inconnue ou lorsque l'induction de la réponse humorale autant que cellulaire sont bénéfiques. Le GM-CSF ne fait qu'amplifier la réponse immunitaire naturellement induite par l'antigène^{509, 510}. L'effet adjuvant du GM-CSF pour le développement de vaccins à ADN a été démontré *in vivo*; le GM-CSF augmente la production d'anticorps et la lymphoprolifération et dans certain cas, la réponse protectrice lors du challenge^{54, 510, 511}.

4.3.2. Molécules de co-stimulation

Pour le développement d'une réponse immunitaire, les cellules transfectées doivent présenter deux éléments aux cellules T pour permettre l'activation et l'expansion de ces dernières en cellules T_{aux} spécifiques: (i) le complexe CMH/peptide reconnu par le TCR du lymphocyte T et (ii) une molécule de co-stimulation (B7.1, B7.2 ou CD40) reconnue par le récepteur CD28/CTLA4 à la surface des cellules T. L'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour la molécule de co-stimulation B7.2 avec un vaccin à ADN contre le VIH permet une augmentation étonnante de la prolifération des cellules T_{aux} antigène spécifique et de la réponse des CTL¹⁷⁶. En plus de stimuler directement les cellules T, l'expression endogène de B7.2 favorise le développement d'un environnement pro-inflammatoire [par l'apoptose des cellules transfectées B7.2 positives par les cellules T] propice à la présentation de l'antigène par "cross presentation" (section 2.4.2.2.)¹⁷⁶.

4.3.3. Molécules d'adhésion et chimiokines

La co-injection de plasmides contenant une séquence codant pour une molécule d'adhésion [ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) et LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen-3)] et pour une chimiokine [RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted) et MIP-1 α (monocyte chemotactic protein-1 alpha)] avec un vaccin à ADN permet une induction significative de la réponse immunitaire, comparativement au vaccin administré seul⁵¹²⁻⁵¹⁴. L'expression de RANTES ou de MIP-1 α attire les cellules inflammatoires au site d'injection et d'expression de l'antigène et module les fonctions des lymphocytes T et B alors que la présentation de ICAM-1 ou de LFA-3 à la surface des cellules transfectées permet des interactions essentielles avec les cellules T pour le développement de la réponse immunitaire.

4.3.4. Récepteur fas

L'induction de l'apoptose des cellules transfectées exprimant l'antigène par la co-administration d'ADN codant pour le récepteur fas a un impact positif au niveau de l'induction de la réponse immunitaire des vaccins à ADN. Cette stratégie permet d'augmenter la présentation de l'antigène par les CD8, la réponse CTL spécifique et d'induire la production des cytokines de l'immunité cellulaire⁵¹⁵. L'amplification de la mort des cellules renforce l'immunité cellulaire par l'augmentation du mécanisme de "cross presentation" de l'antigène aux cellules T par les CD8.

4.3.5. Motifs CpG non-méthylés d'origine bactérienne

L'addition de motifs CpG non-méthylés d'origine bactérienne dans le vecteur d'expression ou la co-injection d'oligodéoxynucléotides CpG est largement utilisée comme adjuvant pour améliorer la réponse immunitaire des vaccins à ADN⁵¹⁶⁻⁵¹⁸. La séquence, le nombre de répétitions et les aspects structuraux des CpG influencent le type de réponse immunitaire. Selon leurs impacts immunologiques, les motifs CpG sont classés en deux classes différentes, les classes A et B⁵¹⁹. La classe A a l'habileté particulière d'induire une réponse de type cellulaire par l'activation des cellules NK et la production d'INF- α/β par les pCD8 alors que les CpG de la classe B, sont associés au développement d'une réponse humorale grâce à une prolifération significative des lymphocytes B^{520, 521}.

4.4. Combinaison de vaccins

Plusieurs études immunologiques ont démontré que la combinaison de différents types de vaccins augmente leur efficacité individuelle. Un vaccin "combiné" débute par une ou plusieurs doses d'un premier type de vaccin (le "prime") et est suivi d'un deuxième type de vaccin (le "boost"). Habituellement, cette stratégie utilise une combinaison de vaccins à effets complémentaires au niveau de la réponse immunitaire. Par exemple, la combinaison d'un vaccin à ADN et d'un vaccin composé d'un virus recombinant stimule préférentiellement l'induction d'une réponse à médiation cellulaire ⁵²² alors que la combinaison d'un vaccin à ADN et d'un vaccin sous-unitaire permet l'induction de la réponse CTL et l'induction des anticorps neutralisants ^{523 524-526}.

4.5. Ciblage des cellules dendritiques (CDs)

Les cellules présentatrices d'antigènes dérivées de la moelle osseuse jouent un rôle crucial dans l'induction de la réponse immunitaire ^{155, 156, 161}. Récemment, plusieurs stratégies ont été développées pour cibler la transfection des CDs et des cellules de Langerhans ou pour permettre la livraison de l'antigène synthétisé *de novo* par les cellules transfectées aux CDs. Des évidences indiquent que l'efficacité des vaccins à ADN serait significativement augmentée par le ciblage des CDs. Premièrement, l'ajout de séquences de régions variables d'anticorps spécifiques à des récepteurs des CDs (DEC-205 et CD11c) à la séquence de l'antigène ⁵²⁷, permet une stimulation supérieure de la réponse humorale et cellulaire, comparativement à la séquence native de l'antigène. Deuxièmement, des résultats immunologiques très intéressants ont été obtenus par la création d'une protéine recombinante contenant la région de CTLA4 reconnue par les récepteurs CD80 et CD86 à la surface des CDs ⁵²⁸. Chez la souris, l'expression de protéines recombinantes CTLA4+, augmente le titre d'anticorps spécifiques de 10 000 fois, comparativement au vaccin à ADN conventionnel. Troisièmement, l'utilisation de promoteurs eucaryotes spécifiques aux CDs tels que le promoteur de la fascine (protéine impliquée dans la migration des CDs) et de la *dectine-2* (récepteur cellulaire) lors de la construction de vecteurs d'expression eucaryote a démontré chez la souris, que malgré l'expression restreinte de l'antigène par les quelques CDs au site d'inoculation, plusieurs cellules CD8⁺ spécifiques sont induites ^{163, 529}. Quatrièmement, l'encapsulation d'ADN plasmidique dans des vésicules recouvertes de

mannose (dont le récepteur spécifique est fortement exprimé à la surface des CDs) permet une induction de la réponse immunologique^{530, 531}. Cinquièmement, des molécules de transport synthétiques favorisant la transfection des CDs ont été évaluées. Les caractéristiques des microsphères et des nanoparticules de polyesters polyglycolique (PGA) et de polylactate-co-glycolate (PLG) permettent de cibler la capture de l'ADN et l'expression de l'antigène par les APCs *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*^{532, 533, 534}. *In vivo*, l'injection intramusculaire d'une formulation PLG/ADN permet une induction de la réponse CTL et la production d'anticorps antigène-spécifiques, comparativement à l'injection d'ADN dans la saline qui ne permet que l'induction de la réponse CTL^{303, 535, 536}. L'utilisation *in vivo* des microparticules de PLG indique aussi que des quantités moindres d'ADN sont nécessaires pour induire une réponse immunitaire similaire à celle induite par de l'ADN administré dans la saline.

III. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Mon projet de recherche présente des stratégies pour améliorer l'efficacité du prototype de vaccin à ADN contre le BVDV développé dans le laboratoire du Dr Elhazary²³. Il avait été démontré que le prototype permettait une protection immunitaire partielle (signes atténués de la maladie et période de signes cliniques plus courte) suite au challenge et qu'une quantité considérable d'ADN était nécessaire (3 inoculations de 1.0 mg/veau) pour induire cette protection. Le vaccin consistait à un vecteur plasmidique codant pour la séquence native de la protéine E2 du BVDV dissous dans de la saline et injecté par voie intramusculaire.

La première hypothèse de recherche étant abordée dans cette thèse est que la protection de l'ADN plasmidique lors de son voyage vers le noyau cellulaire par des molécules de transport augmentera la biodisponibilité et le niveau d'expression de l'ADN et permettra ainsi de diminuer la quantité d'ADN nécessaire pour le développement d'une réponse immunitaire adéquate. La deuxième hypothèse abordée dans cette thèse est que le potentiel immunologique du prototype de vaccin pourrait être augmenté en apportant certaines modifications sur la séquence native de E2. Une meilleure expression de la protéine E2 et une meilleure présentation au système immunitaire permettraient l'induction d'une réponse immunitaire supérieure. La troisième hypothèse abordée dans cette thèse est que la combinaison de gènes E2 provenant des deux génotypes principaux en Amériques du Nord permettra l'induction d'une protection immunitaire contre les deux génotypes de BVDV.

Les deux objectifs généraux de mon projet de recherche sont : (1) d'augmenter le potentiel immunologique du prototype de vaccin à ADN contre le BVDV et (2) créer un vecteur multivalent pour générer une protection croisée contre des souches hétérologues de BVDV et élargir le spectre de protection du vaccin aux deux génotypes. Le premier objectif général se divise en deux objectifs spécifiques : (a) Développer et caractériser des molécules de transport pour assurer la livraison de l'ADN vaccinal et améliorer la biodisponibilité de l'ADN vaccinal, (b) apporter des modifications géniques à la séquence

E2 native pour optimiser l'expression du gène et la présentation de la protéine résultante au système immunitaire.

IV. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

ARTICLE I

(Accepté dans *Biomacromolecules* 2005, 6, 1769)

Résumé de L'Article I

Synthesis and Characterization of New Permanently Charged Poly(amidoammonium) Salts and Evaluation of their DNA Complexes for Gene Transport

Les poly(amidoamine)s (PAMAMs) (des polymères cationiques) ont été les premières molécules de transport étudiées dans mon projet de recherche. Ce type de molécules m'a été proposé par le chimiste relié à notre groupe de recherche, un spécialiste de la synthèse chimique des polymères. Les polymères de cette famille étaient très intéressants à cause de leur architecture particulière. Nous avons étudié l'impact de l'architecture du polymère [(i) densité de charge, (ii) localisation des charges (sur les chaînes latérales et squelette)] sur les caractéristiques physico-chimiques (efficacité de condensation, taille des complexes, morphologie et charge nette de surface (potentiel ζ)) et les propriétés biologiques (efficacité de transfection et cytotoxicité *in vitro*) des complexes formés.

Initialement, j'ai dû décider d'un protocole à suivre pour la complexation de l'ADN avec les polymères. Suite à la revue de la littérature concernant l'utilisation de polymères cationiques comme molécules de transport, j'ai été surprise de voir le nombre de protocoles différents de complexation. Je devais tenir compte de mon objectif final qui était d'utiliser ces complexes *in vivo*. Par exemple, dans quel type de solution effectuer la complexation? Dans de l'eau ou dans une solution saline 150 mM plus appropriée pour l'inoculation *in vivo*? Est-ce que la solution d'ADN sera au polymère ou le polymère à l'ADN lors de la complexation? À quel ratio (quantité de polymère/quantité d'ADN) effectuer la complexation? À quelle concentration d'ADN effectuer les complexations? J'ai eu à effectuer plusieurs essais de complexation et effectuer des ajustements au courant des expériences avant de pouvoir faire l'analyse physico-chimique des complexes. Par exemple : (1) j'avais commencé avec une concentration d'ADN de 100 $\mu\text{g/mL}$ mais, étant donné que l'ADN précipitait en présence du polymère, il a fallu effectuer la complexation à 10 $\mu\text{g/mL}$ d'ADN.

Par la suite, j'ai effectué des études physico-chimiques : détermination de la charge de surface des complexes et des tailles des molécules à l'aide du Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600 (quasielastic light scattering (QELS))), la morphologie des complexes grâce à

microscope électronique à transmission avec l'aide d'une spécialiste du CRDA. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que la présence de charges sur le squelette a un impact considérable sur la condensation de l'ADN et la morphologie des complexes formés. Une forte densité de charge positives (70% du squelette) obtenue par une quaternisation élevée du squelette du polymère permet la formation de complexes sphériques définis d'une taille de 50-100 nm.

Parallèlement aux études physico-chimiques, j'ai effectué des essais de transfection pour évaluer l'efficacité de mes molécules de transport. Je me suis servi d'une molécule de transport cationique disponible sur le marché (PEI) comme contrôle positif et en guise de comparaison d'efficacité de transfection. Plusieurs essais de transfection ont été réalisés car il est clairement rapporté dans la littérature que le ratio de complexation influence grandement l'efficacité de transfection; elle peut être faible ou nulle à un ratio de 1.1 et optimale à 1.29. L'analyse des résultats de transfection a tout d'abord démontré que l'architecture du polymère influence l'efficacité de transfection des complexes. Une forte densité de charge sur le squelette est essentielle pour obtenir un maximum de transfection. En outre, les niveaux de transfection dépendent des caractéristiques physico-chimiques : les complexes PAMAMs/ADN les plus efficaces ont une taille inférieure à 200 nm, un potentiel ζ fortement positif et une morphologie toroïdale. Par contre, comparativement au test de référence *in vitro* des polymères cationiques [la PEI branchée], les PAMAMs étudiés se sont avérés peu intéressants (soit, 2000 fois moins que la PEI) dans les conditions testées en plus d'être très cytotoxiques. À cause de ces deux dernières démonstrations importantes, nous avons décidé de ne pas envisager l'éventuelle utilisation *in vivo* de cette famille de molécules de transport et de s'orienter vers d'autres molécules de transport.

En résumé, j'ai contribué considérablement à la conception de l'article, j'ai effectué toutes les expériences et participé à la rédaction de l'article.

Synthesis and Characterization of New Permanently Charged Poly(amidoammonium) Salts and Evaluation of their DNA Complexes for Gene Transport

Pascal Y. Vuillaume,^{†,*} Mélanie Brunelle,[†] Marie-Rose Van Calsteren,[‡]

Sylvette Laurent-Lewandowski,[†] André Bégin,[‡] Raymond Lewandowski,[§]

Brian G. Talbot,^{||} Youssef ElAzhary[†]

Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire and Institut de biotechnologie vétérinaire et alimentaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada J2S 2M2.

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur les aliments, 3600 boul. Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada J2S 8E3.

3100 chemin Duplessis, Fleurimont (Québec) Canada J1H 5H3.

Université de Sherbrooke, Faculté des sciences, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada J1K 2R1.

(*) To whom correspondence should be addressed: e-mail, [REDACTED]

[†] Université de Montréal.

[‡] Agriculture et Agroalimentaire Canada.

[§] Fleurimont.

^{||} Université de Sherbrooke.

ABSTRACT. A new series of linear and permanently charged poly(amidoammonium) salts were synthesized in order to investigate the influence of their ionic and hydrophobic contents on both the cytotoxicity and the transfection mediated by polycation-DNA complexes. The poly(amidoammonium) salts were prepared by chemical modification of a parent poly(amidoamine) containing two tertiary amino groups per structural unit, one incorporated into the main chain, the other fixed at the end of a short bismethylene spacer. The permanent charges were introduced through a quaternization reaction involving iodomethane or 1-iodododecane as an alkylating agent. Under appropriate conditions, the methylation reaction was found to be regioselective, allowing the quaternization of either the side chains or both the side chains and the backbone. Under physiological salt conditions (150 mM NaCl), all the poly(amidoammonium) salts self-assembled with DNA to form complexes. High proportions of highly quaternized polycation provided better defined morphology to the polycation-DNA complexes. Complexes formed from unquaternized polycation were less cytotoxic than branched poly(ethyleneimine) (25 kDa). At high polycation-DNA weight ratios, the introduction of permanent charges generated a significant increase in the cytotoxicity, but no patent correlation could be established with the amount and the position of the permanent charges. Only complexes formed from polycations with quaternized backbone were able to generate significant gene expression, which was putatively attributed to a better defined toroidal-like morphology together with a higher stability, as suggested by zeta potential measurements. The incorporation of dodecane side chains on highly charged polycations severely amplified the cytotoxicity so that, in return, the transfection level was dramatically affected.

INTRODUCTION

The transport and delivery of DNA to cells is of major biological importance for therapeutic applications such as gene therapy and DNA vaccines. So far, viral vectors are the most efficient carriers in delivering DNA into specific organelles. However, the use of viral vectors, as with recombinant viruses, presents serious limitations due to their potential immunogenicity and oncogenicity when used *in vivo*.¹ Nevertheless, viral vectors have inspired chemists to prepare alternative synthetic vectors. Among the numerous strategies employed to produce DNA-carrier complexes, electrostatic self-assembly between an oppositely charged polycation and DNA is probably one of the most promising methods. These complexes can transfect mammalian cells *in vitro* and *in vivo*.² Polycation-based DNA complexes represent a simple way to increase gene delivery into cells. However, the main drawback of these nonviral vectors is their relatively low *in vivo* gene transfection efficiency when compared with viral vectors. There are several explanations for this observation, such as the inability of the complex to be internalized in the cell,³ the difficulty to permeabilize the endosomal membrane,⁴ the problems of migration of the complex within the cytoplasm, and its entry into the nucleus.^{5,6} Consequently, there is a significant need to design new carriers in order to enhance delivery of DNA and at the same time to better understand the properties that are crucial for efficient transfection.

Considerable efforts have been made to design functional polycations capable of overcoming cellular barriers to transfection. Poly(β -aminoester)s,^{7,8} poly(aminoalcohol)s,⁹ poly(L-lysine) (PLL),¹⁰ polyethylenimine (PEI)^{11,12} and its conjugates,¹³ chitosane,¹⁴ poly(methacrylate)s,¹⁵ aliphatic ionenes,¹⁶ and poly(amidoamine)s (PAMAM)s^{17,18} are among the most widely tested polycations for gene transfer and delivery.

Ideally, polycations should be able to condense DNA into nanoparticle-size neutral complexes in order to avoid interactions with biological elements. However, there is a consensus opinion that complexes should possess an overall positive charge in order to ensure adhesion to the negatively charged cell membrane and also to prevent nanoparticle

aggregation in solution. However, as it has been demonstrated with PEI, the disadvantage of an increase in charge density is its association with an increase in cytotoxicity.¹² Other parameters such as the architecture of the polycation may also play a fundamental role in the development of cytotoxicity.¹²

PAMAMs represent a class of versatile polycations with a great potential for biological applications¹⁹ due to their relatively low toxicity²⁰ and their degradability in aqueous solution.²¹ These polycations are generally prepared by the reaction of bisacrylamide derivatives with bis(secondary) amines or monofunctional primary amines. Their chemical structure generally alternates amide groups with tertiary amines, presenting an overall basic character due to the presence of free amines regularly arranged along the backbone. PAMAMs are not strong polyelectrolytes and, consequently, are not completely charged at all pH values. However, when PAMAMs contain amino groups whose pK_a values are close to or higher than the physiological pH, they are considered as good potential vectors for carrying DNA into cells. Given that the number of protonated amines of PAMAMs is related to the basicity constant of their different amino groups, the ionic content can only be modulated by appropriate modifications of the chemical structure.^{22,23}

So far, although a large library of linear PAMAMs has been designed and prepared for various biological applications, notably by Ferruti and coworkers.^{19,24}, traditional chemical modifications are rather scarce. To the best of our knowledge, attempts to examine the effect of permanent charges on the side chains and backbone of poly(amidoammonium) salts have not yet been reported. Other systems such as PAMAM dendrimers,²⁵ ionenes,¹⁶ and PEI²⁶ have however been investigated with regard to their ionic content. In the work presented here, we focused on a linear PAMAM that contains a versatile building block for subsequent chemical modifications. This represents the first step towards the preparation of a new type of multifunctional DNA carrier.

A PAMAM (S0) that could be dissolved at room temperature in classical dipolar aprotic solvents was prepared in order to permit chemical modifications under optimal conditions. This polymer contained two tertiary amino groups per structural unit, one located in the backbone between the two amide groups, the second at the end of a bismethylene spacer

(Figure 1). The first synthesis step was followed by systematic chemical modifications of polymer S0. Firstly, in order to promote a strong ionic complexation and to gauge the optimum ionic make up in terms of biophysical response, the ionic content on the backbone of the polycation at physiological pH was finely adjusted by quaternization N-alkylation. Three series of polycations were produced to assess the effects of the variation of the ionic content on the transfection efficiency. The first series, termed Sm, varied the amount, m (mol %), of permanent charges on the side chains, while the second series, Bp, varied the amount, p (mol %), of permanent charges on the backbone in addition to the complete quaternization of the side-chain amino group. Finally, hydrophobically modified poly(amidoammonium) salts were also prepared in order to promote hydrophobic interactions between the cell membrane and the complex and thus to facilitate cellular uptake.²⁷⁻²⁹ This third series of polycations, BpAz (where z represents the molar fraction of segments bearing aliphatic side chains), was composed of highly charged polycations of the Bp series that contained a variable amount of aliphatic side chains.

In this study, the complexes formed from polycations of the three series were investigated for their physico-chemical properties at physiological salt concentration since the results needed to be relevant for subsequent *in vivo* experiments.

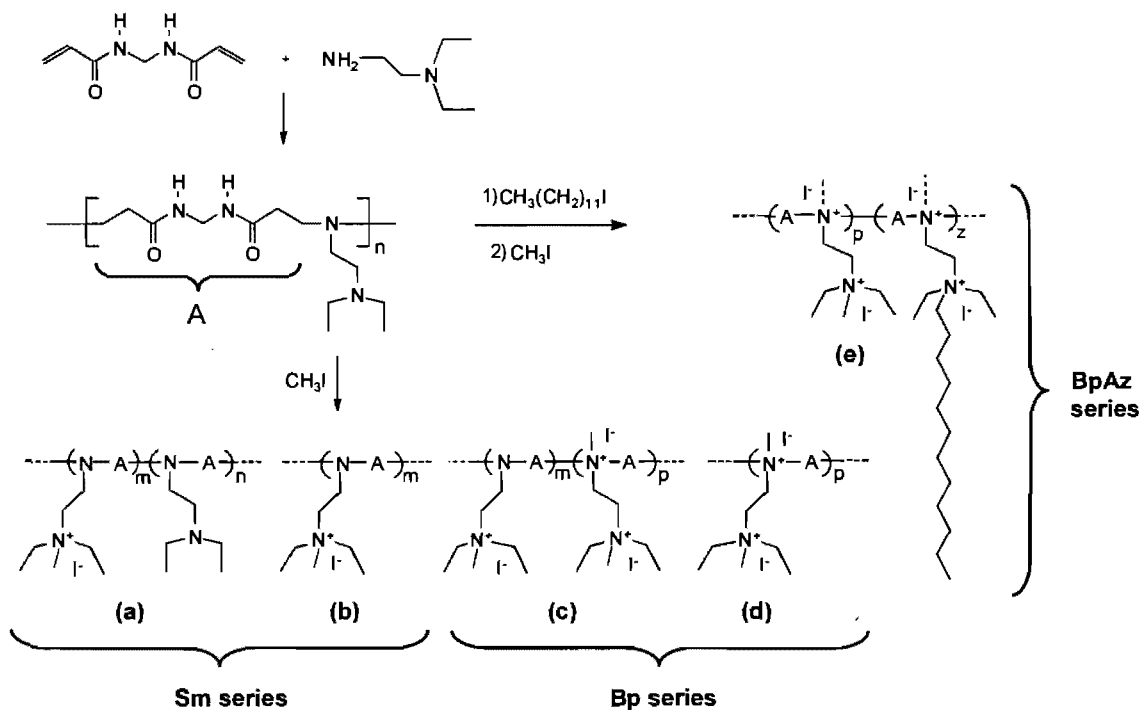


Figure 1. Schematic route for the synthesis of poly(amidoammonium) salts of the Sm [m , amount (mol %) of permanent charges on the side chains], Bp [p , amount (mol %) of permanent charges on the backbone in addition to the complete quaternization of the side-chain amino group], and BpAz [z , the molar fraction of segments bearing aliphatic side chains] series. (a), (b), (c), (d), and (e) are the different polycations obtained by quaternization of the parent poly(amidoamine) S0. "A" represents the segment of the polycation containing the methylene bisacrylamide.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemical Materials. *N,N'*-methylenebisacrylamide (99%), 2-diethylaminoethylamine (99%), iodomethane (98%), 1-iodododecane (98%), and branched PEI (25 kDa) were obtained from Aldrich and used as received. Dialysis membranes (SpectraPor, VWR) had a nominal cutoff of 3500 and 6000-8000 Da. Solvents (Aldrich) were of analytical grade. Dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamide (DMAC) were transferred directly from Sure/Seal bottles to the reactive flask via a cannula system. Dimethylsulfoxide (DMSO) was distilled under vacuum over CaH₂ and kept over molecular sieves. Water used for polymerization and dialysis was purified by a Millipore Milli-Q water purification system (resistance 18.2 MΩ).

Characterization of Polycations. Elemental analysis and NMR spectroscopy were used to verify the purity as well as the structure of the prepared polycations, respectively. **(a)** Elemental analysis of the elements C, H and N was performed at Université de Montréal (Montréal, PQ) and at Chemical and Chemisar Laboratories (Guelph, ON). **(b)** NMR spectra were obtained with a 300-MHz Chemagnetics CMX Infinity spectrometer. ¹H chemical shifts, δ , are given in ppm relative to the solvent residual resonance fixed at 2.49 ppm for DMSO. To simplify the report of chemical shifts, nitrogen atoms were identified as N_b and N_{sc} depending on whether they were located in the backbone or in the side chain, respectively. The one-dimensional (1-D) ¹³C NMR spectra were recorded with the wideband-alternating phase low-power technique for zero residue splitting (WALTZ) proton decoupling.³⁰ The 1-D attached proton test (APT)³¹ and the 2-D heteronuclear correlation (HETCOR)³² experiment were performed with 7 and 3.6 ms evolution times, respectively. The 2-D magnitude heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) was performed with an evolution time of 83.3 ms without carbon decoupling.³³ For polycations of the Sm and Bp series, the methylation content in mol % was determined by using the triplet signals at 0.92, 1.20, and 1.27 assigned to ethyl methyl proton resonances of the nonmethylated, monomethylated, and dimethylated units, respectively. The peaks were deconvoluted using Lorentzian functions. For hydrophobized polycations of the BpAz series, the aliphatic content was determined from the ratio of the integrated peak of the chain-terminal methyl group at 0.84 ppm and the methylene bisacrylamide unit at 4.6-4.3 ppm. The content of unquaternized backbone amino groups was obtained from the ratio of

the integrated peak of the methylene bisacrylamide units at 4.6-4.3 ppm and the methylene groups at 2.4-2.2 ppm in α -position to the carbonyl. (c) Infrared spectra were recorded on a Bio-Rad spectrometer (Excalibur Series) and were obtained from samples ground in KBr pellets or deposited from a polycation solution of methanol or chloroform or a mixture of both on a CsF crystal. The chamber was flushed for 5 min with dry nitrogen before each measurement. A number of scans (64) at a resolution of 2 cm^{-1} were averaged. (d) The molar mass of polymer S0 was determined by gel permeation chromatography according to a procedure described elsewhere.³⁴ The separation was performed at room temperature using a TSK gel G5000WXI column calibrated with poly(oxyethylene) (Polymer Source, Montréal, PQ), Tris buffer at pH 8.1 as mobile phase, and a HP 1050 UV detector fixed at 230 nm. The apparent molar mass measured was $6000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, namely 22 structural units. (e) pK_a values were predicted using the ACD/I-Lab Web service (ACD/ pK_a 7.02). (f) The calculated length between the ammonium groups was estimated using Hyperchem 7 (Hypercube Inc.) for one structural unit in the all-trans conformation.

Biological Materials. Water used for complexation (DNase free, molecular biology reagent) was from Sigma (Oakville, ON). Cultureware was from Fisher Scientific (Montréal, PQ). Zeocin, plasmid pBudCE4.1/LacZ/CAT, *Escherichia coli* Top 10 chemically competent cells were from Invitrogen (Burlington, ON). The cell proliferation kit MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], and the β -GAL ELISA kit were from Roche Diagnostics (Laval, PQ). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and OPTI-MEM I reduced serum medium were purchased from GIBCO Invitrogen (Burlington, ON). Fetal bovine serum (FBS) was from Medicorp (Montréal, PQ). Endotoxin-free Giga Kit was from QIAGEN (Mississauga, ON). COS7 cell line (Simian virus 40-transformed kidney cells of an African green monkey) was from American Type Culture Collection (ATCC) (Valencia, CA).

Complexation with DNA. Polycation-DNA complexes were prepared at different weight ratios (w/w) at a final DNA concentration of $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$. In each case, the appropriate amount of polycation was dissolved in $500\text{ }\mu\text{L}$ of Sigma water containing 150 mM NaCl (pH 7.3). The DNA solution ($20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) was gradually ($50\text{ }\mu\text{L}$ each addition) added to the polycation solution, with a vortex time of 30 s between each addition. After complete

addition, the solutions were stirred for 2 min and incubated at room temperature for 30 min to improve stabilization.

Electrophoresis. Agarose gel electrophoresis retardation assays were performed on polycation-DNA complexes. Complexes (40 μL containing 400 ng of DNA) were subject to electrophoresis on a 0.8% (w/v) agarose gel [Tris-acetate-EDTA buffer (TAE) pH 8.5, 90 V, 90 min]. DNA bands were visualized by UV illumination after coloration with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min and photographed.

Transmission Electronic Microscopy (TEM). Observations were performed on a Phillips EM 410 at 80 kV. Complexes were prepared according to the procedure described above. Samples were stained with a drop of 1% aqueous uranyl acetate (without pH adjustment and filtered on 0.22 μm) before being deposited on a 150-mesh copper grid covered with Formvar. The excess solution was gently wicked off with filter paper. Unstained samples were prepared according to the same procedure.

Size and Zeta (ζ) Potential. Size and ζ -potential of the particles were measured by quasielastic light scattering (QELS) by using a Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600) with the same disposable cell (Folded capillary cell DTS 1060) containing 750 μL of a freshly prepared complex solution. Experiments in triplicate were performed, starting by the size measurement and then followed by the ζ -potential measurement. The instrument was equipped with a monochromatic coherent helium neon laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) as a light source. The scattered light was recorded at an angle of 90° , and the analysis of the autocorrelation function was performed automatically to yield the diffusion coefficient, D_T , taking the values 1.33 and 25°C for refractive index and temperature, respectively. Weighted intensity distributions were given relatively to the hydrodynamic diameter using a bimodal distribution. The ζ -potential was calculated by using the Smoluchowsky³⁵ approximation.

Transfections. One Shot TOP10 chemically competent *E. coli* grown in Luria Broth (LB) medium containing Zeocin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were transformed with the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT (8433 bp) encoding β -galactosidase under the control of the CMV promoter. The plasmid was isolated and purified using the endotoxin-free Giga Kit and then dissolved in Sigma pure water containing 150 mM NaCl (pH 7.3). The DNA concentration was measured by UV absorption at 260 nm, and the purity was confirmed with A_{260}/A_{280} and by 0.8% (w/v) agarose TAE gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

Restriction analysis was used to confirm the successful amplification and isolation of the plasmid. The DNA aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to use. COS7 cells were used for transfection and cell viability tests. Cells ($2.7 \cdot 10^5$ per well) were grown to 90% confluence 24 h after plating in 6-well tissue culture plates using complete medium [90% (v/v) DMEM containing L-glutamine, 10% FBS] at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 (v/v). Immediately before the initiation of plasmid transfection, the medium was removed, the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and 1 mL of OPTI-MEM I serum-free medium was added before the addition of the polycation-DNA complex solution (500 μL , 5 μg of DNA/well). Serum-free transfection mixtures were incubated for 4 h and the medium was replaced with complete medium without antibiotics for 18 h. After this time, β -galactosidase activity was assayed using a commercially available kit. Results were expressed as pg of galactosidase/ μg of total protein using the BCA (Bicinchonic acid) assay (Pierce). Experiments were repeated three times. Negative controls were performed with the naked DNA plasmid using the same concentration as that employed for transfection assays. Transfection with PEI was performed by using a PEI-DNA weight ratio of 1.29:1 (N/P ratio of 10), i.e. corresponding to optimal conditions defined elsewhere.¹¹ In the case of the assays carried out in the presence of chloroquine, cells were incubated for 10 min in the presence of 100 μM chloroquine before the addition of complexes.

Cytotoxicity Assays. The cytotoxic effect of the complexes was evaluated by measuring the viability of treated cells. The metabolic activity of viable COS7 cells was measured using the MTT Cell Proliferation Assay kit 24 h after incubation with the polycation-DNA complex. Cells were grown in 96-well plates 24 h before transfection at an initial seeding density of $1.9 \cdot 10^4$ cells/well in 100 μL of complete medium. Complexes were formed in the same way as transfection experiments except that 60 μL (600 ng of DNA) were added per well containing 40 μL of OPTI-MEM I without serum. Experiments in triplicate were performed. Cells were grown for 24 h in the presence of complexes and then tested for metabolic activity. MTT reagent (10% v/v) was added to each well (final concentration 0.5 mg/mL). After 4 h of incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, the purple insoluble salt was dissolved by adding 100 μL of solubilization solution. The plate was incubated in the dark at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Absorbance was measured at 550 nm using a reference wavelength of 650 nm. The results were expressed as a percentage of cell viability related to the control (untreated cells). Cell

viability (%) = $(OD_{(550-650)\text{sample}}/OD_{(550-650)\text{control}})100$. Cytotoxicity of PEI-DNA complexes was evaluated by using PEI-DNA weight ratios of 1.29:1 as for the transfection efficiency assays.

Statistical Analysis. The statistical significance of the experimental variation for the cytotoxic effect between the naked DNA and polymer treatment groups was evaluated with the non-parametric Kruskal-Wallis test. The overall assessment of significance and post-hoc tests with adjusted p values were conducted to compare values from every treatment with those from the naked DNA treatment. The statistical significance between the Sm and Bp series was evaluated by a linear mixed model with treatment as a random factor. The statistical significance of the experimental variation for the transfection efficiency between the two (three) different polymer treatment groups (Sm, Bp, and BpAz) was also evaluated with a linear mixed model with a treatment as a random factor. The level of statistical significance for all tests was set at minimum $p < 0.05$.

Synthesis of Polymer S0. The synthetic route corresponding to the preparation of polymer S0 is shown in Figure 1. Polymer S0 was prepared in an aqueous solution at 60 °C containing an equimolar amount of *N,N'*-methylenebisacrylamide and 2-diethylaminoethylamine. No precipitate was observed during the reaction. The final purification procedure involved dialysis against water using 6-8 kDa dialysis bags and was followed by freeze drying and storage under vacuum in the presence of P₂O₅.

(S0) ¹H NMR: δ = 8.47 [t, 2H, NH-CH₂-NH]; 4.34 [t, 2H, NH-CH₂-NH]; 2.62 [t, 4H, CO-CH₂-CH₂-N_b]; 2.43 [q, CH₂-CH₃]; 2.4-2.35 [broad, N_b-CH₂-CH₂-N_{sc}]; 2.19 [t, 4H, CH₂-CO]; 0.92 [t, 6H, CH₂-CH₃]. ¹³C APT: δ = 171.8 [CO]; 51.1 [N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; 50.6 [N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; 49.7 [CO-CH₂-CH₂-N_b]; 46.7 [N_{sc}-CH₂-CH₃]; 43.1 [HN-CH₂-NH]; 33.0 [CH₂-CO]; 11.7 [CH₂-CH₃]. HMBC: [²J, CO-NH]; [³J, CO-NH-CH₂-NH-CO]; [³J, CO-CH₂-CH₂-N_b]; [²J, CO-CH₂]; [³J, CH₂-N_b-CH₂-CH₂-N_{sc}]; [²J, N_b-CH₂-CH₂-N_{sc}]; [³J, N_b-CH₂-CH₂-N_{sc}-CH₂-CH₃]; [³J, CO-CH₂-CH₂-N_b-CH₂-CH₂-CO]; [²J, CO-CH₂-CH₂-N_b]; [³J, N_b-CH₂-CH₂-N_{sc}-CH₂-CH₃]; [²J, HN-CH₂-NH]; [²J, CO-CH₂-CH₂-N_b]; [²J, CH₂-CH₃]. Anal. Calc. for [C₁₃H₂₆N₄O₂]_n: C, 57.75; H, 9.69; N, 20.72; C/N = 2.79; Found: C, 57.43; H, 9.79; N, 20.54; C/N = 2.80. FTIR [KBr, selected bands (cm⁻¹)] [3290, ν (NH) amide]; [2971, ν (CH₃) asym.]; 2872, ν (CH₃) sym.]; [2936, 2820, ν (CH₂-N)]; [1657, ν (C=O) amide

I], [1535, $\nu(\text{C}=\text{O})$ amide II]; [1462, $\delta(\text{CH}_3)$ asym.; 1383, $\delta(\text{CH}_3)$ sym.]; white hygroscopic powder.

Quaternization of Polymer S0. Dry polymer S0 was dissolved in an anhydrous dipolar aprotic solvent (DMF, DMAC, or DMSO). Appropriate amounts of iodomethane were added to the mixture. The homogeneous mixture was stirred for a minimum of a few hours up to a maximum of two days at room temperature under an argon atmosphere and protected from light. The quaternized polymer was precipitated from the reaction solvent into a mixture of cold acetone/ether and directly dialyzed against water for at least two days with a membrane cut-off of 3500 Da. Dialyzed polycations were recovered by lyophilization and kept under vacuum in the presence of P_2O_5 prior to use.

Dodecane side chains were introduced by dissolving dry polymer S0 in DMF in the presence of an excess of 1-iodododecane and reacting at 50 °C overnight. The weakly quaternized polymer was then purified according to the procedure described for the methylated polycation. It was then reacted with an appropriate amount of methyl iodide in order to quaternize completely the remaining side-chain and main-chain amino groups.

(B98) ^1H NMR: $\delta = 8.70$ [t, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-NH}$]; 4.5-4.3 [broad, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-NH}$]; 4.0-3.75 [broad, 4H, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}$]; 3.75-3.55 [broad, 4H, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$]; 3.5-3.3 [q, $^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_3$]; 3.14 [s, 3H, $^+\text{N}_b\text{-CH}_3$]; 3.07 [s, 3H, $^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_3$]; 2.8-2.6 [broad, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO}$]; 1.27 [t, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$]; ^{13}C : $\delta = 168.4$, [CO]; 58.3 [$\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_b$]; 57.0 [$\text{CH}_2\text{-CH}_3$]; 54.0 [$^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_b$]; 52.1 [$^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_b$]; 48.6 [$\text{CH}_3\text{-}^+\text{N}_b$]; 47.3 [$\text{CH}_3\text{-}^+\text{N}_{sc}$]; 43.8 [$\text{NH-CH}_2\text{-NH}$]; 28.4 [$\text{CH}_2\text{-CO}$]; 8.01 [$\text{CH}_2\text{-CH}_3$]. Anal. Calc. with addition of $3\text{H}_2\text{O}$: C, 30.91; H, 6.65; N, 9.02; C/N = 3.43; Found: C, 30.75; H, 6.11; N, 9.39; C/N = 3.27. FTIR [KBr, selected bands (cm^{-1})]: [3261, $\nu(\text{NH})$]; [3007, $\nu(\text{CH}_3)$ asym.; 2976, $\nu(\text{CH}_3)$ sym.]; [1667, $\nu(\text{C}=\text{O})$ amide I], [1523, $\nu(\text{C}=\text{O})$ amide II]; [750-400, NH wag]; yellowish hygroscopic powder.

(B57) ^1H NMR: $\delta = 8.73, 8.64, 8.49, 8.40$ [ill-defined, CO-NH , 4 signals due to long-range effects]; 4.55-4.3 [broad, $\text{NH-CH}_2\text{-NH}$]; 4.0-3.8 [broad, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}$]; 3.75-3.6 [broad, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$]; 3.5-3.4 [broad, ill-defined quartet, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_b$]; 3.4-3.25 [broad, ill-defined quartet and triplet, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_b$, $^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_b$]; 3.14 [s, $^+\text{N}_b\text{-CH}_3$]; 3.07 [s, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_3$]; 2.96 [s, $\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}\text{-CH}_3$]; 2.85-2.55 [broad, $^+\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}_{sc}$, $\text{N}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$];

2.35-2.15 [broad, N_b-CH₂-CH₂-CO]; 1.28 [t, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]; 1.20 [t, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]. ¹³C APT: δ = 171.7, 171.5, 168.3, 168.1 [C=O]; 58.1 [CO-CH₂-CH₂-N⁺]; 57.2 [N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}]; 56.8 [CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-⁺N_b]; 55.9 [CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; 53.4, 51.9 [⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-⁺N_b]; 48.8 [N_b-CH₂-CH₂-CO]; 48.3 [CH₃-⁺N_b]; 47.1 [CH₃-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-⁺N_b]; 47.0 [CH₃-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; 46.2 [N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}]; 43.4 [NH-CH₂-NH]; 32.5 [N_b-CH₂-CH₂-CO]; 28.3 [⁺N_b-CH₂-CH₂-CO]; 7.82 [⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃], 7.70 [N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]. HMBC: [²J, NH-CO]; [³J, CO-NH-CH₂-NH-CO]; [³J, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]; [³J, CH₃-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; [³J, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-(CH₂-CH₃)-CH₂-CH₃]; [³J, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-(CH₃)-CH₂-CH₃]; [²J, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]; [³J, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-(CH₃)-CH₂-CH₃]; [²J, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃]; [³J, CH₃-⁺N_{sc}-(CH₂-CH₃)-CH₂-CH₂-⁺N_b]; [³J, CH₃-⁺N_{sc}-(CH₂-CH₃)-CH₂-CH₂-N_b]; [²J, CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-⁺N_b]; [²J, CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b]; Anal. Calc. with addition of one H₂O: C, 35.88; H, 6.69; N, 10.99; C/N = 3.26; Found: C, 35.36; H, 6.76; N, 12.01; C/N = 2.94. FTIR [CsF, selected bands (cm⁻¹): [3261, ν(NH) amide]; [3005, ν(CH₃) asym.; 2976, ν(CH₃) sym.]; [1667, ν(C=O), amide I], [1523, ν(C=O), amide II]; yellowish crystals.

(B73A6) ¹H NMR: δ = 8.8-8.55 [four peaks, NH-CH₂-NH]; 4.5-4.3 [broad, NH-CH₂-NH]; 3.95-3.75 [broad, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}]; 3.75-3.55 [broad, ⁺N_b-CH₂-CH₂-CO]; 3.55-3.0 [broad, CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-⁺N_b, CH₃-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₂-N_b, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-(CH₂)₁₀, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-(CH₂)₁₀, ⁺N_b-CH₃]; 3.07 [s, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₃]; 2.96 [s, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₃]; 2.85-2.55 [broad, ⁺N_b-CH₂-CH₂-CO, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}, N_b-CH₂-CH₂-CO]; 2.35-2.15 [broad, N_b-CH₂-CH₂-CO]; 1.35-1.15 [m, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-CH₃, ⁺N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃, N_b-CH₂-CH₂-⁺N_{sc}-CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃]; 0.85 [t, (CH₂)₁₁-CH₃]; Anal. Calc. with addition of 3H₂O: C, 30.75; H, 6.11; N, 9.39; C/N = 3.27; Found: C, 31.15; H, 6.69; N, 9.12; C/N = 3.42. FTIR [CsF, selected bands (cm⁻¹): [3265, ν(NH) amide]; [3009, ν(CH₃) asym.; 2977, ν(CH₃) sym.]; [2927, ν(CH₂) asym.; 2853, ν(CH₂) sym.]; [1663, ν(C=O) amide I], [1526, ν(C=O) amide II]; [1462, δ(CH₃) asym; 1383, δ(CH₃) sym.]; white powder.

RESULTS

Polymerization, Chemical Modifications, and Structure Determination. The synthetic pathway for the Sm ($m > 0$) and Bp series of poly(amidoammonium) salts involved two main steps which are schematized in Figure 1. Firstly, polymer S0 was synthesized by reacting *N,N'*-methylenebisacrylamide with 2-diethylaminoethylamine. Secondly, Sm ($m > 0$), Bp, and BpAz polycations were then obtained by quaternization of the tertiary amines with iodomethane or 1-iodododecane. The basis for using this pathway is the solubility of polymer S0 in various dipolar aprotic solvents, making it possible to perform the S_N2 Menshutkin reaction under mild conditions (ambient temperature), thus avoiding undesirable off-reactions.

Typical ^1H and ^{13}C APT NMR experiments were carried out to verify the molecular structure of polymer S0 (Figure 2). The assignment of several signals observed in the ^1H NMR spectrum was straightforward for the proton resonances of the methyl (H_h , δ 0.92), the amide (H_c , δ 8.47), and the methylene group between the two amide groups (H_d , 4.34). However, to elucidate the ^1H and ^{13}C spectral regions corresponding to the methylene groups in the α position of the tertiary amines, 2-D heteronuclear NMR experiments were used. HETCOR and HMBC were employed to assign ^1H and ^{13}C NMR resonance signals appearing in the aliphatic regions. Regarding the structure of polymer S0, the 2-D HMBC spectrum also showed cross peaks corresponding to $^3J_{\text{C,H}}$ indicating the alternation of amide and tertiary amine groups in the backbone. FTIR spectra also supported the presence of such functional groups in the structure, showing amide bands I and II at 1657 and 1535 cm^{-1} , respectively, as well as a band at 2820 cm^{-1} that indicates the presence of nonquaternized tertiary amino group. These results are in agreement with previous studies that have shown that tertiary amine groups do not interfere with the Michael-type reaction.³⁶ Quaternization reactions of polymer S0 were carried out at room temperature in dry dipolar aprotic solvents with various amounts of iodomethane. The reaction was first experimented in an NMR tube in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ with a large excess of iodomethane, while monitoring the position of the signal shifts appearing for the polycations. Time-dependant ^1H NMR spectra (not shown) indicated that the side-chain tertiary amine was much more reactive to nucleophilic substitution than the main-chain amine. Under such conditions, all side-chain amino groups were quaternized first [Figure 1(b)]. Indeed, methylation of the side-chain amino groups was completed within the time required to prepare the NMR sample.

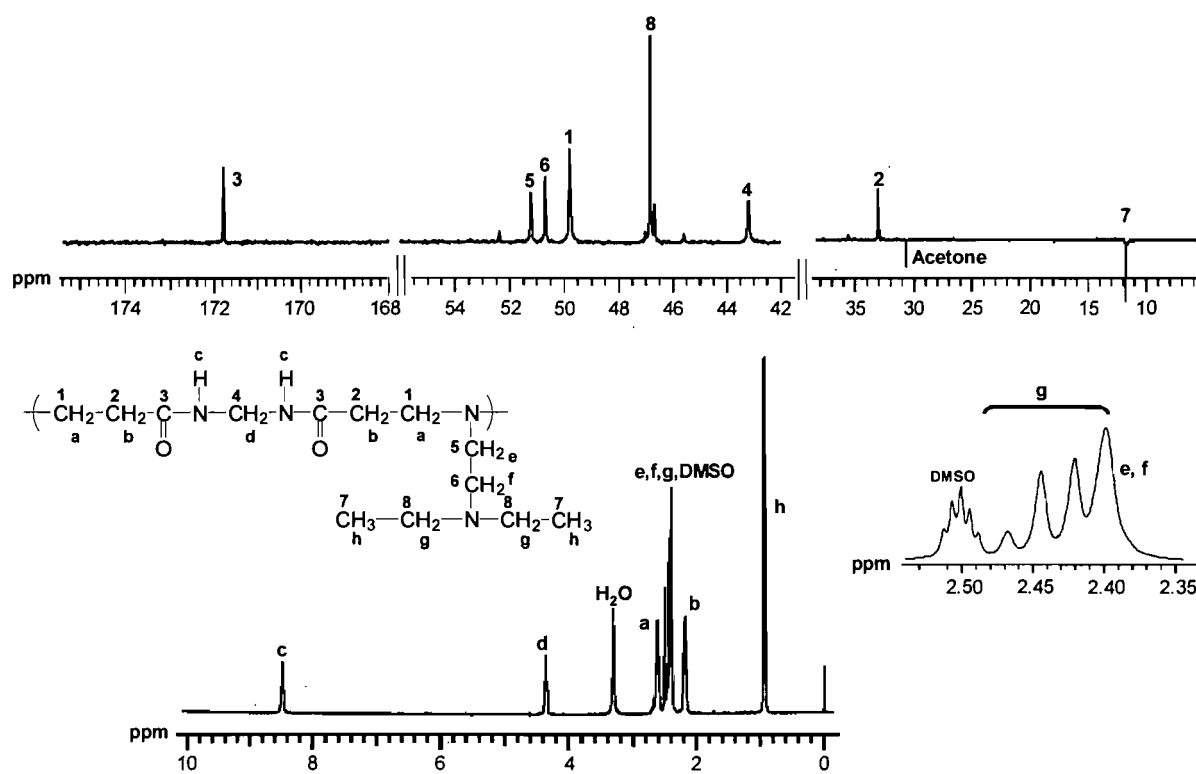


Figure 2. ^1H and ^{13}C APT NMR spectra of polymer S0.

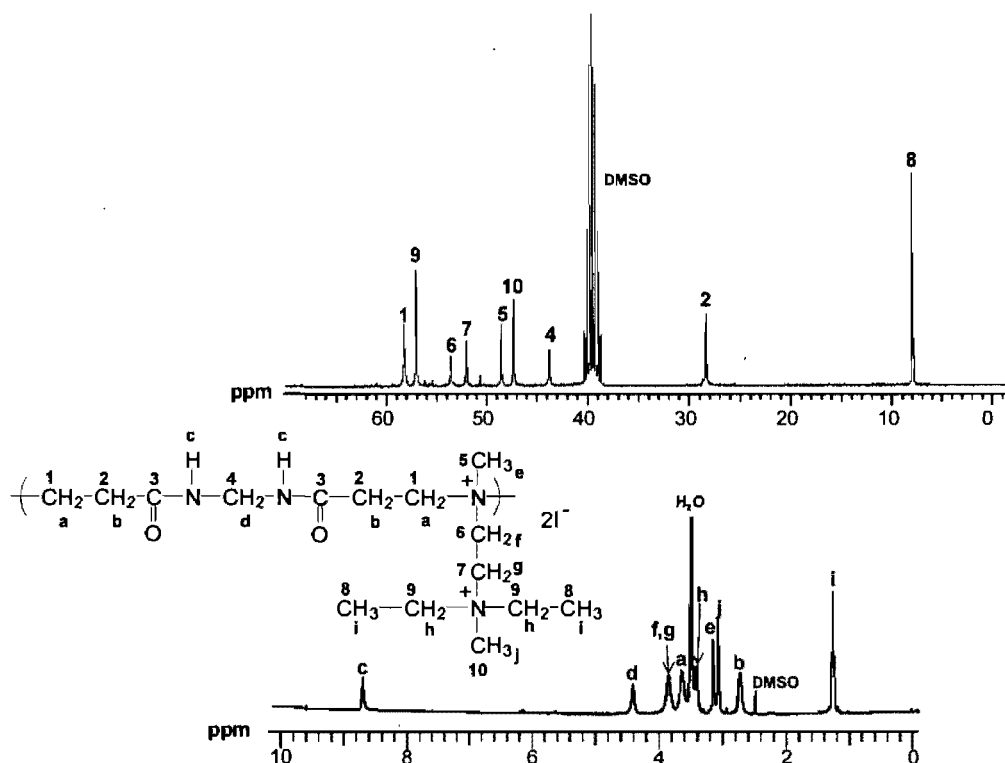


Figure 3. ^1H and ^{13}C NMR spectra of polycation B98.

This was indicated by the shift from δ 0.92 ppm to δ 1.20 ppm in the ^1H NMR spectrum corresponding to the amino ethyl methyl protons of the side chain. The methylation reaction of the main-chain amines was much more difficult as indicated by the progressive appearance of a new signal at 1.28 ppm (spectra not shown). Complete methylation of the backbone tertiary amine took about 4 h. The reaction was found to be regioselective when appropriate experimental conditions were used. Indeed, side-chain tertiary amine sites could be selectively quaternized because the backbone amine groups reacted slowly. In consequence, polycations containing a small amount of nonquaternized side-chain amine groups [Figure 1(a)] were prepared using small amounts of iodomethane, i.e. less than stoichiometry. The structure of the almost completely quaternized polycation (B98), obtained with a huge excess of iodomethane and an overnight reaction, was elucidated with the help of NMR experiments. NMR spectra displayed in Figure 3 revealed major changes after quaternization when compared to the spectra of polymer S0. The broad signal containing several multiplets observed at 2.4-2.35 ppm, normally assigned to the resonance of protons of the

side-chain methylene groups, was shifted to 4.0-3.75. The FTIR spectrum of B98 confirmed the presence of new methyl groups by the appearance of two peaks centered at 3007 and 2976 cm^{-1} corresponding to the symmetric and anti-symmetric vibration of the CH stretching. The absence of tertiary amine group is indicated by the disappearance of the band at 2820 cm^{-1} .

General Characteristics of the Polycations

Structural Considerations. Poly(amidoammonium) salts were synthesized by quaternization of the parent polymer S0. The Menshutkin reaction led to the selective methylation of the side chain and backbone amino groups. Side-chain tertiary amines react first and rapidly compared with the backbone amines, despite the potential steric effects of the ethyl groups which are the major factors in the quaternization reactions of amines.³⁷ Given optimal experimental conditions (polar solvents, homogeneous medium) and the absence of significant neighboring group effects, the deviations from ideal behavior should not be significant for moderate conversions, and the unit distribution should be accurately described by a Bernoullian distribution.

Acido-Basic Properties. Polymer S0 presents two amino groups with different Lewis base characters. The pK_a related to the two different H binding sites cannot be obtained experimentally with confidence due to the superposition of the two jumps in the titration curve corresponding to the neutralization of basic amines. Instead, pK_a values were calculated from a model compound which was constructed with the A-B-A motif, where A represents methylene bisacrylamide and B 2-diethylaminoethylamine, with the end acrylamide double bonds left unpolymerized. The results were 8.6 and 4.1 for the side-chain amine and the main-chain amine of an unquaternized A-B-A motif, respectively, and 3.8 for the main-chain amine when the side chain was quaternized. This indicates that, at physiological pH, side-chain amino groups are fully protonated. In consequence, polycations of the Sm series all present the same net total charge, originating either from permanent charges from the partial methylation of some amino groups or from the protonation of the remaining amines. On the other hand, the pK_a of the main-chain amine appeared to be slightly depressed to 3.8 by full quaternization of the amine side chain. Since proton binding to tertiary amine sites is influenced by both the inherent affinity of the site towards the proton and the electrostatic repulsion between protonated sites, it is reasonable

that the pK_a of the main-chain amine group decreases when the overall degree of methylation of the macromolecule increases.

Complexation of Poly(amidoammonium) Salts with DNA. The formation of the complexes close to physiological conditions was investigated using DNA mobility retardation assays. The images of agarose gel electrophoresis are represented in Figure 4. Low polycation-DNA weight ratios, i.e. less than 2, were used in order to evaluate the ability of each polycations to bind DNA. In the left lane, naked DNA was used as a negative control. For the complexes formed from polycations of the Sm and Bp series, DNA migration was completely retarded for w/w ratios above 0.75. This suggested a complete neutralization of the phosphate groups of DNA by the ammonium groups of the polycation.

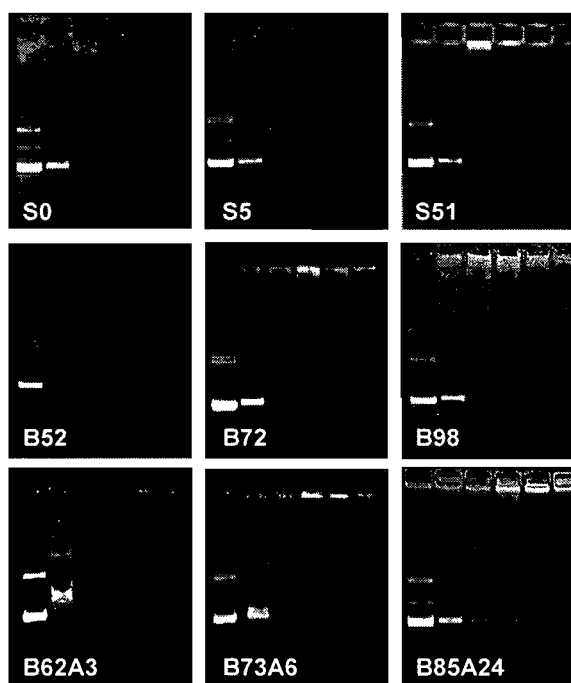


Figure 4. Representative gel electrophoresis shift assay of poly(amidoammonium) salts of the Sm, Bp, and BpAz series bound to the pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid. The gels were loaded with 400 ng of DNA/well. From left to right the figure shows naked DNA, complexes at polycation-DNA weight ratios of 0.25, 0.5, 0.75, 1, and 2, respectively.

At a polycation-DNA weight ratios of 0.25 the presence of uncomplexed DNA was clearly visible despite the decrease in the fluorescence intensity. Surprisingly, for complexes prepared from polycations of the Bp series, it was noted that an increase in the ionic content did not require less polycation to achieve complete retardation. For the complex based on B98, uncomplexed DNA were still observed at a weight ratio of 0.5 while for the complex based on B52, a DNA band was not visible above the ratio of 0.25. Polycations with low hydrophobic content (≤ 6 mol %) were also capable to retard completely the DNA at a similar weight ratio to those made from the other series, namely ~ 0.5 . However, as exemplified for the polycation B85A24, a further increase in hydrophobic content made the complexation complete at higher weight ratios between 1.0 and 2.0. In addition, complexes based on B73A6 and B85A24 displayed fluorescence on the anode side of the well up to a weight ratio of 2, suggesting that complexes were still negatively charged and that ethidium bromide diffused easily within the complexes.

Morphology and Size Characterization of Poly(amidoammonium) Salt-DNA Complexes. Negative stain transmission electron microscopy of complexes based on polycations with variable amounts of permanent charges was employed under similar experimental conditions as those used for transfection to obtain a visual characterization of their size and morphology. Such a procedure has already been widely used for previous analyses of polycation-DNA complexes.³⁸ The reverse negative contrast results from the electron scattering due to the differences in the electron density between the heavy metal stain versus the lower atomic elements. Negative control tests were performed on two polymers, namely S0 and B57 (see conditions in the Experimental Section). Surprisingly, the control samples (images not shown) revealed the presence of small particles typically around 15-30 nm with little contrast and ill-defined contours. For the moment, the reasons for such observations are unclear and the driving force leading to the phase separation remains to be understood. On the one hand, observations of complexes based on polymer S0 with different polycation-DNA weight ratios [see Figures 5 (a)-(c)] showed a pattern similar to those described above for the blanks. On the other hand, the presence of distinct particles with a diameter of around 35-70 nm and a much more contrasted outline were also clearly identified [Figure 5 (a)]; these particles were assumed to correspond to the polycation-DNA complexes. At a weight ratio of 100, S0-based DNA complexes clearly showed the presence of unorganized and uncondensed material between the small particles

[Figure 5 (b)]. Some particles appeared clearly interconnected through a bundle of threads but an attribution to either the polycation or the DNA is for the moment purely speculative despite the fact that the diameter of the small threadlike objects was commensurable with the thickness of the DNA double helix (24 and 25.5 Å for A and B-DNA forms, respectively).³⁹ By increasing the polycation-DNA weight ratio to 200 [Figure 5 (c)], aggregation of polycation-DNA complexes was still present. The introduction of a small number of permanent charges (≤ 5 mol %) on the polycation promoted the formation of a large, elongated, and nonuniform morphology, in the range 55-150 nm with a contrasted envelope [Figure 5 (d)]. Further increase in the proportion of methylated side chains promoted the formation of more spherical and regular particles as exemplified on Figure 5 (e). The common feature of the complexes formed from polycations of the Bp series was the presence of well-defined particles with a spherical geometry and a size typically around 50-100 nm [Figures 5 (f)-(g)]. Complexes based on polycation B72 formed, as shown on Figure 5 (g), a large number of particles with a toroidal morphology and whose diameter was close to 100 nm. No visible interconnections between particles could be easily observed at a polycation-DNA (w/w) ratio of 20, contrasting with all other complexes for which uncondensed DNA and/or excess of polycation were clearly observed in the extraparticular medium.

In addition, Figure 5 (g) indicates that complexes had a broad size distribution (50-350 nm). Large toroids (350 nm) in diameter as well as ill-defined toroidal morphologies reminiscent of the intermediate structures (pointed by arrows), reported elsewhere,⁴⁰ were also observed in some cases under similar experimental conditions. Complexes based on hydrophobically modified poly(amidoammonium) salts were characterized by a small size (~ 35 nm) and spherical particles easily identified by TEM [Figure 5 (h)]. However, according to the high magnification presented on Figure 5 (i), the morphology of complex B85A24 is not completely achieved, especially when compared to that of complex B72.

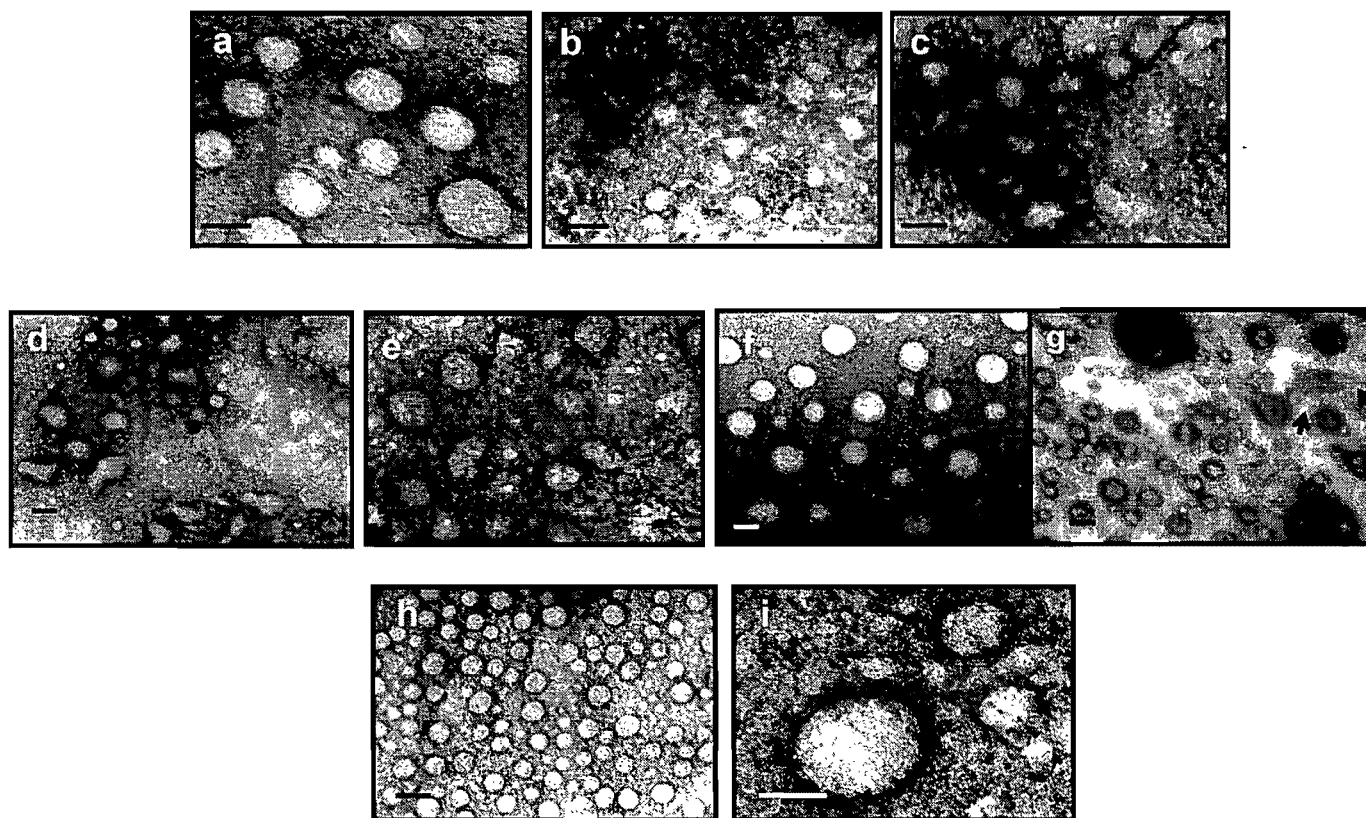


Figure 5. Representative TEM images showing the morphology of poly(amidoammonium) salt-DNA complexes under physiological salt conditions (150 mM NaCl) [unless otherwise mentioned, magnification $\times 175000$, bar = 50 nm, polycation-DNA weight ratio 20]: (a) S0 ; (b) S0, weight ratio 100; (c) S0, weight ratio 200; (d) S5, $\times 62500$; (e) S51; (f) B57; (g) B72, $\times 62500$; (h) B85A24, (i) B85A24, $\times 455000$; arrows indicate imperfect toroids.

Size and ζ -potential of the Poly(amidoammonium) Salt-DNA Complexes. QELS was used to complement the observations performed by TEM measurements. The particle sizes of the polycation-DNA complexes were first measured under physiological salt conditions on freshly prepared complexes. The common feature of all results was the presence of a main population of particles whose mean sizes were roughly between 700 and 1000 nm, suggesting the formation of aggregates. Under those conditions, no straightforward correlations between the ionic content and the size of particles could be clearly identified by QELS. The complexes formed from polycations with low ionic content (Sm series), principally those having less than 6 mol % of permanent charges, were characterized by the presence of more than one population. In contrast, the complexes based on polycations of the Bp series were characterized by only one distribution of size. The apparent discrepancy between the TEM observations and the size of the particles obtained by QELS likely resulted from the overly strong contribution of the largest particles to stronger scattering intensity, giving more weight to larger particles. The fact that clear solutions were obtained indicates that the number of large particles was probably small as confirmed by TEM observations. Given the presence of aggregates in complexes solution, ζ -potential values were difficult to obtain with accuracy. For this reason, we only reported a range of ζ -potentials obtained for each series of polycations. At a polycation-DNA weight ratio of 20, the ζ -potential of all freshly prepared complexes was always positive, thus corroborating the observations made from gel electrophoresis experiments (results not shown at a weight ratio of 20). Complexes formed from Sm polycations presented a ζ -potential in the range 7-12 mV. The relatively large mean standard deviations observed (\sim 13 mV), together with the weakly positive values of the ζ -potential, gave a reason for the poor stability of the complexes. Complexes prepared from polycations with high ionic content (Bp series) were characterized by a higher ζ -potential, varying in the range 19-22 mV and with a standard deviation of 9-14 mV. Similarly to the two other series, the complexes formed from hydrophobized polycations (BpAz) displayed lower values of ζ -potential (9-19 mV) than those from the Bp series with similar ionic content. This could be attributed to the incorporation of aliphatic segments into the hydrophobic complex diluting the charge density of the polycations.

Cytotoxicity of the Complexes. The cytotoxic effect of the complexes, reflected as the relative percentage of viable cells as a function of the ionic content of the polycations, is represented in Figure 6 for the polycation-DNA weight ratio of 20. Complexes formed from the unmethylated polymer S0 were less cytotoxic than the other polycations. Around 80% of the cells were still viable after 24 h of incubation. Further increases in the amount of polymer S0 did not decrease significantly the cell viability. The introduction of a small number of permanent charges on the side chains (see polycations S2, S5, and S6) conferred a slight but significant cytotoxic effect, cell viability decreasing by around 15-20% relative to complexes formed from S0. A further increase in the ionic content only slightly accentuated this effect, the cell viability achieving 40-50%. Interestingly, quaternization of the backbone did not enhance the cytotoxicity significantly. It was also shown that the cytotoxicity of the complexes formed from the various poly(amidoammonium) salts presented comparable cytotoxicity to that of branched PEI at a weight ratio of 1.3, which corresponds to its optimum transfection ratio, regardless of the localization of the permanent charge (side chain or side chain and backbone) and the weight ratio used for the complexation. Besides the effect of the ionic content, the effect of the introduction of a small amount of aliphatic side groups on cell viability was not statistically significant. Only the polycation with the highest hydrophobic content tended to impart higher cell toxicity, with cell viability of 35%.

***In Vitro* Transfection.** Complexes formed from polycations of the three series at physiological salt concentration and the pBudCE4.1/lacZ/CAT plasmid were tested for *in vitro* gene expression in the COS7 cell line. Figure 7 (a) displays the transfection efficiencies of complexes at a weight ratio of 20 as a function of the ionic content of the polycations. Transfection efficiencies of complexes formed from protonated and quaternized side-chain polycations (Sm) were almost comparable with those of naked DNA, the introduction of permanent charges on the side chains appearing not to play a significant role. In contrast, quaternization of the backbone enhanced significantly the transfection efficiency [Figure 7 (b)]. The maximum in transfection efficiency (eight times naked DNA) was observed for complexes formed from polycation B72.

It is worth noting that all complexes formed from poly(amidoammonium) salts were characterized by a low protein expression typically four orders of magnitude less than

branched PEI. A further increase in the ionic content as well as the incorporation of hydrophobic side chains did not increase the efficiency of gene delivery. In contrast, increasing the amount of hydrophobic side chains appears to decrease significantly the level of transfection.

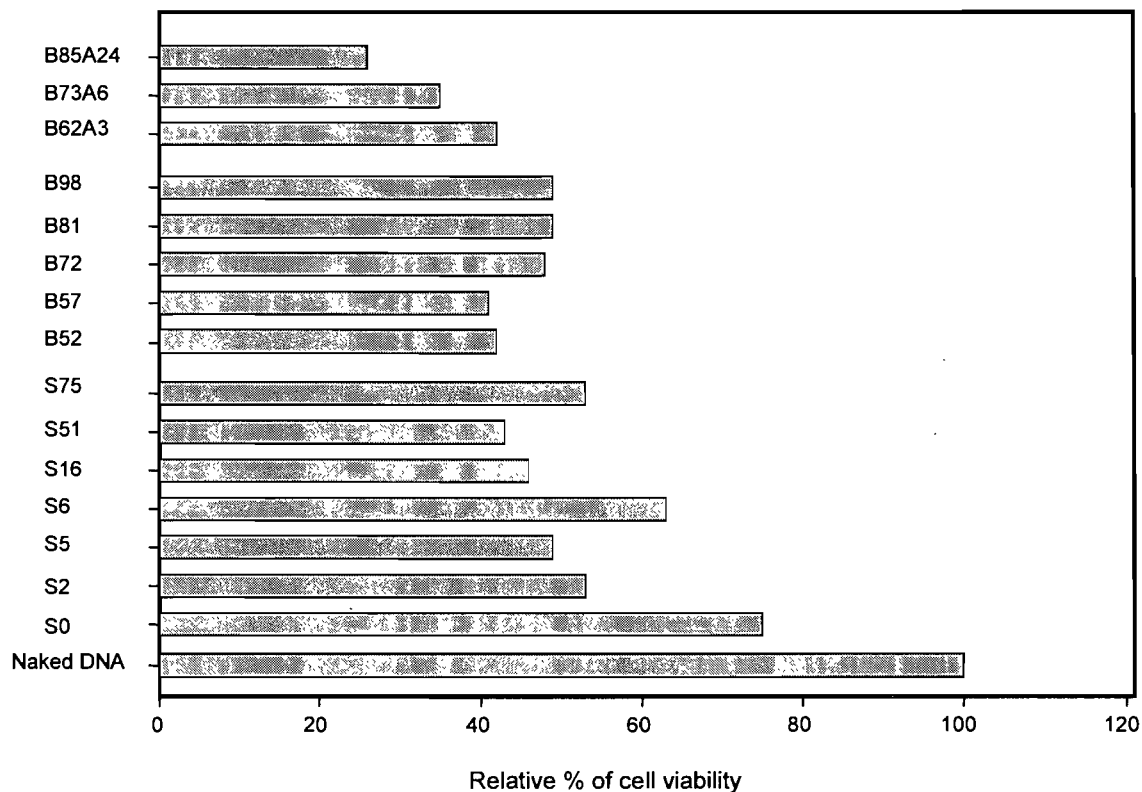


Figure 6. *In vitro* cytotoxicity of poly(amidoammonium) salt-DNA complexes against COS7 cells. The viability of COS7 cells after a 24-h exposure is expressed as a function of the degree of quaternization for a polycation-DNA weight ratio of 20. Naked DNA is shown as a reference control.

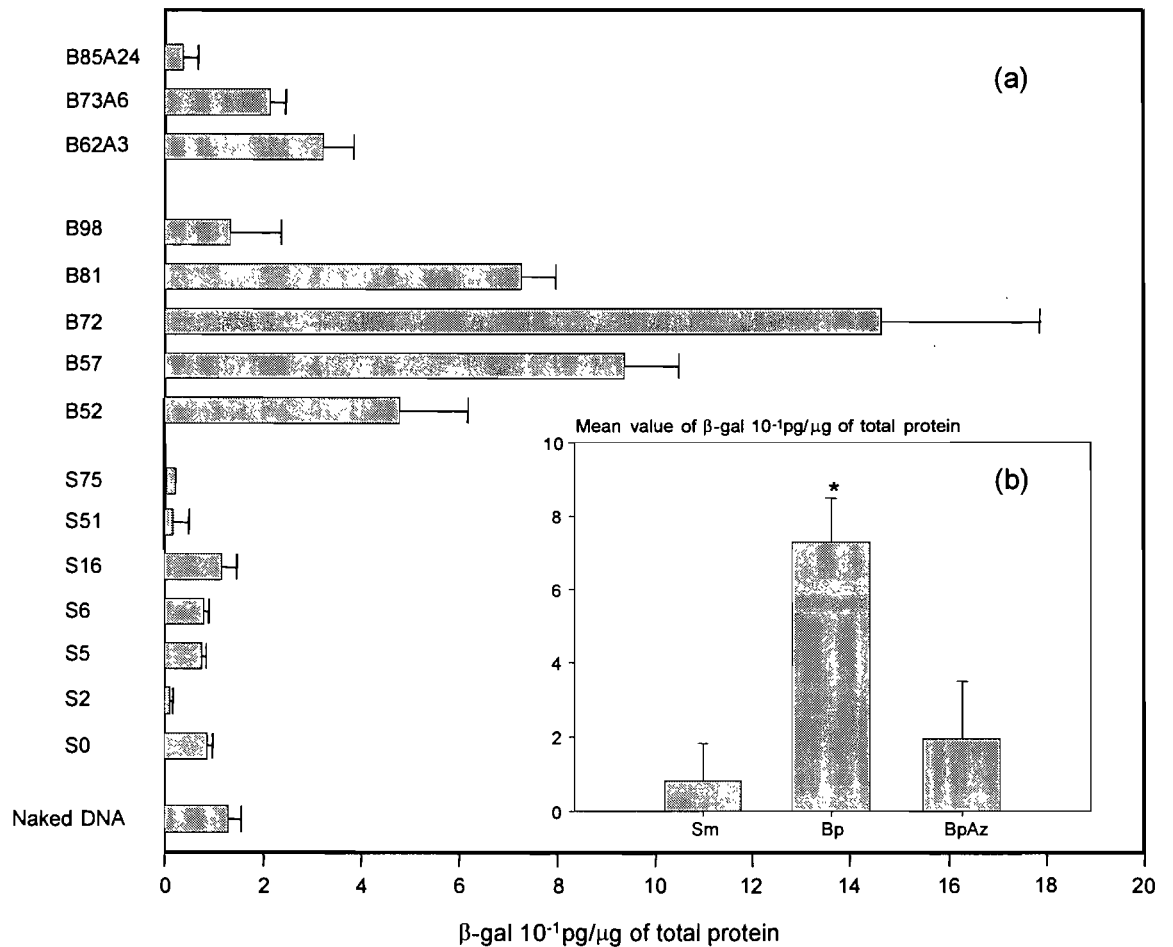


Figure 7. Transfection of COS7 cells (a) using the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT complexed with various poly(amidoammonium) salts of the Sm, Bp, and BpAz series at a weight ratio of 20 after incubation for 24 h (standard deviation bars are shown). (b) Mean values of protein expression of the Sm, Bp, and BpAz series obtained from the linear mixed model ($p = 0.05$). Standard error bars are shown. Asterisk (*) represents significant differences uncovered by post hoc tests.

DISCUSSION

Selective chemical modification of polycations is a flexible approach to investigate structure-(bio)function relationships. A PAMAM polymer containing backbone and side-chain tertiary amino groups (S0) was chemically modified selectively in order to vary the amount and the position of the charges as well as to vary the hydrophobic character of highly charged polycations. Both backbone and side-chain amino groups can be permanently charged by N-methylation reaction while only side-chain amino groups are protonable under biological conditions. If no charges are present on the backbone, side-chain amine groups are protonable at physiological pH and are not prone to be active in the endosome.

It was initially observed that all the various polycations were able to self-assemble into complexes with a DNA plasmid under physiological salt conditions. This occurs because of the electrostatic interactions prevailing between the ammonium of the polycations and phosphate groups of the DNA. According to gel electrophoresis analysis, apparent DNA charge neutralization was achieved at similar polycation-DNA weight ratios (~ 0.5) for all the Sm polycations. This can be reasonably explained since each member of the series had a similar effective degree of ionization at physiological pH, regardless of the nature of the charges. For the Bp series, side-chain amino groups were no longer available for protonation. Thus, quaternization of the backbone made the Bp polycations more positively charged than Sm polycations. However, Bp polycations did not bind DNA tighter with the increase in the degree of quaternization of the backbone, maybe because, in the presence of salt, the compact structure of such highly charged poly(amidoammonium) salts provided them with a similar effective charge density.⁴¹ Even, the introduction of a small amount of dodecane segments ($z \leq 6$ mol %) did not affect the binding ability towards DNA to a great extent, thus demonstrating the subtle role of nonelectrostatic interactions in the mechanism of polycation-DNA complex formation.²⁹ However, when a large amount of aliphatic segments was introduced (24 mol %), the binding abilities of the polycation to DNA tended to diminish, indicating a dilution of the total charges together with a weakening of the electrostatic interactions between oppositely charged partners.

We also explored the physico-chemical properties of the complexes at a polycation-DNA weight ratio of 20. Indeed, the best transfection results were obtained at high weight ratio as has also been reported for poly(4-vinyl pyridinium) salts.⁴² Under salt conditions of 150 mM, different factors could have accounted for the weak stability of the complexes. Firstly, it was noted that aggregation of poly(amidoammonium) salts-DNA complexes could not be completely avoided by the adjustment of the ionic and the hydrophobic contents of the poly(amidoammonium) salts. As demonstrated elsewhere, the addition of low molecular weight electrolytes promotes the destabilization of polycation-DNA complexes.⁴³ In the case of poly(amidoammonium) salts-DNA complexes formed in pure water, no aggregation could be clearly evidenced (data not shown). The small sizes of the complexes (72-163 nm obtained from QELS), that was in fact very close to that reported above from TEM observations, and the significantly higher ζ -potentials (47 ± 5 mV) suggest a superior stability of the complexes formed in the absence of salt. Secondly, as reported by Izumrudov and Zhiryakova, N-alkylation of the tertiary amine can also have a negative impact on the stability of the complexes due to the steric hindrance around the permanent charge.⁴³ Both incorporation of salts and quaternization of the tertiary amine groups generate a similar screening effect that likely reduces the cooperative interactions between the two complementary partners and therefore the stability of the complexes. Thirdly, the inefficient DNA condensation process also probably resulted from the low ionic density of Sm polycations. Indeed, the lowest critical chain length required for cooperative assembly of both partners is a minimum of one charge for each six bonds in a repetitive unit.^{42,44,45} This is far from the case for the polycations of the Sm series. In the same line of reasoning, the inappropriate distance between ionizable amino groups might account for the poor stability of the complexes. It has been shown by Vijayanathan et al. that polyamines with trimethylene units (length = 4.9 Å) link preferentially with adjacent phosphate groups while tetramethylene units (length = 6.1 Å) favor the bridging of ammonium groups between two different strands.⁴⁶ For the complexes based on polycations of the Sm series, the intercharge distances between ionizable amino groups of side chains should facilitate intermolecular associations of the polycation with different DNA strands. In contrast, when the backbone becomes highly charged as in our Bp and BpAz series, the presence of short cationic charge interdistances, ~ 4.0 Å, promotes the recognition of ammonium groups with adjacent phosphate groups.⁴⁷

Cytotoxicity of the complexes was evaluated for each polycation series. Complexes based on the unquaternized poly(amidoamine) (S0) were found to be much less toxic than branched PEI, even at high polycation-DNA ratios. This confirmed the low toxicity generally reported for linear poly(amidoamine)s.¹⁸ Quaternization of a small proportion (2-6 mol %) of the amino side-chain groups led to a significant increase in cytotoxicity. However, no significant differences were observed between complexes made from Sm ($m > 0$) or Bp polycations. It appears that cytotoxicity is not strictly connected with the number of permanently charged ammonium groups on the polymer. This was also demonstrated for a series of ionenes for which Langer and coworkers have noted that cytotoxicity depends much more on the chemical nature of the center of the charge rather than the charge density of the polycations.¹⁶ Also, the position of the charges seemed to have no influence on the cytotoxicity level. On the other hand, cytotoxicity of BpAz polycations appeared to depend on the amount of hydrophobic segments. Permanent charges were accountable for cell interactions while hydrophobic effects appeared to be detrimental to the viability of cells probably because of their detergent effect, a well known property of cationic amphiphiles and polyamphiphiles.

Poly(amidoammonium) salts were characterized by a relatively low transfection activity as also demonstrated for other polymeric quaternary ammonium salts.^{25,48-50} However, this does not preclude a comparison of the ability of the polycations to transfect cells, with respect to their structural characteristics. A comparison of the transfection efficiency of the Sm, Bp and BpAz series showed statistical differences between the various groups. Firstly, in contrast with the Sm and BpAz polycations series, complexes based on Bp polycations displayed much higher transfection efficiencies. The increased level of quaternary ammonium groups appeared to have a beneficial effect probably because they promoted a better DNA condensation. The small (50-100 nm) and regular toroidal morphology of the Bp polycation complexes together with their relatively high surface charge are associated with their significant level of transfection. This result is in agreement with literature data indicating that small size (< 200 nm) and spherical morphology of complexes is crucial in nonspecific adsorptive endocytosis⁵¹ and nuclear trafficking.⁵² Within the Bp series, it is intriguing to observe the presence of an apparent transfection optimum for the complex based on polycation B72. In fact, a clear correlation can probably be drawn between the

good transfection performance and the lack of uncondensed materials coupled with the well defined spherical and compact toroidal structure.⁵²

Complexes formed from hydrophobized polycations did not transfect cells better than naked DNA even if they had a permanent ionic content similar to the polycations of the Bp series. Naively, the incorporation of lipid-like segments would be expected to enhance the interaction with the cell membrane and improve the transfection efficiency. According to the literature, the impact of the hydrophobic content on the transfection efficiency mediated by DNA-polycation complexes appears somewhat puzzling. Contrasting effects have been observed for both quaternized PEI and new polycationic lipids.^{53,54} Thomas et al. have reported that the quaternization of tertiary amino groups of PEI (25 kDa) leads to a strong reduction in the transfection efficiency while the quaternization of low molecular weight PEI (2 kDa) had an opposite effect.²⁸ Other groups have predicted or demonstrated the beneficial effect of introducing aliphatic (butyl, lauryl, and cetyl) residues on the transfection efficiency.²⁷⁻²⁹ In the present case, it is clear that the incorporation of covalently attached dodecyl aliphatic segments to the tertiary amino side chains reduced the level of transfection, regardless of the amount of hydrophobic segments. Given both the strong shielding of side-chain amino groups by ethyl and dodecyl groups and the intrinsic hydrophilicity of the poly(amidoamine) backbone, aliphatic segments would be expected to minimize their exposure to water by facing toward the interior of the complexes to avoid a prejudicial clustering. This was confirmed by TEM observations that gave no sign of clustering but revealed the presence of regular small complexes. The lack of transfection of BpAz complexes compared to those of the Bp series can be explained in part by the severe cytotoxicity resulting from the introduction of aliphatic segments together with the significant reduction of their surface charge.

In closing, it is worth noting other plausible reasons for the generally low transfection abilities of poly(amidoammonium) salts. One possibility would be imputable to the relatively low molar mass of the polycations. Indeed, a transfection efficiency optimum is often observed in the range of molar masses of 15-25 kDa, notably for branched and linear PEI.^{11,55} However, the efficiency of nonviral vectors does not depend only on molar mass but also on both chemical nature and microstructure.^{28,56,57} Also, high molar-mass polymers

are potentially more cytotoxic.⁵⁸ In addition, we tested the endosomal activity by employing analogues of polycations S0 possessing three methylene units in the spacer (data not shown), and capable of endosome buffering due to the presence of the tertiary amine (pK_a 5.9). Such amino groups in the form of free bases that protonate only in the acidic environment of the endosomal-lysosomal compartment are expected to mediate the escape of polycation-DNA complexes from the endosomal pathway through the proton-sponge effect and osmotic swelling-lysis.¹¹ Secondly, transfection assays were also performed in the presence of chloroquine (data not shown) which is also known to promote endosomal release. In the present case, the two approaches described above did not lead to any beneficial effects in terms of transfection yield. This indicates that buffering the endosome is likely not the way out for any improvement in the polycation design. According to other investigations reported, using linear PAMAM, endosomal escape would be more related to the membrane activity caused by a conformational change of the polycation coil.^{59,60}

CONCLUSIONS. The present work was intended to correlate the effects of systematic variations of the permanent ionic and hydrophobic contents of poly(amidoammonium) salts with the transfection ability of their complexes with DNA. The results indicate that, at a relatively high polycation-DNA weight ratios, only polycations with permanent charges on both backbone and side chains (high ionic content) generated a significant gene expression. The generally low protein expression that characterized all complexes formed from poly(amidoammonium) salts of the different series cannot be enhanced by attaching dodecane fragments to the tertiary amines. This study confirms that poly(amidoammonium) salts can be used as transfectant but need to be appropriately functionalized in order to increase their stability and bypass the endocytic pathway.

ACKNOWLEDGMENT. This work was supported by Valorisation Recherche Québec (Gouvernement du Québec, Project Number: 2201-141). We are thankful to D. Montpetit for her invaluable help in conducting examination by transmission electron microscopy and G. Beauchamp for statistical calculations. The author P.Y.V. also thanks J.C. Galin for fruitful discussions. We are grateful for technical assistance from F. St-Germain and D. Bélanger.

REFERENCES

- (1) Schreier, H. *Pharm. Acta Helv.* **1994**, *68*, 145-149.
- (2) Kabanov, A. V.; Felgner, P. L.; Seymour, L. W., Eds. *Self-assembling Complexes for Gene Delivery From Laboratory to Clinical Trial*; John Wiley & Sons: New York, 1998. See references therein.
- (3) Schaffer, D. V.; Lauffenburger, D. A. *Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28004-28009.
- (4) Kichler, A.; Mechtler, K.; Behr, J.-P.; Wagner, E. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 213-221.
- (5) Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1625-1629.
- (6) Chan, C. K.; Senden, T.; Jans, D. A. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 1690-1697.
- (7) Akinc, A.; Anderson, D. G.; Lynn, D. M.; Langer, R. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 979-988.
- (8) Anderson, D. G.; Lynn, D. M.; Langer, R. *Angew. Chem.; Int. Edit.* **2003**, *42*, 3153-3158.
- (9) Jon, S.; Anderson, D. G.; Langer, R. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1759-1762.
- (10) Ohsaki, M.; Okuda, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Niidome, T.; Aoyagi, H.; . *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 510-517.
- (11) Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7297-7301.
- (12) Jeong, J. H.; Song, S. H.; Lim, D. W.; Lee, H.; Park, T. G. *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 391-399.
- (13) Gebhart, C. L.; Sriadibhatla, S.; Vinogradov, S.; Lemieux, P.; Alakhov, V.; Kabanov, A. V. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 937-944.
- (14) Liu, W. G.; Zhang, X.; Sun, S. J.; Sun, G. J.; Yao, K. D.; Liang, D. C.; Guo, G.; Zhang, J. Y. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 782-789.
- (15) Howard, K. A.; Dash, P. R.; Read, M. L.; Ward, K.; Tomkins, L. M.; Nazarova, O.; Ulbrich, K.; Seymour, L. W. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1475*, 245-255. (b) Oupicky, D.; Konak, C.; Ulbrich, K.; Wolfert, M. A.; Seymour, L. W. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 149-171. (c) Arigita, C.; Zuidam, N. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1534-1541. (d) Cherng, J. Y.;

- Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1417-1423. (e) Cherng, J. Y.; van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1838-1841. (f) Cherng, J. Y.; Talsma, H.; Verrijck, R.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, *47*, 215-224.
- (16) Zelikin, A. N.; Putnam, D.; Shastri, P.; Langer, R.; Izumrudov, V. A. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 548-553.
- (17) Richardson, S.; Ferruti, P.; Duncan, R. *J. Drug Target.* **1999**, *6*, 391-404.
- (18) Richardson, S. C. W.; Patrick, N. G.; Man, Y. K. S.; Ferruti, P.; Duncan, R. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1023-1028.
- (19) Ferruti, P.; Marchisio, M. A.; Duncan, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 332-355.
- (20) Ranucci, E.; Spagnoli, P.; Ferruti, P.; Sgouras, D.; Duncan, R. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1991**, *2*, 303-315.
- (21) (a) Ferruti, P.; Ranucci, E.; Sartore, L.; Bignotti, F.; Marchisio, M. A.; Bianciardi, P.; Veronese, F. M. *Biomaterials* **1994**, *15*, 1235-1241. (b) Ferruti, P.; Ranucci, E.; Bignotti, F.; Sartore, L.; Bianciardi, P.; Marchisio, M. A. *J. Biomater. Sci.; Polym. Ed.* **1995**, *6*, 833-844.
- (22) Casolaro, M.; Vitaliti, S.; Ferruti, P. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 1793-1801.
- (23) Ferruti, P.; Manzoni, S.; Richardson, S. C. W.; Duncan, R.; Patrick, N. G.; Mendichi, R.; Casolaro, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7793-7800.
- (24) Franchini, J.; Ferruti, P. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2004**, *19*, 221-236.
- (25) Lee, J. H.; Lim, Y. B.; Choi, J. S.; Lee, Y.; Kim, T. I.; Kim, H. J.; Yoon, J. K.; Kim, K.; Park, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1214-1221.
- (26) Jeong, J. H.; Song, S. H.; Lim, D. W.; Lee, H.; Park, T. G. *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 391-399.
- (27) Yaroslavov, A. A.; Sukhishvili, S. A.; Obolsky, O. L.; Yaroslavova, E. G.; Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A. *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 177-180.
- (28) Thomas, M.; Klibanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14640-14645.
- (29) Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T. *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 1-8.

- (30) Shaka, A. J.; Keeler, J.; Freeman, R. *Journal of Magnetic Resonance* **1983**, *53*, 313-340.
- (31) Patt, S. L.; Shoolery, J. N. *J. Magn. Reson.* **1982**, *46*, 535-539.
- (32) Bax, A.; Morris, G. A. *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 501-505.
- (33) Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.
- (34) Bignotti, F.; Sozzani, P.; Ranucci, E.; Ferruti, P. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7171-7178.
- (35) von Smoluchowsky, M. Z. *Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129-168.
- (36) Danusso, F.; Ferruti, P. *Polymer* **1970**, *11*, 88-113.
- (37) Abboud, J.-L.; Notario, R.; Bertrán, J.; Solà, M. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1993**, *19*, 1-182.
- (38) Baeza, I.; Gariglio, P.; Rangel, L. M.; Chavez, P.; Cervantes, L.; Arguello, C.; Wong, C.; Montanez, C. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6387-6392.
- (39) Kabanov, V. A.; Sergeev, V. G.; Pyshkina, O. A.; Zinchenko, A. A.; Zezin, A. B.; Joosten, J. G. H.; Brackman, J.; Yoshikawa, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9587-9593.
- (40) Golan, R.; Pietrasanta, L. I.; Hsieh, W.; Hansma, H. G. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14069-14076.
- (41) Zelikin, A. N.; Litmanovich, A. A.; Paraschuk, V. V.; Sybatchin, A. V.; Izumrudov, V. A. *Macromolecules* **2003**, *36*, 2066-2071.
- (42) Kabanov, A. V.; Astafyeva, I. V.; Chikindas, M. L.; Rosenblat, G. F.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S.; Kabanov, V. A. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1437-1443.
- (43) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2533-2540.
- (44) Harada, K.; Kataoka, K. *J. Macromol. Sci., Chem.* **1997**, *34*, 2119-2133.
- (45) Papisov, I. M.; Litmanovitch, A. A. *Adv. Pol. Sci.* **1988**, *90*, 139-179.
- (46) Vijayanathan, V.; Thomas, T.; Shirahata, A.; Thomas, T. J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 13644-13651.
- (47) Declercq, R.; van Aerschot, A.; Read, R. J.; Herdewijn, P.; van Meervelt, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 928-933.
- (48) Wolfert, M. A.; Dash, P. R.; Nazarova, O.; Oupicky, D.; Seymour, L. W.; Smart, S.; Strohal, J.; Ulbrich, K. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 993-1004.

- (49) van de Wetering, P.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van Steenbergen, M. J.; Hennink, W. E. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 589-597.
- (50) Reineke, T. M.; Davis, M. E. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 255-261.
- (51) (a) Mahato, R. I.; Rolland, A.; Tomlinson, E. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 853-859. (b) Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *30*, 97-113.
- (52) Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J.; Escande, D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7507-7511.
- (53) Wu, J.; Lizarzaburu, M. E.; Kurth, M. J.; Liu, L.; Wege, H.; Zern, M. A.; Nantz, M. H. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 251-257.
- (54) Liu, L.; Zern, M. A.; Lizarzaburu, M. E.; Nantz, M. H.; Wu, J. *Gene Therapy* **2003**, *10*, 180-187.
- (55) Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 581-587.
- (56) Fischer, D.; von Harpe, A.; Kunath, K.; Petersen, H.; Li, Y.; Kissel, T. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1124-1133.
- (57) Köping-Höggård, M. Ph.D. Thesis, Faculty of Pharmacy, University of Uppsala, Uppsala, 2003.
- (58) Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; Petersen, H.; Bickel, U.; Voigt, K.; Kissel, T. *J. Controlled Release* **2003**, *89*, 113.
- (59) Griffiths, P. C.; Paul, A.; Khayat, Z.; Wan, K. W.; King, S. M.; Grillo, I.; Schweins, R.; Ferruti, P.; Franchini, J.; Duncan, R. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1422-1427.
- (60) Wan, K. W.; Malgesini, B.; Verpillio, L.; Ferruti, P.; Griffiths, P. C.; Paul, A.; Hann, A. C.; Duncan, R. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1102-1109.

ARTICLE II

(Accepté dans New Journal of Chemistry 2006, 1, 629)

Résumé de L'Article II

Synthesis and preliminary biological studies of hemifluorinated bifunctional bolaamphiphiles designed for gene delivery

Les bola(amphiphile)s bicaténaires asymétriques ont été la seconde famille de molécules de transport étudiées dans mon projet de recherche. Ce type de molécule est complètement différent des poly(amidoamine)s (PAMAMs) présentées dans le premier article. Contrairement à ces dernières, il s'agit de petites molécules et non de polymères. Elles m'ont immédiatement paru très intéressantes pour la livraison de gènes puisqu'elles possédaient une tête hydrophile cationique pour la complexation de l'ADN, un segment hydrophobe central permettant la formation de systèmes membranaires favorables à la complexation de l'ADN et une tête hydrophile neutre assurant la stabilité des complexes en solution.

Mes objectifs avec cette famille de molécules de transport étaient d'évaluer l'impact de la nature chimique de la tête hydrophile cationique (lysine ou histidine) ainsi que la nature du segment central hydrophobe (monofluoré ou bifluoré) sur les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés biologiques *in vitro* des complexes formés. Cet article présente le design, la synthèse, et la caractérisation des bola(amphiphile)s asymétriques ainsi que les travaux préliminaires de l'évaluation du potentiel d'un des bola(amphiphile)s comme molécule de transport. Au début de mes expériences, j'ai dû effectuer plusieurs essais de mise en solution dans l'eau des bola(amphiphile)s car ces derniers se sont avérés peu solubles à cause de la nature hydrophobe de leurs chaînons centraux. J'ai réussi à complètement solubiliser deux bola(amphiphile)s, ceux contenant 1 ou 2 segment(s) fluorés [les moins hydrophobes : les Bola C et E], grâce à une sonication de 1 heure à 60°C. En conséquence les expériences qui devaient avoir lieu sur une famille complète de bola(amphiphile)s ont été restreintes aux Bola C et E.

J'ai effectué toutes les expériences de caractérisation physico-chimique [détermination de la charge de surface des complexes et de la taille des molécules à l'aide du Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600 (QELS), étude de la morphologie des complexes grâce à la microscopie électronique à transmission avec l'aide

de la spécialiste du CRDA]; J'ai aussi assumé les expériences biologiques (transfection et cytotoxicité). J'ai démontré que le Bola C (bola(amphiphile) hemifluoré avec une tête cationique lysine) lie et condense efficacement l'ADN en nanoparticules d'une taille variant entre 65 et 150 nm alors que le Bola E (tête cationique lysine et segments centraux complètement hydrocarboné) lie et condense difficilement l'ADN. En comparaison avec la référence des standards de transfection *in vitro* (la PEI branchée), les complexes Bola C/ADN ont une efficacité de transfection 45 fois inférieure, mais ils sont peu cytotoxiques. Aucune capacité de transfection n'a été démontrée pour le Bola E.

L'inoculation *in vivo* des meilleurs complexes transfectants présentés dans cet article n'a pas été effectuée car, suite à des discussions avec les chimistes du laboratoire du Dr Pucci, nous avons premièrement décidé de modifier le mode de dispersion des bola(amphiphile)s en solution pour pouvoir étudier et comparer une famille complète de bola(amphiphile)s. Deuxièmement, puisqu'il s'agissait de molécules facilement modifiables chimiquement, nous avons décidé de modifier chimiquement le Bola C [la tête hydrophile neutre originale a été remplacée par : (a) un segment PolyEthylene Glycol (PEG) ayant comme propriété de minimiser le phénomène d'agrégation, d'augmenter l'efficacité de transfection et de masquer le surplus de charges cationiques des complexes, ou par : (b) un peptide TAT dont la capacité d'augmenter l'internalisation cellulaire et le ciblage nucléaire ont été clairement démontrés dans le passé] pour le rendre encore plus efficace et intéressant pour son utilisation *in vivo*.

En résumé, j'ai contribué à la conception de l'article, j'ai déterminé et effectué toutes les expériences. J'ai effectué toute la rédaction de l'article concernant la complexation des bola(amphiphile)s avec l'ADN, les expériences physico-chimiques, et les études de cytotoxicité et de transfection.

Synthesis and preliminary biological studies of hemifluorinated bifunctional bolaamphiphiles designed for gene delivery

S. Denoyelle,^a A. Polidori,^{*a} M. Brunelle,^b P.Y. Vuillaume,^b S. Laurent,^b Y. ElAzhary,^b B. Pucci^{*a}

^a *Laboratoire de chimie biorganique et des systèmes moléculaires vectoriels, Faculté des sciences d'Avignon, 33 rue Louis Pasteur, F-84000 Avignon, France. Fax: 33 490144449; Tel: 33 490144442;*

^b *Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Institut de biotechnologie vétérinaire et alimentaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada J2S 2M2. Tel: 1 450 773 8521.*

***This submission was created using the RSC Article Template (DO NOT DELETE THIS TEXT)
(LINE INCLUDED FOR SPACING ONLY - DO NOT DELETE THIS TEXT)***

The multistep synthesis of a new series of dissymmetric hemifluorocarbon bolaamphiphiles designed for gene transport is described. The dissymmetric functionalization of diiodoperfluorooctane leads to bolaamphiphile molecules composed of a partially fluorocarbon core end-capped with a glycoside and an ammonium salt derived from histidine or lysine. Initial biological results indicate that one of the bolaamphiphile – end-capped with a lysine and a lactobionamide residues – induces a remarkably low cytotoxicity on COS-7 cells and, when self-assembled with DNA plasmid, generates a significant *in vitro* transfection efficiency without the addition of any fusogenic lipid.

Introduction

Applying drug controlled release technology to the DNA delivery has become one of the major challenges of biomedical research.¹ For the purposes of gene therapy and DNA vaccines, oligonucleotides or DNA plasmids must be targeted to the nucleus of the cells where gene expression can take place. On the other hand, transfection efficiency depends, among other things, on the intake by the cells of the DNA-vector complex, the stability of the complex in the cytosol and its unpackaging. So far, viral vectors are the most efficient carriers in terms of transfection efficiency but their potential immunogenicity and oncogenicity seriously restrict their use for *in vivo* experiments.^{1,2} On the other hand, synthetic delivery systems are safe and versatile when appropriately designed but remain obviously much less sophisticated and efficient than viruses. In this context, the electrostatically self-assembled complexes based on DNA and (poly)cationic lipids or synthetic surfactants have emerged as a credible alternative because of their capacity to transfect cells. However, complexes based on these types of cationic species are prone to serious limitations such as the low stability of the complexes in the serum and the cytotoxicity that both affect the level of gene delivery³. High cationic content^{4,5} is the cause of the hepatic toxicity.⁶ Other amphiphilic cationic species^{7,8} such as gemini surfactants and bolaamphiphiles deserve a particular attention for gene delivery because such species may

also display a high level of functionalities. These amphiphilic compounds are also capable of significant gene transfection especially when co-formulated with the presence of a helper fusogenic lipid that generally favours the fusion of the cationic amphiphiles with the endosomal membranes *via* a phase transition sensitive to the pH variations.⁹

Herein, we report the rational design, synthesis and the characterization of a new series of dissymmetric bolaamphiphiles.¹⁰ The five novel bolaamphiphiles whose the two different polar head groups are connected together *via* an apolar fluorinated or hydrocarbon segment are schematically depicted in Fig. 1. In the following, we will also describe preliminary biological investigations. The biological data will show that bolaamphiphiles with an appropriate design can generate significant *in vitro* transfection efficiency without inclusion of helper lipid low cytotoxicity.

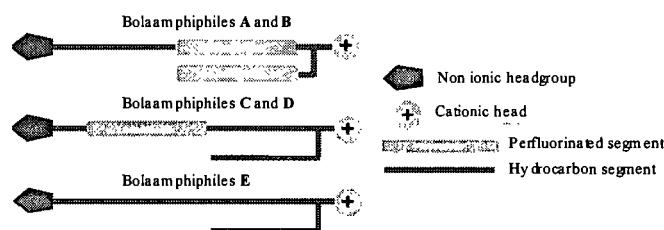


Fig. 1 Schematic representations of dissymmetric bolaamphiphiles.

Results and discussion

Design and Synthesis

In the present case, the designed bolaamphiphiles possess one or two apolar fragments connected with two polar heads. One of the two polar heads is a cationic ammonium head group derived from either lysine or histidine. This part of the molecules should be involved in the formation of bolaamphiphile/DNA complexes (bolaplexes) due to the interactions with the phosphate groups of nucleic acids.

The other polar head group is neutral and derived from galactose or lactobionamide and is expected to provide the required hydrosolubility to the bolaplexes and avoid the formation of bulky polyaggregates.^{11,12} By preventing the presence of electric charges at the outer surface of the bolaplexes, global electric neutrality may also reduce cytotoxicity.

The apolar segment links together end to end a hydrocarbon and fluorocarbon segments and forms the hydrophobic core of the molecule. A second hydro or perfluorocarbon chain is

grafted onto the main chain through a lysine or a histidine residue. The position of the perfluorocarbon segment within the main chain has been adjusted in order to provide a series of four different bolaamphiphiles (Fig. 2). The perfluorooctyl segments are located close to either the cationic part (**A** and **B**) or the sugar polar head (**C** and **D**) whereas the hydro or perfluorinated nature of the lateral chain is always the same as the facing hydrophobic segment of the main chain.

We also synthesized a fully hydrocarbon bolaamphiphile (**E**) (see Fig. 2) in order to evaluate the impact of fluorinated segment on DNA complexation by hemifluorinated bolaamphiphiles and transfection. It is well known that fluorocarbon chains self-organize in water due to their high hydrophobicity¹³ and usually lead to stable and highly tidy supramolecular systems. For the formation of the bolaplexes, the impact on their organization and stability should be notable. The stability enhancement of the packaging brought by hydrophobic interactions between the fluorocarbon chains may avoid the use of polycationic polar heads (derived for instance from spermine) that generate irreversible complexation of the nucleic acid¹⁴ and increase cytotoxicity of the carrier. The hydrophobic core may also favour the stacking of the molecules by increasing the cationic charge density around nucleic acids through hydrophobic interactions. Moreover, considering the strong ability of the perfluorocarbon chains to not interact to a great extent with hydrocarbon chains¹³, a partial or full segregation of hydrocarbon and fluorocarbon surfactants in aqueous solution is expected, thus forming two kinds of micelles, one rich in hydrocarbon the other in fluorocarbon surfactants.¹⁵ In the designed hemifluorocarbon bolaamphiphiles, the presence of this central fluorocarbon segment should avoid the hydrophobic chain refolding. The hydrocarbon and fluorocarbon chains demixion should induce the formation of a monolayer exhibiting both polycationic and non-ionic polar surfaces. This possible dissymmetric organization should lead to one level of DNA complexation, restricting the size of the DNA-bolaamphiphile complex and favouring the global neutrality of its outer surface.

According to this chemical design, the central hydrofluorocarbon segment was synthesized from 1,8-diiodoperfluorooctane as starting material (scheme 1). Following the methodology developed by Commeyras,¹⁶ one molecule of undecenoic acid was grafted onto the

perfluorocarbon chain by using zinc dust as radical initiator. This monofunctionalisation provided the compound **1** in 70% yield. The chemical conditions used did not lead to the compound resulting from a double condensation. Thus, radical addition of Z-allylamine or Boc-allylamine on compound **1** was carried out in good conditions in the presence of sodium dithionite.¹⁷ It has to be underlined that the Huang's method allowed to isolate compounds **2a-b** in 65-80% yields, widely higher than those obtained by using the Commeyras' procedure (40-60% yield). The diadduct so obtained was treated with tributyltin hydride in the presence of AIBN to remove the iodine atoms and to give compounds **3a-b** in 60% yield.

Amphiphiles **A** and **B** were derived from compound **3a** as new starting material (Scheme 2) following a convergent synthetic pathway. In a first sequence, galactosylation of Z-ethanolamine following the Helferich procedure provided compound **6**.¹⁸ After hydrogenolysis of benzyloxy-carbonyl group, the condensation of this glycosidic amine onto the hemifluorinated compound **3a** was performed in the presence of BOP as coupling reagent to provide compound **7**. Thus, treatment with TFA in methylene chloride led to the deprotected amine that was then grafted, in the presence of TBTU, onto the carboxylic function of histidine or (*N^ε*-Z)-lysine derivatives **5a-b** to give compounds **8a-b**. Compounds **5a-b** were obtained by grafting the pentafluorophenyl ester **4** of the 2H,2H,3H,3H perfluoroundecanoic acid on (*N^ε*-Z)-lysine or 2-amino-3-(N-trityl-imidazolyl) propionic acid in an acetone/water mixture.

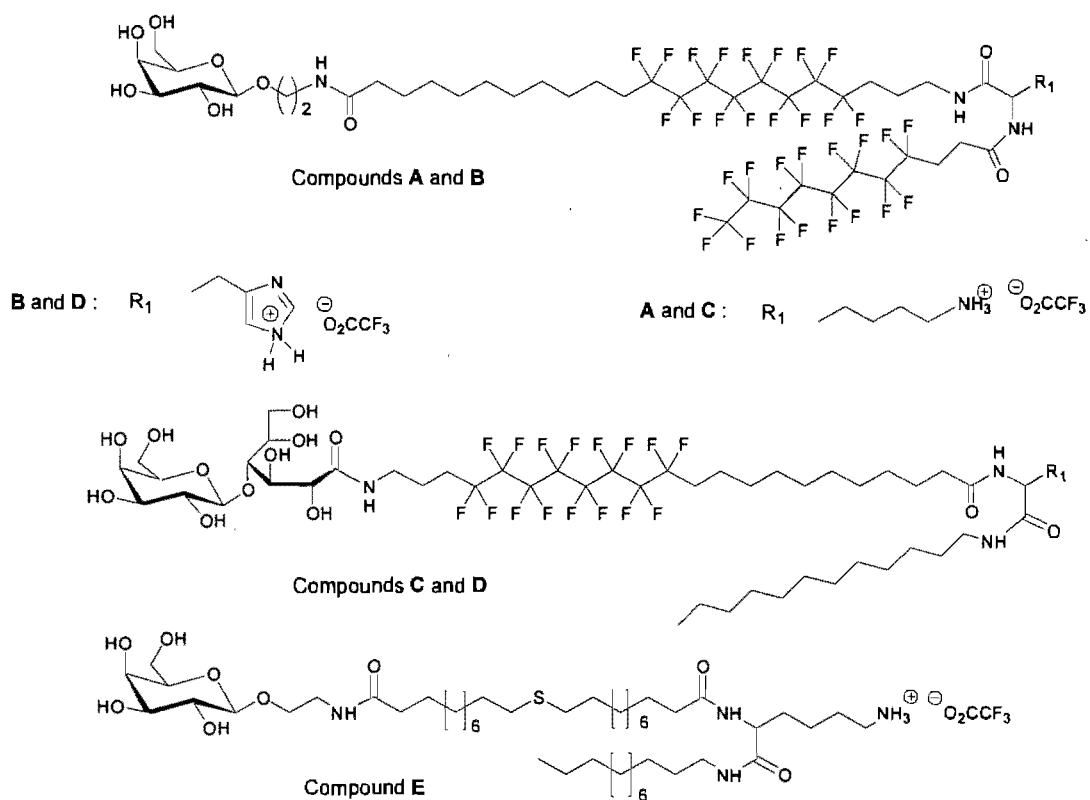
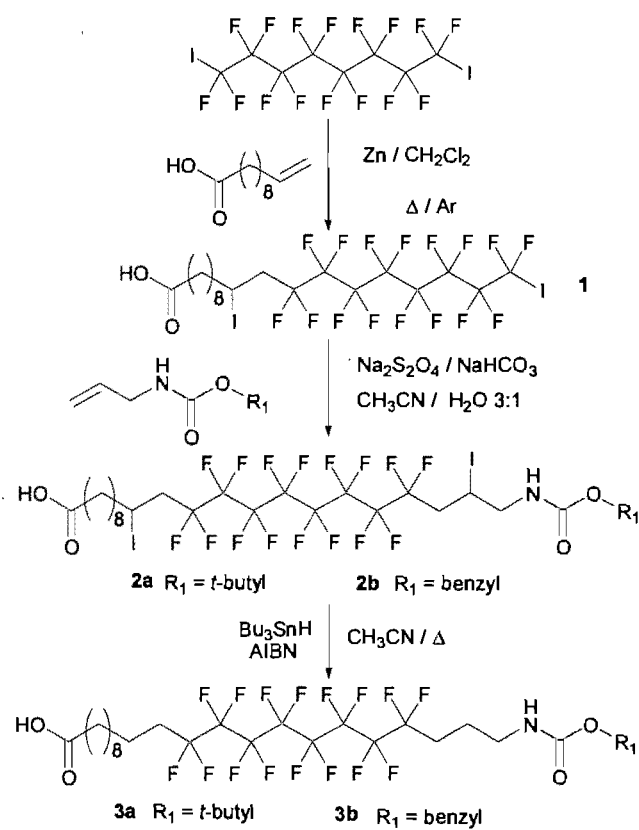
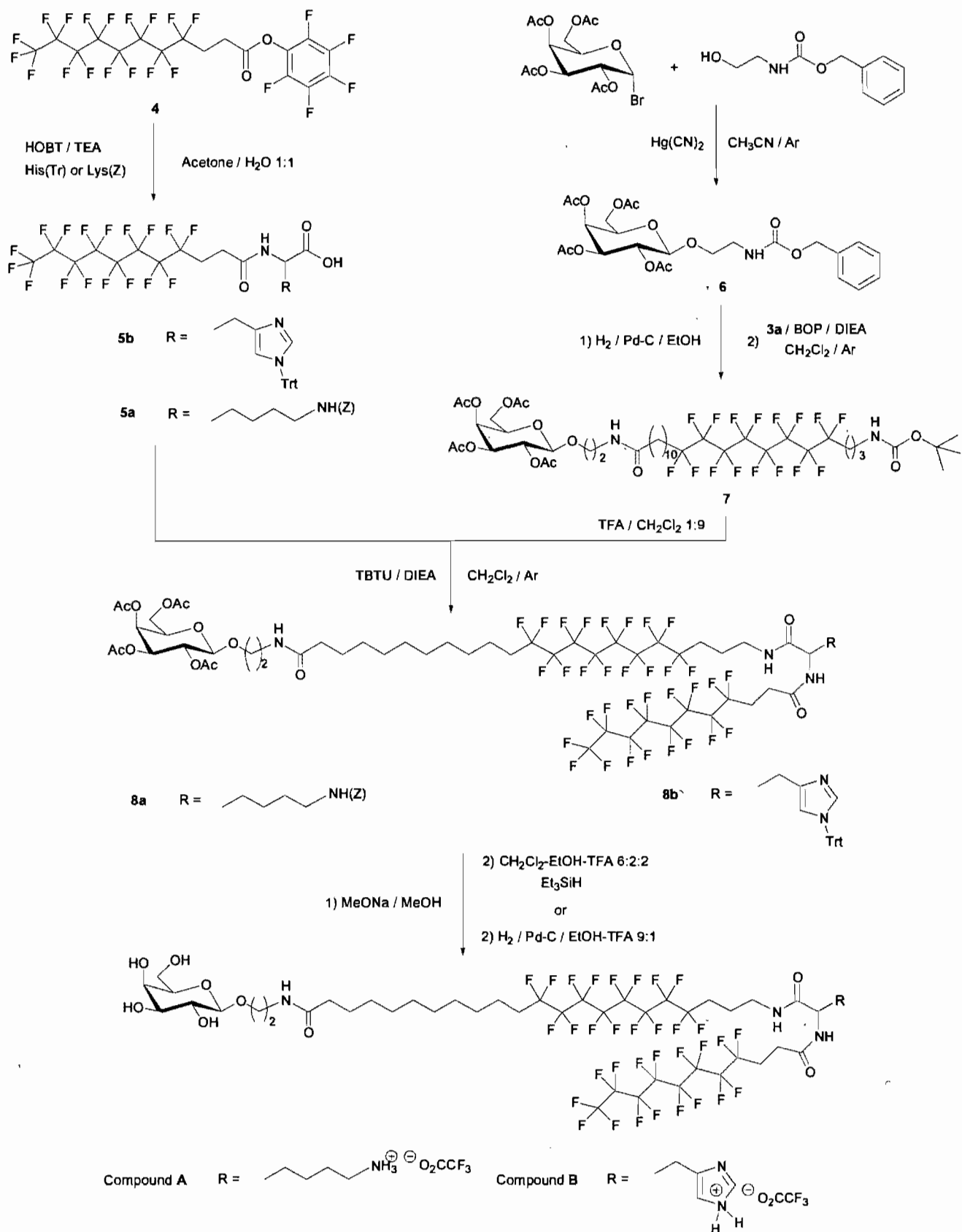


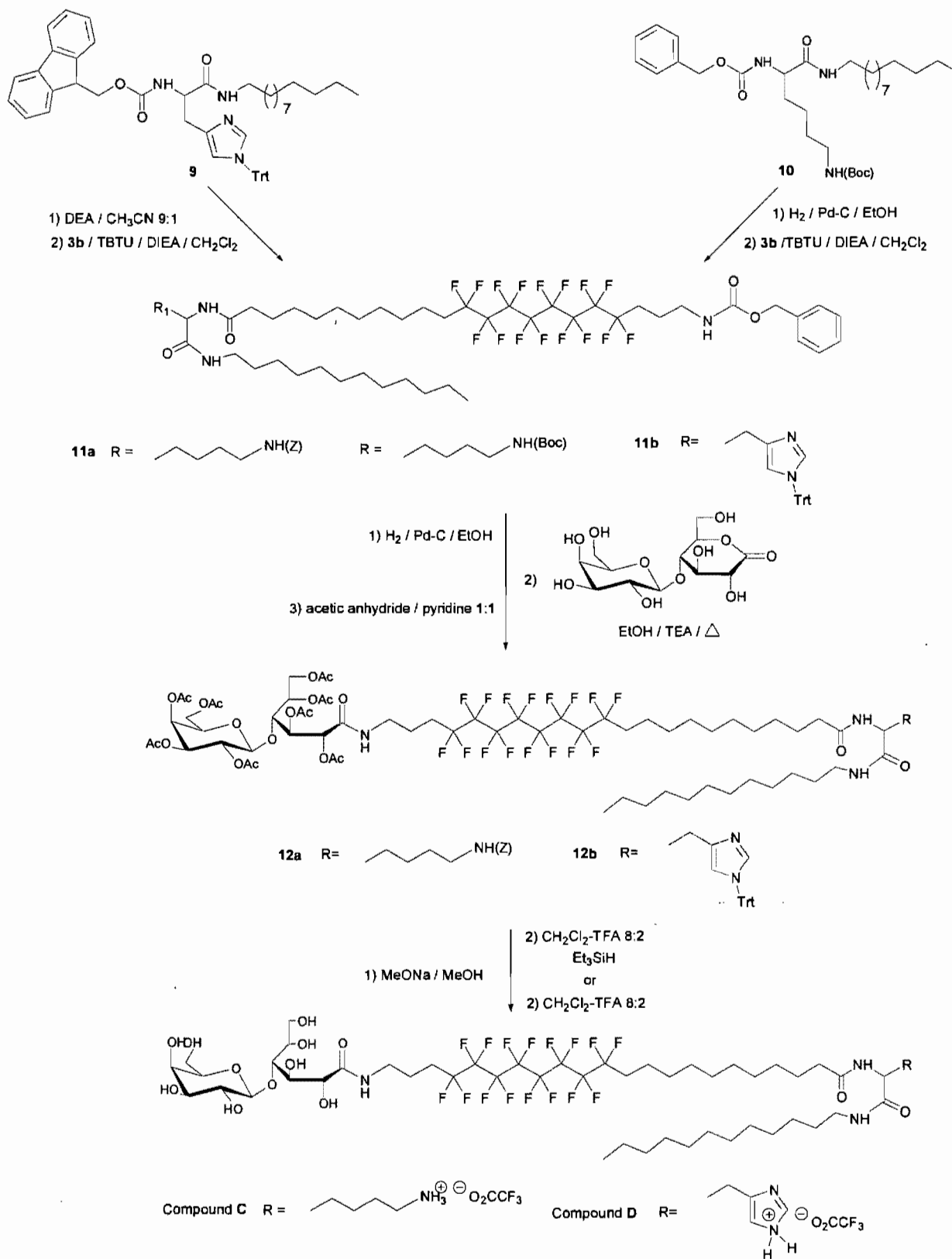
Fig. 2 Chemical structure of hybrid dissymmetric bolaamphiphiles A-E.



Scheme 1 Synthesis of hemifluorinated central

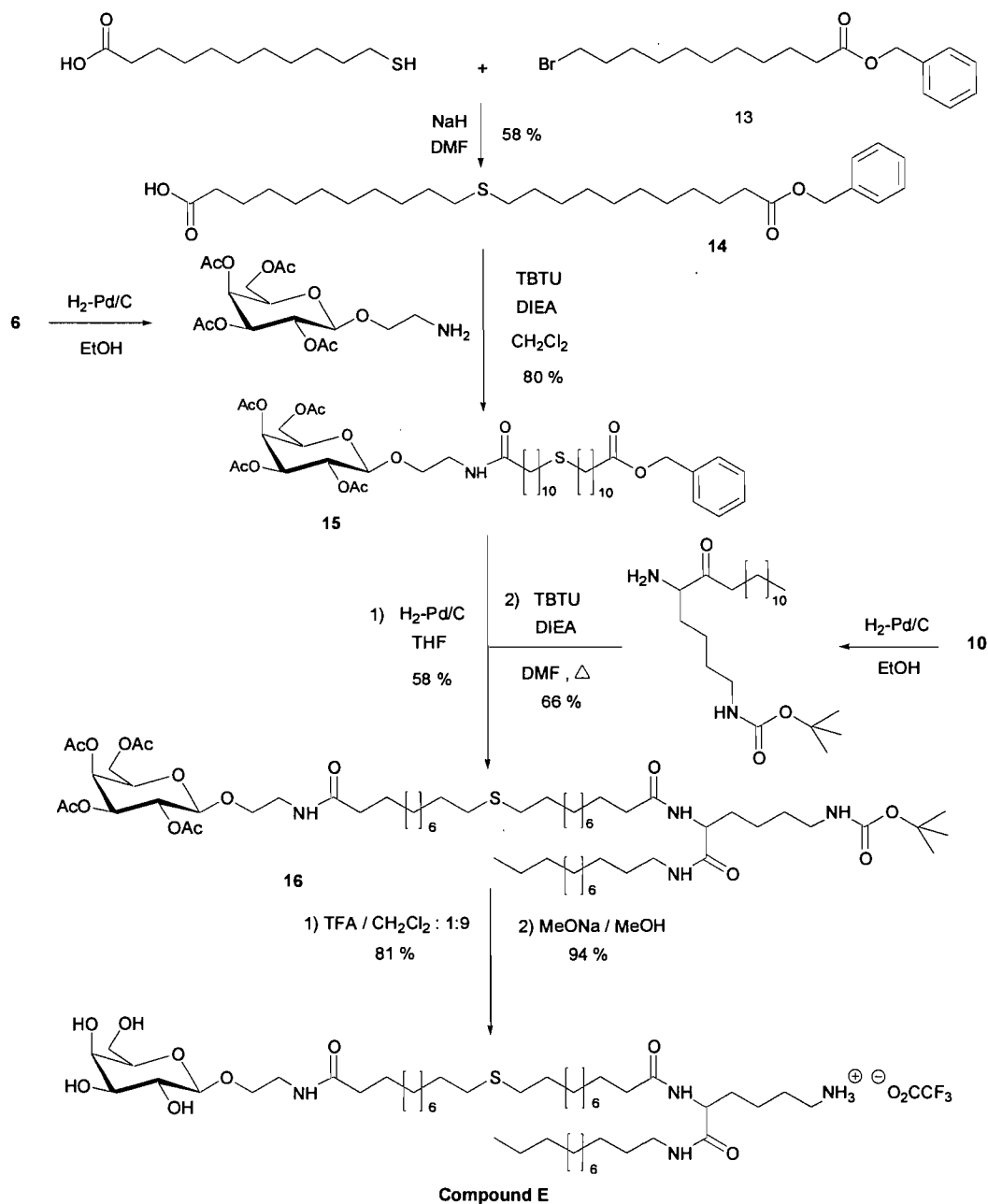


Scheme 2 Synthetic pathway of bolaamphiphiles **A** and **B**.



Scheme 3 Synthetic pathway of bolaamphiphiles **C** and **D**.

After purification of the compounds **8a-b** by successive size exclusion chromatography and chromatography on silica gel column, the sugar moieties were deacetylated by transesterification in a MeONa/MeOH mixture. Then, the protective groups of amino acid moieties were removed either by hydrogenolysis in acidic medium (lysine derivative) or acid hydrolysis (histidine derivative) to provide compounds **A** and **B** which were purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH20).



Scheme 4 Synthetic pathway of bolaamphiphile **E**.

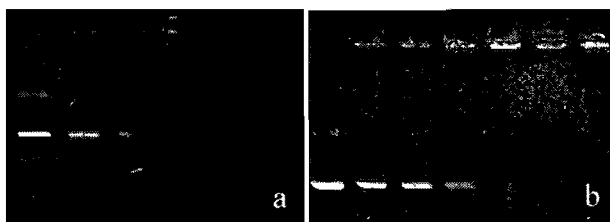


Fig. 3 Representative gel electrophoresis shift assays of naked DNA (lane 1), **a**) C-bolaplexes at N/P ratios of 0.5, 0.75, 1, 1.5, 1.75; (lane 2-6) and **b**) E-bolaplexes at N/P ratios of 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2.5, 5 (lane 2-7).

Compounds **C** and **D** were prepared from dodecylamine as starting material (Scheme 3). *Z*-(*N*^ε-Boc)-lysine and 2-Fmoc-amino-3-(*N*-trityl-imidazolyl) propionic acid were coupled with dodecylamine in the presence of DCC/HOBT to give compounds **9** and **10**. After removal of the α -amino protective groups, **9** and **10** were coupled with compound **3b** in the presence of TBTU to give derivatives **11a** and **11b** in good yields (77-84%). The hydrogenolysis of benzyloxy-carbonyl group supported by their propyl amine residue allowed their condensation with

the lactobionolactone in boiling methanol. To carefully purify these derivatives through chromatographies on silica gel column, their sugar residue was temporarily acetylated with a mixture of anhydrid acetic-pyridine to give compounds **12a** and **12b** in 58-68% yields (2 steps). Removal of acetyl groups with sodium methylate and protective groups of amino acids with TFA finally afforded compounds **C** and **D**. Compound **E** was prepared in 58 % yield from mercaptoundecanoic acid as starting material (scheme 4). Compound **14** was obtained following a substitution reaction of benzyl bromoundecanoate by mercaptoundecanoic acid in DMF with NaH as a strong base. Compound **6** was deprotected by hydrogenolysis and the amine obtained was then coupled with compound **14** in the presence of TBTU and DIEA to provide **15**, the median segment of compound **E**. Amino group of compound **10** was deprotected by hydrogenolysis, then grafted in the presence of TBTU on compound **15** preliminary submitted to a catalytic hydrogenation in order to hydrolyse its acidic function. Removal of protected groups with trifluoroacetic acid and sodium methylate provided finally compound **E** which was submitted to a last purification by size exclusion chromatography (LH 20).

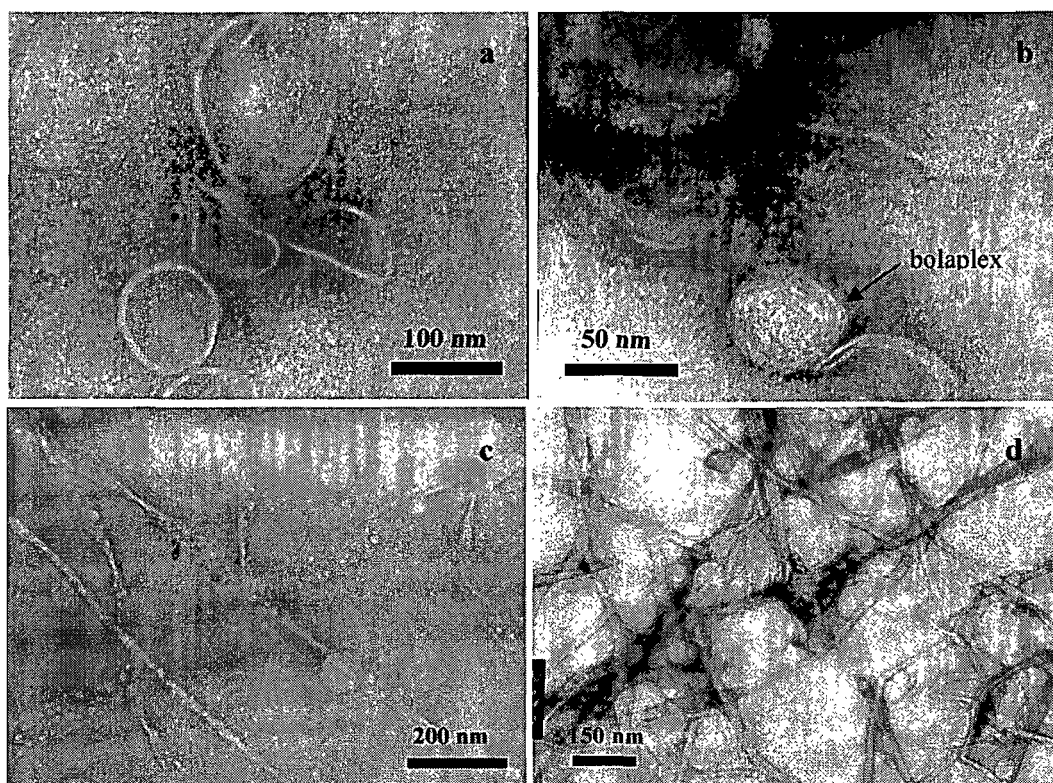


Fig. 4 Representative TEM images showing the morphology of a) bolaamphiphile **C** ($\times 150\text{K}$), b) bolaplex **C** at $N/P=5$ ($\times 300\text{K}$), c) bolaamphiphile **E** ($\times 86\text{K}$), d) bolaplex **E** at $N/P=1.75$ ($\times 86\text{K}$); (arrows indicate the bolaplex with its internal ordering).

Aggregation behavior of bolaamphiphiles

When directly sonicated in water at a concentration of $\sim 4 \cdot 10^{-3}$ M, bolaamphiphiles A-E formed turbid suspensions. The poor stability of the suspensions prepared from bolaamphiphiles A and B [rapid sedimentation at room temperature (~ 15 min), detected by the naked eyes] probably results from their greater fluorine content. In contrast, when compared to the other (A-D) bolaforms, bolaamphiphile E showed a better dispersibility and stability. TEM observation of bolaform E revealed the presence of vesicles (~ 85 nm) and fibers-like aggregates (Fig. 4c), such two-dimensional growth of the aggregates testifying of a rather good solubility. Nevertheless, it was not possible to rely on QELS data given the non spherical aspect of the objects. Sedimentation was also noticed for bolaamphiphile D but to a lesser extent when compared with bolaamphiphiles A and B. Finally, Bolaamphiphile C appeared much more stable than the others fluorinated compounds when dispersed in aqueous conditions. Its greater stability was experienced by

storage in a cold (4 °C) place for at least 12 h. As expected, these observations suggest that both the presence of lysine (much more hydrophilic than histidine) and lactobionamide residues confer a greater hydrophilic character to the bolaamphiphile C and therefore, a greater stability to the suspensions than the other bolaamphiphiles.

In more dilute conditions ($\sim 10^{-6}$ M, concentration at which complexation is carried out), quasi-elastic light scattering measurements (QELS) performed on suspensions made from bolaamphiphile C, indicated the absence of significant evolution of the size of the particles over a period of 1h. The suspension was constituted of a large proportion of particles with small size [238 nm (intensity), 95 %; 115 nm (number), 100%] and also of a small fraction of large size [~ 5.4 μm (intensity), 5 %] that indicated the occurrence of some aggregation. The bolaamphiphile C was examined by transmission electron microscopy (TEM) in the same (dilute) conditions. The observations revealed the presence of vesicles whose sizes were in the range 100-160 nm (Fig. 4a) Bolaamphiphile C also presented better capacities for complexing DNA than the other bolaamphiphiles (A, B, D). For all the reasons mentioned above, bolaamphiphile C was used to demonstrate the transfection capacities of asymmetric fluorinated bolaamphiphiles without the addition of a helper lipid. A detailed comparison of the physico-chemical and biological properties of the bolaamphiphiles A-D is out of the scope of this paper and will be detailed elsewhere.¹⁹

Preliminary biological results

Bolaamphiphile-DNA complexation. The ability of bolaamphiphiles A-E to complex plasmid DNA was tested using agarose gel shift assay that allowed the separation of macromolecules on the basis of both charge and size. It must be stressed that all of the bolaamphiphiles were able to complex DNA due to the electrostatic interactions between the ammonium and the phosphate groups of the two oppositely charged partners (data not shown). The proportion of bolaamphiphiles required to immobilize DNA varies with their chemical structure; for instance bolaamphiphiles with histidine head group appear less efficient in complexing DNA This is not surprising given that a large proportion of free amines of the imidazole groups is probably not protonated (pK_a is close to the physiological pH) under electrophoresis buffering conditions (see experimental part).²⁰

Gel mobility shift assays performed at various N/P [number of amine/number of phosphate] charge ratios for C/DNA bolaplexes are illustrated on Fig. 3a. In the left lane, naked DNA was used as a negative control. At a N/P ratio of 0.50 and 0.75 (lanes 2 and 3), the visible band can be reasonably associated with the free plasmid when compared with the negative control (lane 1). These formulations were also characterized by a negative ζ -potential (-21.4 ± 6.2 mV). At higher N/P ratios ($N/P > 1.0$), all of the bands disappeared, indicating the complete neutralisation of DNA plasmid (lanes 4-6).

On the other hand, a complete DNA neutralization by the non fluorinated bolaamphiphile E was much more difficult to achieve. Indeed at similar ratios, i.e. at $N/P \sim 1.0$, bolaamphiphile E failed to retain DNA (Fig. 3b). The complete DNA retardation was only evidenced at higher ratios, namely in the N/P range 2.5-5.0. Contrasting with C-bolaplexes, a marked fluorescence was observed in the wells even when high amounts bolaform E were used. This indicates that ethidium bromide can diffuse within the DNA strands. Therefore, bolaform E probably fails to efficiently compact DNA. The above comparison between the two bolaamphiphiles (C and E) would suggest that fluorine segments plays a major role in the mechanism of bolaplexes formation, reducing the hydrophilic character of the conjugate and allowing for the increase of the driving force needed for DNA compaction.

Size and morphology of bolaplexes. Size is a crucial factor for particles internalization by non-specific endocytosis. It is well documented that internalization is efficient when particle size is less than 200 nm.^{21,22} Therefore, the size of bolaplexes formed from bolaamphiphile C was investigated by QELS for different N/P ratios. For bolaplexes formed with an excess of bolaamphiphile C (i.e. for N/P ratios of 2.5 and 5) or with a stoichiometric ratio ($N/P=1$) QELS revealed the presence of a bimodal distribution that consists in a fraction of small particle size averaging 225-300 nm (intensity) [130-250 nm (number), 100%] and a significant proportion of aggregates [0.7-1.2 μm (intensity), 27-59%]. For N/P ratios of 1.17 and 1.35, larger particles were observed with a mean diameter of ~ 835 nm (intensity, $\sim 100\%$) [430 nm (number), 100%]. Such a noticeable increase in the size of the particles is generally related to the instability of electroneutral DNA/lipid lipoplexes. The morphology of the particles has also an impact on the transfection efficiency,²³ in particular on the nuclear trafficking.²⁴ At a ratio N/P of 1.7, TEM observations indicated the presence of distinct and relatively spherical particles with a contrasted outline and a diameter of around 65-140 nm [see Fig. 4b]. These particles

were assumed to correspond to bolaplexes. In fact, the propensity of C-bolaplexes to aggregate was also confirmed by TEM at other N/P ratios. At high N/P ratios ($N/P > 1.35$), a mixture of membrane debris and well-defined particles were also observed. A closer examination of Fig. 4b also revealed the internal lamellar ordering of the bolaplexes.

TEM examinations of E-bolaplexes (Fig. 4d) revealed, on a large range of ratios ($1 < N/P < 5$), the persistence of a fiber-like morphology, reminiscent of that observed for the uncomplexed bolaamphiphile E. DNA appeared to be aggregated according an heterogeneously fashion onto the surface of the fibers, confirming the inefficient complexation process occurring between the non fluorinated bolaamphiphile and DNA.

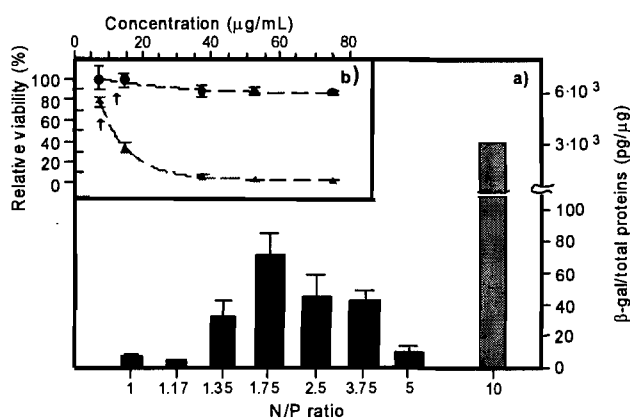


Fig. 5 (a) *In vitro* transfection data of C/pBudCE4.1LacZ/CAT bolaplexes (blue). Standard deviation bars are shown. **(b)** Relative cell viability (%) as a function of bolaamphiphile C concentration (blue). Arrows indicate the optimal ratios. Minima and maxima values are represented as bars. PEI control data are plotted in green.

Transfection and cytotoxicity.

In order to evaluate the gene delivery potential of bolaamphiphile C and its hydrocarbonated analogous compound E, the *in vitro* cytotoxicity as well as the transfection efficiency of bolaamphiphiles C and E/pBudCE4.1LacZ/CAT based-bolaplexes were performed on COS-7 cell lines, as described in the experimental section. Cell viability tests were carried out in the presence of bolaamphiphiles C or E and compared with those obtained from 25 kDa branched poly(ethylenimine) (PEI) which is known to be a very potent transfectant but with an acute cellular cytotoxicity (Fig. 5b). The LC_{50} of PEI was 9 μ g/mL whereas at the same dose of bolaamphiphiles C and E (data not shown), the cell viability was ~ 89 %. The profile under the form of a plateau of the cell viability as a

function of the increasing weight of bolaamphiphile testified the notably low cytotoxicity for high amount of bolaamphiphiles.

To estimate the transfection efficiency of bolaplexes formed from bolaamphiphile **C** or **E**, β -gal protein (encoded by LacZ gene) expressed in COS-7 cells was quantified. The assays were performed in the absence of any helper lipid or co-formulated multifunctional (bola)amphiphile that commonly enhances *in vitro* transfection.²⁵ As illustrated on Fig. 5a, the transfection efficiency as a function of N/P ratios followed an asymmetric bell-shaped profile. The maximal level of transfection was observed at a N/P ratio of 1.75 but gene expression was still significant at higher N/P ratios (2.5 and 3.75). In fact, despite the fact that the transfection level was significantly lower than PEI, (~45 times less efficient than PEI/DNA polyplexes), **C**-bolaplexes generated a significant transfection level, typically higher than three orders of magnitude than naked DNA. This result contrasted with the relatively low transfection efficiency generally obtained with (fluorinated) bolaamphiphiles when used alone, i.e. without the addition of any helper lipids^{27f} or other functional (bola)amphiphile^{27d}. A plausible reason to explain the relative difference measured between the PEI-polyplexes and the **C**-bolaplexes could be the ability of PEI-polyplexes to easily leave the vacuoles of lysosomes.²⁶ In the case of lipoplexes, efficient release in the cytoplasm would origin from a lamellar to a fusogenic inverted hexagonal phase in the acidic environment of the endosomal compartments.⁹ TEM observations revealed the lamellar-like packing of the DNA-bolaamphiphile complexes but so far we have no evidence for such phase transition. It is rather uncommon that such pH phase sensitive behaviour is an intrinsic properties of surfactant.⁹ In fact, DNA-surfactant complexes generally appear undergo the appropriate structural change when helper lipids are incorporated in the formulation.

In closing, it is worth noting that transfection experiments performed with the **E**-bolaplexes were characterized by the absence of any protein expression. The difference in the transfection efficiencies observed between bolaform **C** and **E** maybe due in part to the inability of the non fluorinated bolaform to bind and condense efficiently DNA. This last result suggests that the partial fluorination of the hydrophobic core of these bolaamphiphiles seems to increase not only the self association and DNA complexation abilities of these compounds but also their DNA transfection efficiency.

Conclusion

The synthesis and the characterization of a new series of fluorinated asymmetric bolaamphiphiles, designed for gene delivery, were reported. We demonstrated that fluorinated bolaamphiphiles were capable of binding and condensing DNA in nanoparticles whose sizes were, according TEM observations, in the range 65-150 nm. Preliminary biological data based on transfection and cytotoxicity assays indicated the strong potential of these bolaplexes as DNA delivery system. Indeed bolaamphiphile can present a low cytotoxicity and a significant *in vitro* transfection efficiency without the addition of helper lipids. In this context, post-functionalizations of bolaamphiphiles with a translocation peptide are currently underway with the aim to enhance gene delivery through a co-formulation process.

Experimental

Abbreviations

AcOEt, ethyl acetate; AIBN, 2,2'-azobis isobutyronitrile; Ar, argon; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; BOP, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate; DCC, dicyclohexylcarbo diimide; DCM, methylene dichloride; DIEA, diisopropyl ethylamine; cHex, cyclohexane; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl, His(Tr), 2-amino-3-(*N*-Trityl-imidazolyl) propionic acid; HOBT, 1-hydroxy benzotriazole; PFP, pentafluorophenol, Pyr, pyridine; TBTU, *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyl uronium tetrafluoroborate; TEA, triethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; Tr, trityl; Z, benzyloxycarbonyl; phosphate buffered saline, PBS; polyethylenimine, PEI; Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM; FBS, fetal bovine serum; BCA, bicinchonic acid.; CMV, cytomegalovirus; QELS: quasi elastic light scattering; TEM, transmission electron microscopy

Materials and methods

All solvents were purchased from Acros organics. DCM was distilled from P₂O₅ and THF from sodium. Other solvents were used without further purification. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Acros Organics and were used without further purification. Reactions were monitored by thin layer chromatography using Merck precoated 60F₂₅₄ silicagel plates. Purifications were achieved by column chromatography over silica gel (Merck 60). Melting points were measured on an electrothermal apparatus and have not been corrected. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker AC 250 spectrometer and processed using xwinnmr (Bruker). Chemical shifts are given in ppm relative to tetramethylsilane using the deuterium signal of the solvent as a heteronuclear reference for ¹H, ¹³C and ¹⁹F. Mass spectra were recorded on a APT III Plus Sciex apparatus. Elemental analysis were performed by the service central de microanalyses of the CNRS (Vernaison, France).

Sterile water (DNase free, molecular biology reagent; PBS, PEI (Mw 25000 g.mol⁻¹, branched), and ethyidium bromide were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, On). Cell culture plastics were purchased from Corning Costar (Corning, NY). Zeocin, pBudCE4.1/LacZ/CAT (8433 bp), *Escherichia coli* Top 10 chemically competent cells were from Invitrogen (Burlington, On). Cell proliferation kit MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenylpyrazolium]bromide] assay and β-gal ELISA kit were purchased from Roche Diagnostics GmbH (Laval, PQ). DMEM and OPTI-MEM I reduced serum medium and FBS were purchased from GIBCO Invitrogen Corporation (Burlington, On) and Medicorp (Montréal, PQ), respectively. Endotoxin-free Giga Kit was from QIAGEN (Mississauga, On). COS-7 cell line (Simian virus 40-transformed kidney cells of an African green monkey) was from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA).

DNA preparation

pBudCE4.1/lacZ/CAT plasmid encoding β-galactosidase under the control of the CMV promoter was used. One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* grown in Luria Broth (LB) medium containing Zeocin (50 μg/mL) were transformed with the plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT. The plasmid was isolated and purified using the endotoxin-free Giga Kit and then dissolved in PBS (pH 7.3). The DNA concentration was measured by UV absorption at 260 nm, and the purity was confirmed with A₂₆₀/A₂₈₀ and by 0.8% agarose gel electrophoresis [Tris-acetate-EDTA buffer (TAE, pH 8.0)]. DNA bands were

visualized by UV illumination after coloration by ethidium bromide. DNA restriction analysis was used to confirm the nature of the plasmid. The DNA aliquots were stored at -20 °C prior to use.

Bolaamphiphiles and bolaplexes preparations

Bolaamphiphiles A-E were sonicated in H₂O for 2 hours at 60 °C and pH was adjusted at 7 at a final concentration of 5mg/mL ($\sim 4 \cdot 10^{-3}$ M). Only bolaamphiphiles C and E were found to be stable as observed by the naked eyes (no sedimentation detected after a period at room temperature of at least 4 h). Bolaplexes were prepared in H₂O by directly mixing equal volume of diluted bolaamphiphiles and DNA solution (20 µg/mL DNA). Final DNA concentration was 10 µg/mL.

Gel electrophoresis shift assay

Bolaamphiphile C/DNA or E/DNA complexes were formed at various nitrogen (N)/phosphate (P) ratios [N/P of 0.5, 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2.5 and 5]. 40 µL of freshly prepared bolaplexes solutions (0.4 µg of DNA) were loaded with bromophenol blue in glycerol into 0.8% agarose gel in buffer TAE (pH 8.0) and electrophoresed at 90 V for 1 h. Gel stained with ethidium bromide solution (0.5 mg/L) was transilluminated on ultraviolet light to visualised the DNA and photographed.

Size distribution and zeta (ζ) potential measurement

Size distribution of bolaamphiphile C and E was obtained from quasielastic light scattering (QELS) using Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600). The instrument was equipped with a monochromatic coherent helium neon laser (633 nm) as a light source. The scattered light was recorded at an angle of 90°, and the analysis of the autocorrelation function was performed automatically to yield the diffusion coefficient, D_T , taking the values 1.33 and 25 °C for refractive index and temperature, respectively. Size distributions by intensity or number (see text for details) were given relatively to the hydrodynamic diameter using a bimodal distribution. For bolaplexes, both size and ζ potential measurements were carried out at different N/P ratios with the disposable cell (folded capillary cell DTS 1060). ζ potential was calculated by using the Schmoluchowsky approximation.

Transmission electron microscopy (TEM)

Bolaamphiphile C and E and C or E-bolaplexes prepared at different N/P ratios were analyzed for their morphological characteristics. 10 μ L of the sample was added onto a 150-mesh copper grid covered with Formvar. The excess of solution was gently weaked off with filter paper and the preparation was negatively stained with a droplet of 1% uranyl acetate (aqueous solution at a pH of 4.5) for 2 min. After removal of the stain the grid was air-dried. Samples were observed under transmission electron microscope Philips EM 410 operating at 80 kV.

Transfection protocol

COS-7 cells were used for transfection and cell viability tests. Cells ($2.7 \cdot 10^5$ per well) were grown to 90% confluence 24 h after plating in 6-well tissue culture plates using complete medium [90% (v/v) DMEM containing L-glutamine, 10% FBS] at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (v/v). Immediately before the initiation of β -galactosidase transfection, the medium was removed, the cells were washed twice with PBS, and 1 mL of OPTI-MEM I serum-free medium was added before the addition of the freshly bolaplexes solution (500 μ L, 5 μ g of DNA/well). Serum-free transfection mixtures were incubated for 4 h, and replaced by complete medium without antibiotics for an additional 18 h. β -galactosidase quantity was assayed using a commercially available kit (Roche). Results were expressed as pg of β -galactosidase/ μ g of total protein using the BCA assay (Pierce). Control experiments were performed with naked DNA plasmid (5 μ g/well) and PEI/DNA polyplexes at weight ratios of 1.29 [equivalent to a N/P ratio of 10].²⁸ Experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity

Cytotoxicity of bolaamphiphiles was evaluated by measuring the viability of treated cells as a function of the concentration of bolaamphiphile (μ g/mL). The viability of metabolically viable COS-7 cells was measured by using the MTT Cell Proliferation Assay kit, 24 h after incubation with the bolaamphiphile. Cells were grown in 96-well plates 24 h before at an initial seeding density of $1.9 \cdot 10^4$ cells/well in 100 μ L of DMEM. Bolaamphiphile were directly dissolved in OPTI-MEM I at different concentration (μ g/mL) [related to the transfection experiments]. Untreated cells were used as positive control and PEI cells treated for comparison model. Cells were grown for 24 h in the presence of complexes and

then immediately tested for metabolic activity. MTT reagent (10% v/v) was added to each well (final concentration 0.5 mg/mL). After 4 h of incubation at 37 °C, the purple insoluble salt was dissolved by adding 100 µL of solubilization solution. The plate was incubated in the dark at 37 °C for 24 h. Absorbance was measured at 550 nm using a reference wavelength of 650 nm. The results were expressed as a relative percentage of cell viability related to the control (untreated cells). Cell viability (%) = $(OD_{550}(\text{sample})/OD_{550}(\text{negative control})) \times 100$. Experiments were performed in triplicate.

Synthesis

10,19-diiodo-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluoronadecanoic acid (1)

Undecylenic acid (0.289 g, 1.53 mmol), 1,8-diiodoperfluorooctane (2 g, 3.06 mmol) and zinc dust (0.4 g) were dissolved in freshly distilled and degassed DCM (10 mL) under argon. The mixture was refluxed for 2 hours. The mixture was diluted with DCM (20 mL) and filtered over celite. The solvent was removed from the filtrate *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 9:1) to yield 900 mg (1.07 mmol, 70 %) of monoadduct intermediate **1** as a white solid. Rf: 0.5 (cHex:AcOEt 7:3), mp: 66-68°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.29-1.45 (10H, s, CH₂ chain), 1.66 (2H, m, HO₂C-CH₂-CH₂), 1.80 (2H, m, CH₂-CH₂-CHI), 2.38 (2H, t, HO₂C-CH₂, J = 7.5 Hz), 2.85 (2H, m, CH₂-CF₂), 4.34 (1H, m, CHI). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): 20,9 (HO₂C-CH₂-CH₂), 24,6 (CHI), 28,4-29,4 (CH₂ chain), 34,0 (HO₂C-CH₂), 40,0 (CH₂-CHI), 41,9 (CH₂-CF₂), 106.9-117.9 (CF₂), 180.3 (CO). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -60 (2F, s, CF₂I), -111.0 to -115.3 (4F, m, CH₂-CF₂, CF₂-CF₂I), -120.8 to -123.5 (10F, m, 5 CF₂).

22-N-(tert-butyloxycarbonyl)-10,21-diiodo-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanoic acid (2a)

Compound **1** (2 g, 2.38 mmol) and Boc-allylamine (1.5 g, 9.55 mmol) were dissolved in 15 mL freshly distilled acetonitrile. Sodium dithionite (0.414 g, 2.38 mmol) and sodium hydrogenocarbonate (0.4 g, 4.76 mmol) dissolved in 5 mL of distilled water were added to the mixture. After stirring for 16 h at room temperature, the mixture was acidified to pH=3 with 2M HCl. Acetonitrile was removed *in vacuo* and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layers were washed with 1 M HCl then water and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 8:2) to yield 1.9 g (1.9 mmol, 80 %) of compound **2a** as a white solid. Rf: 0.51 (cHex:AcOEt 6:4). mp: 93-95°C. ¹H NMR

(CDCl₃, 250 MHz): δ 1.27-1.40 (10H, s, CH₂ chain), 1.47 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.63 (2H, m, HO₂C-CH₂-CH₂), 1.79 (2H, m, CH₂-CH₂-CHI), 2.35 (2H, t, HO₂C-CH₂, J = 7.5 Hz), 2.83 (4H, m, 2 CH₂-CF₂), 3.58 (2H, m, CH₂-NH), 4.37 (2H, m, 2 CHI), 5.09 (1H, s, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 18.8 (CHI-CH₂-NH), 20.9 (HO₂C-CH₂-CH₂), 24.6 (CHI-CH₂-CF₂), 26.9-33.9 (CH₂ chain, C(CH₃)₃), 33.9 (HO₂C-CH₂), 38.6 (CF₂-CH₂), 40.3 (CH₂-CHI), 41.7 (CH₂-CF₂), 49.0 (CH₂-NH), 81.1 (C(CH₃)₃), 106.1-121.9 (CF₂), 155.7 (NH-CO), 179.1 (CO₂H). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -112.2 to -114.1 (4F, m, 2 CH₂-CF₂), -120.8 to -123.5 (12F, m, 6 CF₂).

22-N-(tert-butyloxycarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanoic acid (3a)

Compound **2a** (1.85 g, 1.86 mmol) was dissolved in 20 mL of anhydrous and degassed acetonitrile with argon. The solution was refluxed and then Bu₃SnH (1.10 mL, 4.09 mmol) and AIBN (0.34 g, 2.04 mmol) dissolved in 2 mL of dry acetonitrile were added slowly *via* a syringe. The mixture was refluxed for 16 h under argon. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 8:2) to yield 830 mg (1.11 mmol, 60 %) of compound **3a** as a white solid. Rf: 0.53 (cHex:AcOEt 6:4). mp: 99-100°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.23-1.39 (12H, m, CH₂ chain), 1.47 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.61 (4H, m, HO₂C-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CF₂), 1.80 (2H, m, CH₂-CH₂-NH(Boc)), 2.15 (4H, m, 2 CH₂-CF₂), 2.35 (2H, t, HO₂C-CH₂, J = 7.5 Hz), 3.24 (2H, m, CH₂-NH), 4.67 (1H, s, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 20.1-21.3 (CH₂-CH₂-NH, HO₂C-CH₂-CH₂), 24.8-31.2 (CH₂ chain, C(CH₃)₃, 2 CH₂-CF₂), 34.0 (HO₂C-CH₂), 39.6 (CH₂-NH), 79.6 (C(CH₃)₃), 106.5-122.4 (CF₂), 156 (NH-CO), 179.7 (CO₂H). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.27 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -121.86 to -123.59 (12F, m, 6 CF₂).

22-N-(benzyloxycarbamoyl)-10,21-diiodo-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanoic acid (2b)

The same procedure as used for compound **2a** was applied to **2b**. From compound **1** (2 g, 2.386 mmol), *Z*-allylamine (1.37 g, 7.158 mmol), sodium dithionite (0.415 g, 2.39 mmol) and sodium hydrogenocarbonate (0.4 g, 4.77 mmol), 1.6 g (1.55 mmol, 65%) of compound **2b** was obtained as a white powder after purification by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 9:1), Rf: 0.32 (cHex:AcOEt 8:2). mp: 74-76°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.25-1.55 (10H, m, CH₂ chain), 1.66 (2H, m, CH₂-CH₂-CO₂H), 1.82 (2H, m, CH₂-CH₂-CHI), 2.37 (2H, t, HO₂C-CH₂, J³ = 7.5 Hz), 2.86 (4H, m, 2 CH₂-CF₂), 3.55 (1H, m, CHI),

3.66 (1H, m, CHI), 4.38 (2H, m, CHI-CH₂-NH), 5.16 (2H, s, CH₂-Φ), 7.27 (1H, s, NH), 5.39 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 18,4 (CHI-CH₂-NH), 20,9 (HO₂C-CH₂-CH₂), 24,6 (CHI-CH₂-CF₂), 28,4-29,5 (CH₂ chain), 34,0 (HO₂C-CH₂), 38,7 (CF₂-CH₂), 40,3 (CH₂-CHI), 41,7 (CH₂-CF₂), 49,3 (CH₂-NH), 67,3 (CH₂-Φ), 106,3-121,8 (CF₂), 128,4 (CH_{arom.}), 146,2 (CH_{arom.}), 156,3 (NH-CO), 179,1 (CO₂H). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -111 to -115.1 (4F, m, 2 CH₂-CF₂), -121.7 (8F, s, 4 CF₂), -123.2 (4H, s, 2 CF₂).

22-N-(benzyloxycarbonyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanoic acid (3b)

Deiodination was carried out with the same procedure used for compound **3a**. from compound **2b** (1.5 g, 1.46 mmol), Bu₃SnH (863 μL 3.21 mmol) and AIBN (0.263 g 1.60 mmol), 610 mg (0.78 mmol, 54%) of compound **3b** was obtained as a white powder after purification by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 8:2) and recrystallization from heptane. Rf : 0.36 (cHex-AcOEt 6:4). mp: 97-98°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.32 (12H, m, CH₂ chain), 1.63 (4H, m, CH₂-CH₂-CO₂H, CH₂-CH₂-CF₂), 1.86 (2H, m, CH₂-CH₂-NH), 2.07 (4H, m, 2 CH₂-CF₂), 2.35 (2H, t, HO₂C-CH₂, J³ = 7.5 Hz), 3.31 (2H, t, CH₂-NH, J³ = 6 Hz), 4.88 (1H, s, NH), 5.14 (2H, s, CH₂-Φ), 7.36 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 20.1-30.6 (CH₂ chain, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CH₂-NH(Z)), 34.0 (HO₂C-CH₂), 40.,2 (CH₂-NH(Z)), 66.9 (CH₂-Φ), 106.5-123.1 (CF₂), 128.1-128.6 (CH_{arom.}), 136.1 (C_{arom.}), 156,9 (NH-CO-O), 179.4 (HO₂C). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.3 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -121.8 (8F, m, 4 CF₂), -123.5 (4F, s, 2 CF₂).

Pentafluorophenyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-hepta decafluoroundecanoate (4)

4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-perfluoroundecanoic acid (3 g, 6.1 mmol) and pentafluorophenol (1.23 g, 6.7 mmol) were dissolved in 20 mL of freshly distilled DCM. The mixture was cooled to 0°C and DCC (1.63 g, 7.9 mmol) was added. After stirring for 12 h at room temperature the solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 9:1) then recrystallized from AcOEt/Hexane to yield 3.9 g (5.92 mmol, 97 %) of compound **4** as white crystals. Rf : 0.44 (cHex-AcOEt 7:3), mp: 48-50°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 2.55 (2H, m, CH₂-CF₂), 3.05 (2H, t, CH₂CO, J³ = 7.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 25.09 (CH₂-CO), 26.5 (CF₂-CH₂), 106.6-121.7 (CF₂), 136.0 (2 CF_{PPF}), 138.7 (CF_{PPF}), 143.1 (2 CF_{PPF}), 167.5 (CO). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -80.9 (3F, s, CF₃), -114.8 (2F, s, CF₂-CH₂), -121.8

to -123.5 (10F, m, 5 CF₂), -126.2 (2F, s, CF₃-CF₂), -152.8 (2F, s, 2 CF_{PFPP}), -157.3 (1F, s, CF_{PFPP}), -162.1 (2F, s, 2 CF_{PFPP}).

***N*^α-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecanoyl)-*N*^ε-(benzyloxy-carbonyl)lysine (5a)**

Lys(Z)OH (0.5 g 1.78 mmol) and HOBT (0.12 g, 0.89 mmol) were dissolved in 10 mL of acetone/distilled water (1:1). The solution was basified to pH=8-9 with TEA. Compound 4 (1.29 g, 1.96 mmol) dissolved in 2 mL of acetone was added dropwise. After stirring for 12 h at room temperature the mixture was acidified to pH=2 with 3M HCl solution and the solvent removed *in vacuo*. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate three times. The organic layer was washed with 1M HCl solution and water, dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 5:5 to cHex:AcOEt 3:7) to yield 834 mg (1.10 mmol, 62 %) of 5a as a white solid. Rf: 0.46 (AcOEt), mp: 112-114°C, [α]_D²⁰: +3,94° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.31-1.52 (4H, m, CH₂-(CH₂)₂-CH₂), 1.83 (2H, m, CH-CH₂), 2.46-2.57 (4H, m, CH₂-CH₂-CF₂), 3.19 (2H, m, CH₂-NH(Z)), 4.57 (1H, m, CH-CH₂), 5.09 (2H, s, CH₂-Φ), 5.25 (1H, s, NH), 7.29 (5H, s, CH_{arom.}), 7.87 (1H, s, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 22.1-30.9 (CH₂-CH₂-CF₂, CH-(CH₂)₃), 40.1 (CH₂-NH(Z)), 52.4 (CH), 67.3 (CH₂-Φ), 106.5-122.2 (CF₂), 126.5-128.6 (CH_{arom.}), 138.6 (C_{arom.}), 151.8 (NH-CO-O), 169.5 (NH-CO-CH₂), 173.1 (HO₂C). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -80.7 (3F, s, CF₃), -114.6 (2F, s, CF₂-CH₂), -121.9 to -126.1 (12F, m, 6 CF₂).

***N*^α-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecanoyl)-*N*^{im}-(trityl) histidine (5b)**

The procedure described for the synthesis of compound 5a was applied to 5b. From His(Trt)OH (0.640 g, 1.61 mmol), HOBT (0,109 g, 0,81 mmol) and compound 4 (1,165 g, 1,77 mmol) and after purification by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 9:1 to AcOEt-MeOH 9:1) and recrystallization from AcOEt/n-Heptane 1.15 g of compound 5b was obtained (1.32 mmol, 82 %) as white crystals. Rf: 0.33 (AcOEt-MeOH 9:1). mp: 109-111°C. [α]_D²⁰: +14.03° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (DMSOd₆, 250 MHz, 45 °C): δ 2.34-2.51 (4H, m, CH₂-CH₂-CF₂), 2.88 (2H, m, CH₂-CH), 4.52 (1H, m, CH-CH₂), 6.9-7.4 (17H, m, CH_{arom.}, CH_{his}), 8.04 (1H, s, OH), 8.37 (1H, d, NH, J³ = 8 Hz). ¹³C NMR (DMSOd₆, 62.86 MHz): δ 26.1-28.8 (CO-CH₂-CH₂-CF₂), 39.6 (CH-CH₂), 52.2 (CH-CH₂), 76.4 (C(Φ)₃), 105.8-119.3 (CF₂, CF₃), 120.6 (N-CH=C_{his}), 128.8-130.1 (CH_{arom.}), 134 (C_{his}), 137.6 (N-C=N_{his}), 141.7 (C_{arom.}), 169.7 (NH-CO), 172.9 (CO-OH). ¹⁹F NMR (DMSOd₆, 235.19

MHz): δ -80.2 (3F, s, CF₃), -113.3 (2F, s, CH₂-CF₂), -121.4 to -122.9 (10F, m, 5 CF₂), -125.5 (2F, s, CF₂-CF₃).

O-benzyl-N-[2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl)- β -D-galactopyranosyl oxy)ethyl]carbamate (6)
 O-benzyl-N-hydroxyethylcarbamate (4 g, 20.51 mmol), Hg(CN)₂ (7.77 g, 30.76 mmol) and molecular sieves (3 Å) (2 g) were stirred in 50 mL of anhydrous and degassed acetonitrile under argon. After stirring for 15 min, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl bromide (12.64 g, 30.76 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 day at room temperature. The resulting mixture was filtered and the solvent was removed from the filtrate *in vacuo*. The crude product was dissolved in ethyl acetate (100 mL) and the organic layer washed successively with 10 % NaHCO₃ solution, 10 % KI solution, 10% sodium thiosulfate solution. The solution was dried over sodium sulphate, concentrated *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 6:4) to yield 6.78 g (12.91 mmol, 63 %) of compound **6** as a white solid. Rf: 0.46 (cHex:AcOEt 4:6), mp: 46-48°C. $[\alpha]_D^{20}$: +20,7° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.95-2.13 (12H, m, CH₃CO), 3.38 (2H, m, CH₂-NH), 3.89 (2H, t, O-CH₂, J³ = 6 Hz), 4.11 (3H, m, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎), 4.45 (1H, d, CH₍₁₎ α , J³ = 7,5 Hz), 4.96-5.49 (6H, m, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₂- Φ , NH), 7.31 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 20.6 (CH₃CO), 61.3-70.6 (CH₂- Φ , CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₍₆₎), 101.5 (C_{1 β}) 128.3 (CH_{arom.}), 136.4 (C_{arom.}), 156.4 (CO-CH₂- Φ), 169.7-170.5 (CO-CH₃).

N-[2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl)- β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-N-(tert-butyloxy-carbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (7)

Compound **6** (604 mg, 1.15 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (69 mg, 60 mg/mmol) was added portionwise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 12 h at room temperature. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in 5 mL of freshly distilled DCM. Compound **3a** (713 mg, 0.96 mmol) and BOP reagent (508 mg, 1.15 mmol) were added. The mixture was basified to pH=8 with DIEA. After stirring for 12 h under argon, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 5:5 to cHex:AcOEt 2:8) to yield 514 mg (0.46 mmol, 48 %) of compound **7** as a white solid. Rf: 0.6 (AcOEt). mp: 45-47°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.35 (12H, m, CH₂ chain), 1.46 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.61 (4H, m, NH-CO-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CF₂), 1.76 (2H, m, CF₂-

CH₂-CH₂-CH₂-NH(Boc)), 1.96-2.30 (18H, m, CH₃CO, 2 CH₂-CF₂, NH-CO-CH₂), 3.15 (2H, t, CH₂-NH(Boc), J³ = 6,5 Hz), 3.37 (2H, m, CH₂NH), 3.70 (1H, m, OCH₂), 3,86 (1H, m, OCH₂), 4,15 (3H, m, CH₂₍₆₎, CH₍₅₎), 4,68 (1H, d, CH_{(1)α}, J = 7.25 Hz), 4.91-5.51 (4H, m, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 19.1-20.7 (CH₃-CO, CH₂-CH₂-NH(Boc), NH-CO-CH₂-CH₂), 25.6-29.1 (CH_{2 chain}, 2 CH₂-CF₂, C(CH₃)₃, NH-CO-CH₂), 35.7 (CH₂-NH(Boc)), 38.9 (OCH₂-CH₂-NH), 61.2 (CH₂₍₆₎), 67.4-71 (OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎), 78.7 (C(CH₃)₃), 100.8 (C_{1β}), 105.3-122.5 (CF₂), 157.1 (CO_{Boc}), 170.1-170.6 (CO-CH₃), 175.1 (NH-CO-CH₂). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -115.3 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -122.8 to -124.5 (12F, m, 6 CF₂).

***N*-[2-((2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)-β-*D*-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecacarbamoyl)-6-(benzyloxycarbamoyl)hexacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (8a)**

Compound 7 (200 mg, 0.179 mmol) was dissolved in 5 mL of TFA/CH₂Cl₂ 2:8 mixture. After stirring for 1 h the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in 10 mL of ethyl ether and the solvent removed *in vacuo*. The operation was repeated twice until total removal of TFA. The crude product was dissolved in 5 mL of freshly distilled DCM. Compound 5a (162 mg, 0.215 mmol) and TBTU (75 mg, 0.233 mmol) were added. The mixture was basified to pH=8-9 with DIEA. After stirring for 16 h under argon in boiling DCM (CH₂Cl₂), the solvent was removed *in vacuo*, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 8:2) and filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH:CH₂Cl₂ 1:1) to yield 220 mg (0.12 mmol, 70 %) of fully protected compound 8a as a white solid. R_f: 0.46 (AcOEt) mp: 100-101°C. [α]_D²⁰: -4.17° (C, 1, CH₂Cl₂), ¹H NMR (DMSO_d₆, 250 MHz): δ 1.21-1.72 (24H, m, CH_{2 chain}, CH₂-CH₂-CH₂-NH(Z), CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, CH-CH₂), 1.90-2.11 (18H, m, CH₃CO, 2 CH₂-CF₂, NH-CO-CH₂), 2.39 (4H, m, C₈F₁₇-CH₂-CH₂), 2.97 (2H, m, CH₂-NH-(Z)), 3.17 (4H, m, CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH), 3.51 (1H, m, OCH₂), 3.64 (1H, m, OCH₂), 4.04 (3H, m, CH-CH₂, CH₂₍₆₎), 4.18 (1H, m, CH₍₅₎), 4.82 (1H, d, CH_{(1)α}, J³ = 8 Hz), 4.90-5.00 (3H, m, CH₍₂₎, CH₂-Φ), 5.15 (1H, dd, CH₍₃₎, J³ = 3.25 Hz, J³ = 10.5 Hz), 5.26 (1H, m, CH₍₄₎), 7.25 (1H, m, NH), 7.29 (5H, s, CH_{arom.}), 7.78 (1H, m, NH), 7.99 (1H, m, NH), 8.25 (1H, m, NH-CH). ¹³C NMR (DMSO_d₆, 62.86 MHz): δ 20.0-31.3 (CO-CH₃, CH_{2 chain}, CF₂-CH₂-CH₂-CO, CH₂-CF₂, CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, CH-CH₂-CH₂-CH₂), 35.7-41.0 (OCH₂-CH₂-NH, CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, CH₂-NH(Z)), 54.2 (CH-CH₂), 61.7 (CH₂₍₆₎), 65.5-71.1 (CH₍₂₎,

CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂-Φ, OCH₂-CH₂), 100.5 (C_{1β}), 105.9-119.8 (CF₂, CF₃), 128.2 -128.8 (CH_{arom.}), 137.7 (C_{arom.}), 156.5 (NH-CO-O), 169.6-172.8 (CO-CH₃, NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CH-NH-CO). ¹⁹F NMR (DMSO_{d6}, 235.19 MHz): δ -80.2 (3F, s, CF₃), -114.3 (6F, s, 3 CF₂), -121.8 to -123.4 (22F, m, 11 CF₂), -126 (2F, s, CF₂). m/z (FAB⁺MS): [M+H⁺] 1753, [M+Na⁺] 1775.

***N*-[2-(β-D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecacarbamoyl)-6-(benzyloxycarbamoyl)hexacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (deacetylated compound 8a)**
 Compound 8a (180 mg, 0.103 mmol) was dissolved in 10 mL of MeOH. Catalytic amount of sodium methylate was added. After stirring for 6 h, IRC50 ion exchange resin (1 g) was added. After 10 min the mixture was filtered. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 153 mg (0.096 mmol, 94 %) of deacetylated compound 8a as a white solid. R_f : 0.67 (AcOEt:MeOH:H₂O 7:2:1). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 1.18-1.85 (24H, m, CH_{2 chain}, CH₂-CH₂-CH₂-NH(Z), CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, CH-CH₂), 2.08-2.26 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, NH-CO-CH₂), 2.46-2.64 (4H, m, C₈F₁₇-CH₂-CH₂), 3.11-3.97 (14H, m, CH₂-NH(Z), CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎), 4.26 (2H, m, CH_{(1)α}, CH-CH₂), 5.09 (2H, s, CH₂-Φ), 7.33 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CD₃OD, 62.86 MHz): δ 19.9-30.9 (CH_{2 chain}, CF₂-CH₂-CH₂-CO, CH₂-CF₂, CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, CH-CH₂-CH₂-CH₂), 35.7-40.0 (OCH₂-CH₂-NH, CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, CH₂-NH-(Z)), 54.1 (CH-CH₂), 61.1 (CH₂₍₆₎), 65.9-73.3 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂-Φ, OCH₂-CH₂), 103.7 (C_{1β}), 104.5-123.6 (CF₂, CF₃), 127.3-128.1 (CH_{arom.}), 137 (C_{arom.}), 157.6 (NH-CO-O), 168.5-175.0 (NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CH-NH-CO). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -82.2 (3F, s, CF₃), -115.1 (6F, s, 3 CF₂), -122.6 to -124.3 (22F, m, 11 CF₂), -127.0 (2F, s, CF₂).

***N*-[2-(β-D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecacarbamoyl)-6-(ammonium trifluoroacetate)hexacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (A)**
 Deacetylated compound 8a (153 mg, 0.0966 mmol) was dissolved in 10 mL of methanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (20 mg, 200 mg/mmol) was added portionwise. TFA (22 mg, 0.193 mmol) was added and the mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 48 h. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in diethylether and the solvent removed *in vacuo*. The operation was repeated twice until total removal of TFA. The crude product was purified by filtration over size exclusion chromatography LH20

(MeOH) to yield 142 mg (0.090 mmol, 94 %) of final compound **A** as a white solid. mp (dec) > 123°C. $[\alpha]_D^{20}$: -3.07° (C, 1, MeOH). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 1.35-1.86 (24H, m, CH_2 chain, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$, $\text{CF}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, CH-CH_2), 2.07-2.25 (6H, m, 2 $\text{CH}_2\text{-CF}_2$, NH-CO-CH_2), 2.44-2.67 (4H, m, $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.90-3.96 (14H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$, $\text{CF}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{2(6)}$), 4.27-4.30 (2H, m, $\text{CH}_{(1)\alpha}$, CH-CH_2). ^{13}C NMR (CD_3OD , 62.86 MHz): δ 22,4-30,7 (CH_2 chain, $\text{CF}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-CF}_2$, $\text{CF}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 35.7-42.0 ($\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CF}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$), 53.7 (CH-CH_2), 61.1 ($\text{CH}_{2(6)}$), 68.2-75.3 ($\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), 103.7 ($\text{C}_{1\beta}$), 106.9-123.2 (CF_2 , CF_3), 171.5-173.1-175.1 (3 NH-CO). ^{19}F NMR (CD_3OD , 235.19 MHz): δ -76.8 (3F, s, $\text{CF}_3\text{-CO}_2^-$), -82.2 (3F, s, CF_3), -115.3 (6F, s, 3 CF_2), -122.6 to -124.3 (22F, m, 11 CF_2), -127 (2F, s, CF_2). m/z (FAB⁺MS): $[\text{M}^+]$ 1451 (without CF_3COO^-). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{49}\text{H}_{60}\text{F}_{36}\text{N}_4\text{O}_{11}$, $2\text{H}_2\text{O}$: C: 36.76, H: 4.03, N: 3.50 found C: 37.19, H: 4.14, N: 3.72.

***N*-[2-((2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-hepta-decafluoroundecarbamoyl)-3-(*N*^{im}-(trityl)imidazolyl)propacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19hexadecafluorodocosanamide (**8b**)**

The same procedure as used for compound **8a** was applied to compound **8b**. From compound **7** (226 mg, 0.20 mmol), compound **5b** (209 mg, 0.24 mmol) and TBTU (83.5 mg, 0.26 mmol), 277 mg (0.15 mmol, 73 %) of compound **8b** was obtained as a white powder after purification by flash chromatography on silica gel (AcOEt) and filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH: CH_2Cl_2 1:1). Rf: 0.7 (AcOEt-MeOH 9.5:0.5). mp: 72.7-74.5°C. $[\alpha]_D^{20}$: +2.76° (C, 1, CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz, 45°C): δ 1.25-1.32 (12H, m, CH_2 chain), 1.62 (4H, m, $\text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CF}_2$), 1.82 (2H, m, $\text{CF}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.00-2.22 (18H, m, CH_3CO , 2 $\text{CH}_2\text{-CF}_2$, NH-CO-CH_2), 2.55 (4H, m, $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.89 (1H, m, CH-CH_2), 3.05 (1H, m, CH-CH_2), 3.31 (2H, m, $\text{CF}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.50 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.72 (1H, m, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.92 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_{(5)}$), 4.16 (2H, d, $\text{CH}_{2(6)}$, $J^3 = 6.75$ Hz), 4.50 (1H, d, $\text{CH}_{(1)\alpha}$, $J^3 = 7.85$ Hz), 4.60 (1H, td, CH-CH_2 , $J^3 = 5.15$ Hz), 5.05 (1H, dd, $\text{CH}_{(2)}$, $J^3 = 3.35$ Hz, $J^3 = 10.45$ Hz), 5.21 (1H, dd, $\text{CH}_{(3)}$, $J^3 = 2.55$ Hz, $J^3 = 10.4$ Hz), 5.43 (1H, m, $\text{CH}_{(4)}$), 5.86 (1H, m, NH-CO-CH), 6.70 (1H, s, $\text{N-CH=C}_{\text{his}}$), 7.10-7.16 (6H, m, $\text{N-CH=N}_{\text{his}}$, CH_{arom}), 7.29-7.38 (10H, m, CH_{arom}), 7.61 (1H, d, CH-NH , $J^3 = 6.25$ Hz), 7.69 (1H, s, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.86 MHz): δ 20.1-20.8 ($\text{CF}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CF}_2$, CH_3CO), 25.7-30.9

(CH₂ chain, NH-CO-CH₂-CH₂, 2 CH₂-CF₂, C₈F₁₇-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 36.7 (NH-CO-CH₂), 38.5-39.1 (CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH), 53.5 (CH-CH₂), 61.3 (CH₂₍₆₎), 67.0-70.8 (OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎), 75.5 (C(Φ)₃), 101.5 (C_{1β}), 106.2-118.9 (CF₂, CF₃), 119.7 (N-CH=C_{his}), 128.1-129.7 (CH_{arom.}), 136.8 (N-CH=N_{his}), 138.2 (CH₂-C_{his}), 142.1 (C_{arom.}), 169.7-173.2 (CH₃CO, NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CH-NH-CO). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -80.7 (3F, s, CF₃), -114.2 to -114.6 (6F, m, CH₂-CF₂, CF₂), -121.9 to -123.5 (22F, m, CF₂), -126.1 (2F, s, CF₂-CF₃). m/z (FAB⁺MS): [M+H⁺] 1870, [M+Na⁺] 1892.

***N*-[2-(β-D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecacarbamoyl)-3-(*N*^{im}-(trityl)imidazolyl)propacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (deacetylated compound 8b)**

The same procedure as used for the deacetylation of compound 8a was applied to deacetylated compound 8b. From compound 8a (267 mg, 0.143 mmol), 228 mg of deacetylated compound 8b (0.13 mmol, 94%) was obtained as a white powder after purification by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH). Rf: 0.63 (AcOEt-MeOH-H₂O 7:2:1). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 1.31-1.47 (12H, m, CH₂ chain), 1.62 (4H, m, NH-CO-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CF₂), 1.80 (2H, m, CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 2.05-2.25 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, NH-CO-CH₂), 2.39-2.49 (4H, m, C₈F₁₇-CH₂-CH₂), 2.84 (1H, dd, CH-CH₂), 2.92 (1H, dd, CH-CH₂), 3.21-3.89 (12H, m, CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎), 4.26 (1H, d, CH_{(1)α}, J³ = 6.85 Hz), 4.54 (1H, m, CH-CH₂), 6.76 (1H, s, N-CH=C_{his}), 7.12-7.16 (6H, m, N-CH=N_{his}, CH_{arom.}), 7.36-7.41 (10H, m, CH_{arom.}), 8.54 (3H, m, NH). ¹³C NMR (CD₃OD, 62.86 MHz): δ 19.9 (CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-CF₂), 25.6-30.4 (CH₂ chain, NH-CO-CH₂-CH₂, 2 CH₂-CF₂, C₈F₁₇-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 35.7 (NH-CO-CH₂), 37.9-39.2 (CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH), 53.9 (CH-CH₂), 61.1 (CH₂₍₆₎), 68.3-75.5 (OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, C(Φ)₃), 103.7 (C_{1β}), 106.9-119.3 (CF₂, CF₃), 119.7 (N-CH=C_{his}), 127.9-129.5 (CH_{arom.}), 136.2 (N-CH=N_{his}), 138.1 (CH₂-C_{his}), 142.2 (C_{arom.}), 171-175 (NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CH-NH-CO). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -82.2 (3F, s, CF₃), -115.1 (6F, s, 3 CF₂), -122.5 to -124.3 (22F, m, 11 CF₂), -126.9 (2F, s, CF₂).

***N*-[2-(β -D-galactopyranosyloxy)ethyl]-22-*N*-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecarbamoyl)-3-(imidazolyniumtrifluoroacetate)propacarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosa namide (**B**)**

Deacetylated compound **6a** (213 mg, 0.125 mmol) was dissolved in 5 mL of ethanol. Et₃SiH (15.5 mg, 0.125 mmol) and 15 mL of DCM/TFA 8:2 were added to the mixture. After stirring for two days, ethanol and TFA were removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in diethylether and the solvent removed *in vacuo*. The operation was repeated twice. 175 mg of final compound **B** (0.11 mmol, 89%) was obtained as a white powder after purification by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH). mp (dec) > 145°C. $[\alpha]_D^{20}$: +2.61 ° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 1.23 (12H, m, CH₂ chain), 1.50 (4H, m, NH-CO-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CF₂), 1.70 (2H, m, CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 2.07-2.13 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, NH-CO-CH₂), 2.39-2.46 (4H, m, C₈F₁₇-CH₂-CH₂), 2.89-3.85 (14H, m, CH-CH₂, CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎), 4.17 (1H, d, CH_(1 α)), 4.52 (1H, m, CH-CH₂), 7.21 (1H, s, N-CH=C_{his}), 8.62 (1H, s, N-CH=N_{his}). ¹³C NMR (CD₃OD, 62.86 MHz): δ 19.9 (CF₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-CF₂), 25.6-39.1 (CH₂ chain, NH-CO-CH₂-CH₂, 2 CH₂-CF₂, C₈F₁₇-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 35.7 (NH-CO-CH₂), 38.0-39.2 (CF₂-(CH₂)₂-CH₂-NH, OCH₂-CH₂-NH), 52.8 (CH-CH₂), 61.1 (CH₂₍₆₎), 68.2-75.4 (OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎), 103.7 (C_{1 β}), 106.1-119.2 (CF₂), 117.9 (N-CH=C_{his}), 130.2 (N-CH=N_{his}), 133.8 (CH₂-C_{his}), 171.0-175.4 (NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CH-NH-CO). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -76.8 (3F, s, CF₃-CO₂⁻), -82.3 (3F, s, CF₃), -115.4 to -115.8 (6F, s, CF₂), -122.8 to -124.6 (22F, m, CF₂), -127.2 (2F, s, CF₂). m/z (FAB⁺MS): [M⁺] 1460 (without CF₃COO⁻). Elemental analysis calculated for C₄₉H₅₅F₃₆N₅O₁₁: C: 37.39, H: 3.50, N: 4.45 found C: 37.79, H: 3.74, N: 4.38.

***N*-(dodecanoyl)-[*N* ^{α} -((9-*H*-fluorenyl)methyl)-*N*^{*im*}-(trityl)] histidinamide (**9**)**

Fmoc-Hist(Trt)OH (3 g, 4.84 mmol), DCC (1.2 g, 5.81 mmol) and HOBt (0.785 g, 5.81 mmol) were dissolved in 30 mL of DCM freshly distilled and degassed under argon. After stirring for 15 min, dodecylamine (0.986 g, 5.33 mmol) was added and the mixture stirred for 2 days. The mixture was then filtered and the solvent removed from the filtrate *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 4:6) to yield 3.14 g (3.99 mmol, 82 %) of compound **9** as a white solid. Rf: 0.35 (AcOEt:cHex 4:6). mp: 59-61°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.90 (3H, t, CH₃, J³ = 6.,86 Hz), 1.21-

1.30 (20H, m, CH₂ chain), 2.93 (1H, m, CH-CH₂ his), 3.18-3.33 (3H, m, CH-CH₂ his, CO-NH-CH₂), 4.11-4.33 (3H, m, CH-CH₂ Fmoc), 4.65 (1H, m, CH-CH₂ hist), 5.79 (2H, m, 2 NH), 6.72 (1H, s, N-CH=C his), 7.04-7.78 (24H, m, CH Trt., CH Fmoc., N-CH=N his). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.2 (CH₃), 22.7-31.9 (CH₂ chain, CH-CH₂ his), 39.8 (CO-NH-CH₂), 47.1 (CH-CH₂ Fmoc), 55.0 (CH-CH₂ his), 67.2 (CH-CH₂ Fmoc), 76.3 (C(Φ)₃), 119.1-129.6 (N-CH=C his, CH arom. (Trt), CH arom. (Fmoc)), 135.0-137.5 (N-CH=N his, CH₂-C his), 141.3-143.9 (C arom. (Trt), C arom. (Fmoc)), 156.2 (O-CO-NH), 170.9 (CO-NH-CH₂).

***N*-(dodecanoyl)-[*N*^α-(benzyloxycarbonyl)-*N*^ε-(*tert*-butyloxy carbonyl)]lysineamide (10)**
Z-Lys(Boc)OH (1 g, 2.63 mmol), DCC (0.651 g 3.16 mmol) and HOBT (0.427 g, 3.16 mmol) were dissolved in 20 mL of freshly distilled DCM. After stirring for 15 min under argon, dodecylamine (0.532 g, 2.89 mmol) was added and the mixture was stirred for 2 days at room temperature. The mixture was filtered and the solvent removed from the filtrate *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 4:6) to yield 1.3 g (2.3 mmol, 90%) of compound **10** as a white solid. Rf: 0.49 (AcOEt:cHex 4:6). mp: 83-85°C. [α]_D²⁰: +2.77° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.90 (3H, t, CH₃, J³ = 6.77 Hz), 1.14-1.37 (20H, m, CH₂ chain, CH-CH₂-CH₂), 1.44 (9H, m, C(CH₃)₃), 1.59-1.91 (6H, m, 2 CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH), 3.10 (2H, m, CO-NH-CH₂), 3.24 (2H, m, CH₂-NH(Boc)), 4.15 (1H, m, CH-CH₂), 4.65 (1H, s, NH), 5.12 (2H, s, CH₂-Φ), 5.55 (1H, s, NH), 6.19 (1H, s, NH), 7.31 (5H, s, CH arom.). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.1 (CH₃), 22.4-31.1 (CH₂ chain, CH-CH₂-(CH₂)₂, C(CH₃)₃), 33.9 (CO-NH-CH₂), 39.6 (CH₂-NH(Boc)), 49.1 (CH-CH₂), 54.9 C(CH₃)₃, 67.0 (CH₂-Φ), 128.0-128.5 (CH arom.), 132.2 (C arom.), 156.2 (HN-CO-O), 171.5 (CH-CO-NH).

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-4-(*tert*-butyloxycarbamoyl)butyl]-22-*N*-(benzyloxycarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (11a)**

Compound **10** (300 mg, 0.548 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (33 mg, 60 mg/mmol) was added portionwise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 6 h at room temperature. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in 5 mL of freshly distilled DCM. Compound **3b** (327.8 mg, 0.422 mmol) and TBTU reagent (176 mg, 0.548 mmol) were added. The mixture was basified to a pH of 8 with DIEA. After stirring for 12 h under argon at room temperature, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash

chromatography on silica gel (cHex:AcOEt 5:5 to cHex:AcOEt 5:5) to yield 415.3 mg (0.35 mmol, 84 %) of compound **11a** as a white solid. Rf : 0.5 (AcOEt:cHex 5:5). mp: 90-91°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.89 (3H, t, CH₃, J³ = 6.82 Hz), 1.17-1.35 (32H, m, CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.51-1.70 (10H, m, 3 CH₂-CH₂-NH, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.82-2.24 (8H, m, CH-CH₂, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 3.09 (2H, m, CH₂-NH-CO-CH), 3.18-3.32 (4H, m, CH₂-NH(Boc), (Z)NH-CH₂), 4.41 (1H, td, CH-CH₂, J³ = 6.42 Hz, J³ = 7.37 Hz), 4.71 (1H, s, NH), 5.00 (1H, s, NH), 5.12 (2H, s, CH₂-Φ), 6.43 (1H, d, NH-CH-CH₂, J³ = 7.35 Hz), 6.60 (1H, s, NH), 7.35 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.0 (CH₃), 20.1-31.1 (CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂, C(CH₃)₃, 3 CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-CO-NH, 2 CH₂-CF₂), 36.6-40.2 (CH₂-NH-CO-CH, CH₂-NH(Boc), NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 52.3 (CH-CH₂), 66.9 (CH₂-Φ), 79.1 (C(CH₃)₃), 106.9-119.0 (CF₂), 128.1-128.6 (CH_{arom.}), 136.4 (C_{arom.}), 156.2 (NH-CO-O), 156.5 (NH-CO-O), 171.7 (CO-NH), 173.4 (CO-NH). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.1 to -114.3 (4F, d, 2 CH₂-CF₂), -121.8 (8F, m, 4 CF₂), -123.5 (4F, s, 2 CF₂).

N-[1-(dodecacarbamoyl)-2-(N^{im}-(trityl)imidazol)ethyl]-22-N-(benzyloxycarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17, 18, 18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (11b)
 Compound **9** (607 mg, 0.772 mmol) was dissolved in 10 mL of a mixture of acetonitrile/DIEA 9:1. After stirring for 1 h at room temperature, the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in 5 mL of dry DCM under argon. Compound **3b** (400 mg, 0.515 mmol) and TBTU reagent (215 mg, 0.669 mmol) were added to the solution. The mixture was basified to pH~8-9 with few drops of DIEA and stirred for 12 h under argon at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 3:7 to AcOEt:cHex 6:4) and filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 525 mg (0.39 mmol, 77 %) of compound **11b** as a white solid. Rf : 0.43 (AcOEt:cHex 5:5). mp: 87-88°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.89 (3H, t, CH₃, J³ = 6.84 Hz), 1.20-1.50 (32H, m, CH_{2 chain}), 1.53-1.62 (4H, m, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.82 (2H, m, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CF₂), 1.87-2.23 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 2.93 (2H, m, CH-CH₂), 3.17 (2H, m, CH₂-NH-CO), 3.26 (2H, m, NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 4.68 (1H, td, CH-CH₂, J³ = 6.1 Hz, J³ = 6.56 Hz), 5.08 (1H, s, NH), 5.10 (2H, s, CH₂-Φ), 6.68 (1H, s, C=CH-N_{hist}), 7.09-7.42 (23H, m, CH_{arom.}, N-CH=N_{his}, 2 NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.1 (CH₃), 20.1-31.9 (CH_{2 chain}, 2 CH₂-CF₂, 2 NH-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 36.6-42.0 (CH₂-CO-NH, 2 CH₂-

NH-CO), 53.1 (CH-CH₂), 66.7 (CH₂-Φ), 75.6 (C(Φ)₃), 106.0-118.7 (CF₂), 119.0 (N-CH=C_{his}), 128.1-129.7 (CH_{arom.}), 136.7-137.9 (N-CH=N_{his}, CH₂-C_{his}), 142.1 (C_{arom.}), 156.6 (O-CO-NH), 171.1-173.3 (CH₂-CO-NH, NH-CO-CH). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.0 to -114.3 (4F, d, 2 CH₂-CF₂), -121.7 (8F, m, 4 CF₂), -123.4 (4F, s, 2 CF₂).

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-4-(*tert*-butyloxycarbamoyl)butyl]-22-*N*-[(2,3,5,6,2',3',4',6'-octa-*O*-acetyl)lactobionocarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadeca fluorodocosanamide (12a)**

Compound **11a** (375 mg, 0,320 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (70 mg, 220 mg/mmol) was added portionwise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 48 h at room temperature. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo* to obtain the amine. At the same time, lactobionic acid (168 mg, 4,705 mmol) was dissolved in 20 mL of a mixture of toluene/2-methoxyethanol 1:1. Few drops of TFA were added and the solvents were removed *in vacuo*. The operation was repeated twice and the crude product obtained was added to the previous amino compound. The mixture was dissolved in 20 mL of methanol under argon and basified at pH=8-9 with few drops of TEA. The mixture was refluxed under argon for 12h.. The solvent was removed *in vacuo* and a mixture of acetic anhydride:pyridine 1:1 (20 mL) was added. The reaction was stirred for 12 h at room temperature. The mixture was poured into cooled 1M HCl solution and the solution extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogenocarbonate solution, then with brine. The organic layer was dried over sodium sulphate and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 5:5 to AcOEt:cHex 8:2) to yield 370 mg (0.21 mmol, 67 %) of fully protected compound **12a** as a white solid. Rf: 0.07 (AcOEt:cHex 5:5). mp: 83-84°C. [α]_D²⁰: +5.09° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.89 (3H, t, CH₃, J³ = 6.85 Hz), 1.28-1.40 (32H, m, CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.49-1.66 (10H, m, 3 CH₂-CH₂-NH, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.80-2.21 (32H, m, CH-CH₂, 8 CO-CH₃, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 3.09-3.42 (6H, m, CH₂-NH-CO-CH, CH₂-NH(Boc), NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 3.93 (1H, m, CH_(5')), 4.06-4.39 (3H, m, CH_{2(6')}, CH₍₆₎), 4.31-4.39 (2H, m, CH-CH₂, CH₍₄₎), 4.47-4.63 (2H, m, CH₍₆₎, NH), 4.70 (1H, d, CH_(1'), J³ = 7,80 Hz), 4.96-5.20 (3H, m, CH_(2'), CH_(3'), CH₍₅₎), 5.39 (1H, m, CH_(4')), 5.56-5.60 (2H, m, CH₍₂₎, CH₍₃₎), 6.20-6.33 (3H, m, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.0 (CH₃), 20.4-31.9 (CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂, C(CH₃)₃, 3 CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-CO-NH, 2 CH₂-CF₂,

CO-CH₃), 36.6-39.6 (CH₂-NH-CO-CH, CH₂-NH(Boc), NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 52.9 (CH-CH₂), 60.9 (CH_{2(6')}), 61.8 (CH₂₍₆₎), 66.9-71.6 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₅₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5')), 77.4 (CH₍₄₎), 79.1 (C(CH₃)₃), 101.6 (C_{1'β}), 106.9-123.0 (CF₂), 156.1 (NH-CO-O), 167.4-173.2 (3 CO-NH, CO-CH₃). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.1 to -114.4 (4F, d, 2 CH₂-CF₂), -121.7 (8F, m, 4 CF₂), -123.4 (4F, s, 2 CF₂). m/z (FAB⁺MS): [M+2H⁺] 1716

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-4-(*tert*-butyloxycarbamoyl)butyl]-22-(lactobionocarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (deacetylated compound 12a)**

The same procedure as used for the deacetylation of compound 8a was applied to compound 12a. From compound 12a (320 mg, 0.187 mmol), we obtained after purification by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH), 237 mg of deacetylated compound 12a (0.17 mmol, 92%). Rf: 0.72 (AcOEt-MeOH-H₂O 7:2:1). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 0.92 (3H, t, CH₃, J³ = 6.85 Hz), 1.32-1.38 (32H, m, CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.49-1.62 (10H, m, 3 CH₂-CH₂-NH, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.86 (2H, m, CH-CH₂), 2.05-2.29 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 3.04 (2H, td, CH₂-NH(Boc)), 3.19 (2H, td, CH₂-NH-CO-CH), 3.33-4.93 (13H, m, NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5'), CH_{2(6')}, NH), 4.25-4.28 (2H, m, CH-CH₂, CH₍₂₎), 4.38 (1H, m, CH₍₃₎), 4.50 (1H, d, CH_(1'), J³ = 7,23 Hz), 6.58 (1H, s, NH), 7.95-8.10 (2H, m, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 12.9 (CH₃), 20.1-31.7 (CH_{2 chain}, CH-CH₂-CH₂, C(CH₃)₃, 3 CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-CO-NH, 2 CH₂-CF₂), 35.9-39.8 (CH₂-NH-CO-CH, CH₂-NH(Boc), NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 53.3 (CH-CH₂), 61.2 (CH_{2(6')}), 62.4 (CH₂₍₆₎), 69.0-75.8 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₅₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5')), 79.2 (C(CH₃)₃), 81.9 (CH₍₄₎), 104.4 (C_{1'β}), 106.9-122.8 (CF₂), 157.1 (NH-CO-O), 172.9-174.1-174.8 (3 CO-NH). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -115.2 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -122.7 (8F, m, 4 CF₂), -124.4 (4F, s, 2 CF₂).

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-4-(ammoniumtrifluoroacetate)butyl]-22-*N*-(lactobionocarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluoro-docosanamide (C)**

Deacetylated compound 12a (200 mg, 0.145 mmol) was dissolved in 8 mL of DCM. 2 mL of TFA was added dropwise at room temperature. After stirring for 48 h, the solvents were removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in diethylether and the solvent removed *in vacuo*. The operation was repeated twice. The crude product was purified by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 184 mg of final compound C (0.13 mmol, 91%) as a white powder. mp (dec) > 109°C. [α]_D²⁰: +1.06° (C, 1,

MeOH). ^1H NMR (CD_3OD , 250 MHz): δ 0.92 (3H, t, CH_3 , $J^3 = 6.84$ Hz), 1.31-1.35 (32H, m, CH_2 chain, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.46-1.73 (10H, m, 3 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, $\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 1.83 (2H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 2.14-2.30 (6H, m, 2 CH_2-CF_2 , $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 2.94 (2H, t, $\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$, $J^3 = 7.60$ Hz), 3.19-3.93 (1H, m, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}$, $\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CF}_2$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{2(6)}$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(4')}$, $\text{CH}_{(5')}$, $\text{CH}_{2(6')}$), 4.25-4.38 (3H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$, $\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$), 4.51 (1H, d, $\text{CH}_{(1')}$, $J^3 = 7.10$ Hz). ^{13}C NMR (CD_3OD , 62.86 MHz): δ 12.7 (CH_3), 29.9-31.7 (CH_2 chain, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, 3 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$, 2 CH_2-CF_2), 35.4-39.1 ($\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}$, $\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$, $\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CF}_2$), 53.0 ($\text{CH}-\text{CH}_2$), 61.2 ($\text{CH}_{2(6')}$), 62.3 ($\text{CH}_{2(6)}$), 69.0-75.8 ($\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(4')}$, $\text{CH}_{(5')}$), 81.9 ($\text{CH}_{(4)}$), 104.4 ($\text{C}_{1'\beta}$), 106.8-122.9 (CF_2), 172.7, 174.1, 174.9 (3 $\text{CO}-\text{NH}$). ^{19}F NMR (CD_3OD , 235.19 MHz): δ -76.8 (3F, s, $^-\text{O}_2\text{C}-\text{CF}_3$), -115.3 (4F, s, 2 CH_2-CF_2), -122.7 (8F, m, 4 CF_2), -124.4 (4F, s, 2 CF_2). m/z (ESI-MS) $[\text{M}]^+ = 1279,8$ (without CF_3COO^-). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{F}_{19}\text{N}_4\text{O}_{15}$, $1\text{H}_2\text{O}$: C: 45.96, H: 6.36, N: 3.97 found C: 45.97, H: 6.44, N: 4.20.

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-2-(*N*^{im}-(trityl)imidazol)ethyl]-22-*N*-[(2,3,5,6,2',3',4',6'-octa-*O*-acetyl)lactobionocarbamoyl]-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadeca fluorodocosanamide (12b)**

The same procedure as used for compound 12a was applied to compound 12b. From compound 11b (373 mg, 0.282 mmol) and lactobionic acid (150 mg, 0.410 mmol), after acetylation, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt:cHex 7:3 to AcOEt) and filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 296 mg (0.16 mmol, 58 %) of compound 12b as a white solid. Rf: 0.41 (AcOEt). mp: 80-82°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +8,12° (C, 1, CH_2Cl_2). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 0.88 (3H, t, CH_3 , $J^3 = 6.8$ Hz), 1.25-1.43 (32H, m, CH_2 chain), 1.52-1.59 (4H, m, $\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 1.83 (2H, m, $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_2$), 1.99-2.25 (30H, m, $\text{CO}-\text{CH}_3$, 2 CH_2-CF_2 , $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 2.91-3.8 (6H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$, $\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CF}_2$), 3.93-4.33 (5H, m, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(6)}$, $\text{CH}_{(5')}$, $\text{CH}_{2(6')}$), 4.53 (1H, dd, $\text{CH}_{(6)}$, $J^2 = 2.25$ Hz, $J^3 = 12.15$ Hz), 4.65 (1H, d, $\text{CH}_{(1')}$, $J^3 = 7.85$ Hz), 4.99-5.19 (4H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(5)}$), 5.40 (1H, m, $\text{CH}_{(4')}$), 5.53-5.58 (2H, m, $\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$), 6.43 (2H, m, NH), 6.78 (1H, s, $\text{C}=\text{CH}-\text{N}_{\text{his}}$), 7.24-7.44 (17H, m, CH_{arom} , $\text{N}-\text{CH}=\text{N}_{\text{his}}$, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.86 MHz): δ 14.1 (CH_3), 20.1-20.8 ($\text{CO}-\text{CH}_3$), 22.7-31.9 (CH_2 chain, 2 CH_2-CF_2 , 2 $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 36.4-39.9 ($\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$, 2 $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$), 53.3 ($\text{CH}-\text{CH}_2$), 60.9 ($\text{CH}_{2(6')}$), 61.8 ($\text{CH}_{2(6)}$), 66.8-71.6 ($\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(4')}$, $\text{CH}_{(5')}$); 76.5 ($\text{C}(\Phi)_3$),

78.8 (CH₍₄₎), 101.7 (C_{1'β}), 107.1-118.8 (CF₂), 120.7 (N-CH=C_{his}), 127.9-129.6 (CH_{arom.}), 132.7-134.5 (N-CH=N_{hist}, CH₂-C_{his}), 139.5 (C_{arom.}), 167.6-174.0 (3 NH-CO, CO-CH₃). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.0 to -114.3 (4F, d, 2 CH₂-CF₂), -121.7 (8F, m, 4 CF₂), -123.4 (4F, s, 2 CF₂). m/z (FAB⁺): [M+H]⁺ = 1866.

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-2-(*N*^{im}-(trityl)imidazolyl)ethyl]-22-*N*-(lactobionocarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluorodocosanamide (deacetylated compound 12b)**

The same procedure as used for the deacetylation of compound 8a was applied to compound 12b. From compound 12b (250 mg, 0,134 mmol), we obtained after purification by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH), 193 mg of deacetylated compound 12b (0.126 mmol, 94%). Rf: 0.69 (AcOEt:MeOH:H₂O 7:2:1). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 0.90 (3H, t, CH₃, J³ = 6.74 Hz), 1.24-1.65 (36H, m, CH₂_{chain}, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.86 (2H, m, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CF₂), 2.02-2.24 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 2.83-3.16 (4H, m, CH-CH₂, CH₂-NH-CO), 3.32-3.97 (12H, m, NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5'), CH_{2(6')}), 4.26 (1H, m, CH₍₂₎), 4.38 (1H, m, CH₍₃₎), 4.61 (1H, d, CH_(1'), J³ = 7.3 Hz), 4.61 (4H, m, CH-CH₂), 6.76 (1H, s, C=CH-N_{his}), 7.10-7.39 (16H, m, CH_{arom.}, N-CH=N_{his}, NH). ¹³C NMR (CD₃OD, 62.86 MHz): δ 13.1 (CH₃), 19.9-7-31.7 (CH₂_{chain}, 2 CH₂-CF₂, 2 NH-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 35.6-39.1 (CH₂-CO-NH, 2 CH₂-NH-CO), 53.3 (CH-CH₂), 61.3 (CH_{2(6')}), 62.4 (CH₂₍₆₎), 69.0-75.8 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₅₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5'), C(Φ)₃), 82.0 (CH₍₄₎), 104.4 (C_{1'β}), 106.5-118.8 (CF₂), 119.6 (N-CH=C_{his}), 127.3-129.5 (CH_{arom.}), 136.4-138.0 (N-CH=N_{his}, CH₂-C_{his}), 142.3 (C_{arom.}), 172.0-174.1-175.5 (3 NH-CO). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -114.8 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -122.4 (8F, m, 4 CF₂), -124.1 (4F, s, 2 CF₂).

***N*-[1-(dodecacarbamoyl)-2-(imidazolyniumtrifluoroacetate)ethyl]-22-*N*-(lactobionocarbamoyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19-hexadecafluoro-docosanamide (D).**

Deacetylated compound 12b (170 mg, 0,111 mmol) was dissolved in 5 mL of ethanol. 15 mL of a mixture of DCM:TFA 8:2 and Et₃SiH (13 mg, 0.11 mmoles) were added to the solution. After stirring for 2 days at room temperature solvents were removed *in vacuo* and the crude product dissolved in diethyl ether. The solvent was removed *in vacuo* and the operation repeated twice. The crude product was purified by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 139 mg (0.099 mmol, 89 %) of final compound D as a white solid. mp (dec) >101°C. [α]_D²⁰: +6.18° (C, 1, MeOH). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 0,90 (3H, t, CH₃, J³ = 6.84 Hz), 1.29-1.59 (36H, m, CH₂_{chain}, CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-

CH₂-CO-NH), 1.83 (2H, m, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CF₂), 1.99-2.23 (6H, m, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 2.96-3.91 (16H, m, CH-CH₂, CH₂-NH-CO, NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5'), CH_{2(6')}), 4.24-4.50 (3H, m, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH_(1')), 4.68 (4H, m, CH-CH₂), 7.33 (1H, s, C=CH-N_{his}), 8.82 (1H, s, N-CH=N_{his}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 13.0 (CH₃), 22.9-3-29.4 (CH₂ chain, 2 CH₂-CF₂, 2 NH-CH₂-CH₂, CH-CH₂), 35.4-39.1 (CH₂-CO-NH, 2 CH₂-NH-CO), 52.1 (CH-CH₂), 61.2 (CH_{2(6')}), 62.4 (CH₂₍₆₎), 69.0-75.8 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₅₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5')), 82.3 (CH₍₄₎), 104.2 (C_{1'β}), 106.5-119.2 (CF₂), 116.5 (N-CH=C_{his}), 130.0 (N-CH=N_{his}), 133.6 (CH₂-C_{his}), 170.6-174.1-174.9 (3 NH-CO). ¹⁹F NMR (CD₃OD, 235.19 MHz): δ -76.8 (3F, s, ⁻O₂C-CF₃), -115.3 (4F, s, 2 CH₂-CF₂), -122.8 (8F, m, 4 CF₂), -124.4 (4F, s, 2 CF₂). m/z (ESI-MS): [M]⁺ 1288,8 (without CF₃COO⁻). Elemental analysis calculated for C₅₄H₈₂F₁₉N₅O₁₅, 3H₂O: C: 44.54, H: 6.09, N: 4.81 found C: 44.58, H: 5.80, N: 4.77.

11-bromoundecanoate de benzyle (13)

11-bromo-undecanoic acid (3 g, 11.3 mmol) was dissolved in 10 mL of benzylic alcohol. When the solution was perfectly homogeneous, SOCl₂ (0.9 mL, 17.5 mmol) was added. After stirring for 16 h at room temperature, benzylic alcohol was removed by distillation under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (cHex-AcOEt 8:2) to yield 3.2 g (9.04 mmol, 80 %) of compound **13** as a translucent oil. Rf: 0.57 (cHex-AcOEt 5:5). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.32-1.45 (12H, m, CH₂ chain), 1.68 (2H, m, CH₂-CH₂-CO), 1.88 (2H, q^t, CH₂-CH₂-Br, J³ = 6.80 Hz), 2.39 (2H, t, CH₂-CO, J³ = 7.58 Hz), 3.44 (2H, t, CH₂-Br, J³ = 6.85 Hz), 5.16 (2H, s, CH₂-Φ), 7.40 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 24.9 (CH₂-CH₂-CO), 28.2-30.3 (CH₂ chain), 32.8 (CH₂-CH₂-Br), 34.0-34.3 (CH₂-CO, CH₂-Br), 66.1 (CH₂-Φ), 126.9-128.5 (CH_{arom.}), 136.1 (C_{arom.}), 173.6 (CO).

22-carboxy-12-thiabenzyl-doeicosanoate (14)

Mercaptopropionic acid (368 mg, 1.69 mmol) was dissolved in 10 mL of anhydrous and degassed DMF with argon. At the same time, NaH 60 % (135mg, 3.38 mmol) was rinsed with heptane, dried under reduced pressure during 10 min and added in the reaction mixture. Then, compound **13** (300 mg, 0.84 mmol) dissolved in 5 mL of DMF was added dropwise. After stirring for 4 h at room temperature, the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 1:9) to yield 340 mg (0.487 mmol, 58 %) of compound **14** as a white powder. Rf: 0.49 (AcOEt-

cHex 3:7), 0.32 (AcOEt-cHex 2:8). mp: 78-79°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 1.30-1.45 (24H, m, CH_2 chain), 1.53-1.65 (8H, m, $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$, 2 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$), 2.33-2.39 (4H, m, $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2$, CH_2-CO), 2.54 (4H, t, $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$, $J^3 = 7.17$ Hz), 5.13 (2H, s, $\text{CH}_2-\Phi$), 7.33 (5H, s, $\text{CH}_{\text{arom.}}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.86 MHz): δ 24.7-25.0 ($\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$); 29.9-29.7 (CH_2 chain), 32.2 (CH_2-CO), 34.1-34.3 ($\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$, $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2$), 66.1 ($\text{CH}_2-\Phi$), 128.2-128.5 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 136.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 173.8 (CH_2-CO), 180.1 ($\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2$).

22-[N-[2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl)- β -D-galactopyranosyl oxy)ethyl] carbamoyl]-12-thiabenzylidoeicosanoate (15)

Compound **6** (960 mg, 1.83 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (109 mg, 60 mg/mmol) was added portionwise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 12 h at room temperature. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo* to obtain the amine (**15'**) as a white powder. It was dissolved in 10 mL of DCM freshly distilled and degassed under argon. Then, compound **14** (750 mg, 1.52 mmol) and TBTU (587 mg, 1.83 mmol) were added in the reactional mixture. The pH was adjusted to 8 with DIEA. After stirring for 12 h at room temperature, 596 mg of amine was added again. After 12 h, the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 4:6) to yield 1.05 g (1.22 mmol, 80 %) of compound **15** as a translucent oil. Rf: 0.25 (AcOEt-cHex 5:5). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 1.28-1.44 (24H, m, CH_2 chain), 1.52-1.63 (8H, m, $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$, 2 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$), 2.00-2.20 (14H, m, 4 CH_3CO , $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2$), 2.36 (2H, t, CH_2-CO , $J^3 = 7.43$ Hz), 2.50 (4H, t, $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$, $J^3 = 7.22$ Hz), 3.49 (2H, m, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$), 3.66 (1H, m, OCH_2), 3.93 (2H, m, OCH_2 , $\text{CH}_{(5)}$), 4.05-4.18 (2H, m, $\text{CH}_{2(6)}$), 4.48 (1H, d, $\text{CH}_{(1)\alpha}$, $J^3 = 7.83$ Hz), 5.00-5.48 (5H, m, $\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_2-\Phi$), 5.89 (1H, s, NH), 7.34 (5H, s, $\text{CH}_{\text{arom.}}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.86 MHz): δ 20.6 (CH_3CO), 24.9-25.7 ($\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 28.9-29.7 (CH_2 chain), 32.2 (CH_2-CO , $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2$), 34.3 ($\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$), 39.1 ($\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 61.3 ($\text{CH}_{2(6)}$), 65.9-70.8 ($\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_2-\Phi$, $\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 101.4 ($\text{C}_{1\beta}$), 128.2-128.5 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 136.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 169.6-170.4 (CH_3CO), 173.2-173.7 ($\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}$).

22-[N-[2-((2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- β -D-galactopyranosyl oxy)ethyl]carbamoyl]-12-thia-[N-(2-(dodecacarbamoyl)-6-*N*-(*tert*-butyloxycarbamoyl)hexacarbamoyl)doeicosanamide (16)

Compound **10** (220 mg, 0.40 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled at 0°C and palladium on charcoal (24 mg, 60 mg/mmol) was added portionwise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 12 h at room temperature. The mixture was filtered over celite and the solvent removed *in vacuo* to obtain the amine as a white powder. It was dissolved in 5 mL of anhydrous and degassed DMF under argon. 208 mg of amine **15'** (0.27 mmol, 1 eq) and 103 mg of TBTU (0.32 mmol, 1.2 eq) were added. The pH was adjusted to 8 with DIEA. The mixture was refluxed for 16 hours. Then, the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 8:2) and filtrated over size exclusion chromatography LH20 (MeOH:CH₂Cl₂ 1:1) to yield 207 mg (0.178 mmol, 66 %) of fully protected compound **16** as a white solid. Rf: 0.38 (AcOEt). mp: 98-99°C. $[\alpha]_D^{20}$: -5.79° (C, 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.88 (3H, t, CH₃, J³ = 6.86 Hz), 1.25-1.37 (42 H, m, CH₂ chain, CH-CH₂-CH₂), 1.44 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.47-1.67 (12H, s, NH-CO-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH, 2 CH₂-CH₂-S, CH₂-CH₂-NH-CO-CH, CH₂-CH₂-NH(Boc)), 1.79 (2H, m, CH-CH₂), 1.99-2.16 (12H, m, CH₃CO), 2.19 (4H, m, NH-CO-CH₂, CH₂-CO-NH-CH), 2.49 (4H, t, CH₂-S-CH₂, J³ = 7.23 Hz), 3.08 (2H, m, CH₂-NH(Boc)), 3.20 (2H, td, CH₂-NH-CO-CH, J³ = 6.33 Hz), 3.46 (2H, m, OCH₂-CH₂-NH), 3.68 (1H, m, OCH₂), 3.91 (2H, m, OCH₂, CH₍₅₎), 4.14 (2H, m, CH₂₍₆₎), 4.37 (1H, m, CH-CH₂), 4.47 (1H, d, CH₍₁₎ α , J³ = 7.83 Hz), 4.62 (1H, m, NH), 5.02 (1H, dd, CH₍₃₎, J³ = 3.38 Hz, J³ = 10.46 Hz), 5.19 (1H, dd, CH₍₂₎, J³ = 7.82 Hz, J³ = 10.46 Hz), 5.40 (1H, m, CH₍₄₎), 5.87 (1H, s, NH), 6.23 (1H, m, NH), 6.33 (1H, m, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.5 (CH₃), 20.6-29.7 (CH₃CO, CH₂ chain, CH-CH₂, C(CH₃)₃), 32.2 (NH-CO-CH₂), 35.5 (CH₂-S-CH₂), 36.6-36.7 (CH₂-CO-NH-CH, CH₂-NH-CO-CH), 39.06-39.58 (OCH₂-CH₂-NH-CO, CH₂-NH(Boc)), 52.8 (CH-CH₂), 61.3 (CH₂₍₆₎), 67.0-70.7 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, OCH₂-CH₂-NH), 79.4 (C(CH₃)₃), 101.4 (C₍₁₎), 169.7-173.4 (CH₃CO, NH-CO-CH₂, NH-CO-CH, CO Boc). m/z (FAB⁺MS): [M+H⁺]⁺ 1172.1, [M+NH₄⁺]⁺ 1189.2, [M+Na⁺]⁺ 1194.1, [M+K⁺]⁺ 1210.1.

22-[N-[2-(β-D-galactopyranosyloxy)ethyl]carbamoyl]-12-thia-[N-(2-(dodecacarbamoyl)-6-N-(ammonium trifluoroacetate) hexacarbamoyl)]doeicosanamide (E)

Compound 16 (150 mg, 0.128 mmol) was dissolved in 10 mL of MeOH freshly distilled and degassed under argon. Catalytic amount of sodium methylate was added. After stirring for 6 h, IRC50 ion exchange resin (1 g) was added. After 10 min the mixture was filtered. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified by filtration over size exclusion chromatography LH20 (MeOH) to yield 120 mg (0.196 mmol, 93 %) of deacetylated compound. Then, it was dissolved in 9 mL DCM freshly distilled and degassed under argon. 1 mL of TFA was added dropwise in the reaction mixture. After stirring for 16 h at room temperature, the solvent was removed *in vacuo* and the product was filtrated over size exclusion chromatography LH20 (MeOH:CH₂Cl₂ 1:1) to yield 95.5 mg (0.159 mmol, 81 %) of final compound E as a white powder. mp (dec) > 88°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0.80 (3H, t, CH₃, J³ = 6.21 Hz), 1.19-1.35 (42 H, m, CH₂ chain, CH-CH₂-CH₂), 1.36-1.72 (14H, s, NH-CO-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH, 2 CH₂-CH₂-S, CH₂-CH₂-NH-CO-CH, CH₂-CH₂-NH₃⁺, CH-CH₂), 2.06-2.14 (4H, m, NH-CO-CH₂, CH₂-CO-NH-CH), 2.39 (4H, t, CH₂-S-CH₂, J³ = 7.09 Hz), 2.79 (2H, m, CH₂-NH₃⁺), 3.09 (2H, m, CH₂-NH-CO-CH), 3.19-3.85 (10H, m, OCH₂-CH₂-NH, CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, CH₂₍₆₎), 4.14 (1H, d, CH_{(1)α}, J³ = 7.07 Hz), 4.18 (1H, m, CH-CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.3 (CH₃), 22.4-29.4 (CH₂ chain, CH-CH₂), 31.7 (NH-CO-CH₂), 35.6-35.7 (CH₂-NH-CO-CH, CH₂-S-CH₂, CH₂-CO-NH-CH), 39.0-39.2 (OCH₂-CH₂-NH-CO, CH₂-NH₃⁺), 53.0 (CH-CH₂), 61.1 (CH₂₍₆₎), 68.3-75.3 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₄₎, CH₍₅₎, OCH₂-CH₂-NH), 105.2 (C_{1β}), 172.6 (OCH₂-CH₂-NH-CO), 178.7 (NH-CO-CH₂, NH-CO-CH). m/z (ESI-MS): [M+H]⁺ 904.1 (without ⁻O₂C-CF₃), [M+H⁺+Na⁺]²⁺ 927.0 (without ⁻O₂C-CF₃).

Acknowledgment

We are thankful to D. Montpetit for her valuable help in conducting examination by transmission electron microscopy. Discussions with M.R. Van Calsteren were highly appreciated. Biological work was supported by Valorisation Recherche Québec (Gouvernement du Québec, Project Number: 2201-141). PYV also acknowledged the Food Research and Development Centre (Agriculture and Agri-Food Canada) for the technical support.

References

- 1 (a) A.K. Pannier, L.D. Shea, *Mol. Ther.*, 2004, **10**, 19; (b) S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Liu, *J. Control. Release*, 2004, **100**, 165.
- 2 (a) T. Serikawa, N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Tanaka, T. Kitagawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1467**, 419; (b) A.D. Miller, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1998, **37**, 1768.
- 3 (a) O. Zelphati, L.S. Uyechi, L.G. Barron, F.C. Szoka, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1390**, 119; (b) I. Moret, J.E. Peris, V.M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasi, A. Crespo, S.F. Alino, *J. Control. Release*, 2001, **76**, 169; (c) Y.K. Ghosh, S.S. Visweswariah, S. Bhattacharya, *FEBS Lett.*, 2000, **473**, 341; (d) D.L. Reimer, S. Kong, M. Monck, J. Wyles, P. Tam, E.K. Wasan, M.B. Bally, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, **289**, 807.
- 4 D.M.L. Morgan, V.L. Larvin, J.D. Pearson, *J. Cell Sci.*, 1989, **94**, 553.
- 5 I.R.C. Hill, M.C. Garnett, F. Bignotti, S.S. Davis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1427**, 161 (see references therein).
- 6 (a) J.D. Toussignant, A.K. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, S.J. Eastman, R.K. Scheule, *Hum. Gene Ther.*, 2000, **11**, 2493; (b) S. Loisel, C. Le Gall, L. Doucet, C. Ferec, V. Floch, *Hum. Gene Ther.*, 2001, **12**, 685.
- 7 D. Pijper, E. Bulten, J. Smisterova, A. Wagenaar, D. Hoekstra, J. Engberts, Hulst, R., *Eur. J. Org. Chem.* 2003, **22**, 4406.
- 8 A.J. Kirby, P. Camilleri, J. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L.G. Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk, *Angew. Chem.; Int. Edit.* 2003, **42**, 1448.
- 9 P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A.E. Rowan, M.C. Feiters, J. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1551.
- 10 For a review, see: J.-H. Fuhrhop, T. Wang, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 2901.
- 11 C. Jacopin, M.J. Egron, D. Scherman, J. Herscovici, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 1447.
- 12 C. Jacopin, H. Hofland, D. Scherman, J. Herscovici, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 419.

- 13 E. Kissa, in *Fluorinated Surfactants. Synthesis, Properties, Applications*, ed. Dekker, New York, 1994, *Surfactants Science Series* 50.
- 14 R.I. Mahato, K. Kawabata, T. Nomura, Y. Takakura, M. Hashida, *J. Pharm. Sci.*, 1995, **84**, 1267.
- 15 M. Kadi, P. Hansson, M. Almgren, I. Furo, *Langmuir*, 2002, **18**, 9243; P. Barthélémy, V. Tomao, J. Selb, Y. Chaudier, B. Pucci, *Langmuir* 2002, **18**, 2557.
- 16 N. Requirand, H. Blancou, A. Commeyras, *Bull. Soc. Chim. Fr*, 1984, **30**, 798.
- 17 W.-Y. Huang, *J. Fluorine Chem.*, 1992, **58**, 1.
- 18 B. Helferich, *J. Zinner, Chem. Ber.*, 1962, **95**, 2604.
- 19 M. Brunelle, S. Denoyelle, A. Polidori, B. Pucci, S. Laurent, P.Y. Vuillaume, *to be published*.
- 20 D. Putnam, A.N. Zelikin, V.A. Izumrudov, R. Langer, *Biomaterials* 2003, **24**, 4425.
- 21 R.I. Mahato, A. Rolland, E. Tomlinson, *Pharm. Res.*, 1997, **14**, 853.
- 22 W. Zauner, M. Ogris, E. Wagner, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **30**, 97.
- 23 P.Y. Vuillaume, M. Brunelle, M.R. Van Calsteren, S. Lewandowski, R. Lewandowski, A. Bégin, B. Talbot, Y. ElAzahry, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 1769.
- 24 H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr, D. Escande, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 7507.
- 25 (a) T. Yoshimura, S. Hasegawa, N. Hirashima, M. Nakanishi, T. Ohwada, *Bio. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 2897; (b) R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, M. Ohnishi-Kameyama, M. Yoshida, T. Shimizu, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2003, **42**, 1009; (c) M.L. Miramon, N. Mignet, J. Herscovici, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 6949; (d) M.A. Eaton, T.S. Baker, C.F. Catterall, K. Crook, G.S. Macaulay, B. Mason, T.J. Norman, D. Parker, J.J.B. Perry, R.J. Taylor, A. Turner, A.N. Weir, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2000, **39**, 4063; (e) V. Weissig, V.P. Torchilin, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2001, **49**, 127; (f) J. Gaucheron, C. Santaella, P. Vierling, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 569; (g) K. Fabio, J. Gaucheron, C. Di Giorgio, P. Vierling, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 358; (h) T. Ren, G. Zhang, D.Liu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, **9**, 2969.
- 26 O. Boussif, F. Lezoualch, M.A. Zanta, M.D.Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 7297.

ARTICLE III

(Comptes Rendus de Chimie 2009, 12, 2188)

Résumé de L'Article III

A Structure-Activity Investigation of Hemifluorinated Bifunctional Bolaamphiphiles Designed for Gene Delivery

La même famille de bola (amphiphile)s bicaténaires asymétriques présentée dans l'article II est représentée dans l'article III. Par rapport à l'article précédent qui ne rapportait que les résultats des Bola C et E, (les autres étant insolubles), cet article présente une étude approfondie et comparative des 6 bola(amphiphile)s. Suite à des expériences effectuées par les chimistes ayant synthétisé ces molécules, une méthode particulière pour obtenir des bola(amphiphile)s solubles dans l'eau a été mise au point. Cette méthode a consisté en: 1) une solubilisation initiale des bola(amphiphile)s dans le méthanol, 2) une évaporation du méthanol à pression réduite permettant la formation d'un film mince de bola(amphiphile)s sur le rebord du ballon utilisé, 3) un assèchement du film par un vacuum complet pour retirer toute trace de méthanol, 4) une solubilisation dans de l'eau, 5) un vortexage et une sonication durant 2 heures à 60°C. Cette méthode a permis la solubilisation complète des bola(amphiphile)s sauf dans le cas des deux bola(amphiphile)s contenant 2 segments centraux fluorés leur conférant une forte hydrophobicité élevée.

Cet article décrit l'effet de certaines caractéristiques des bola(amphiphile)s, tels que la nature de la tête cationique, la nature des segments centraux, et la localisation des segments centraux par rapport à la charge cationique, sur les propriétés physico-chimiques des complexes (taille, morphologie, potentiel ζ), efficacité de complexation, cytotoxicité, efficacité de protection vis-à-vis les DNases et efficacité de transfection. De plus, cet article présente des résultats préliminaires de: (1) l'efficacité de transfection du Bola C en présence de sérum pour évaluer son potentiel *in vivo*, (2) l'impact de la présence d'un lipide fusogénique (DOPE) lors des expériences de transfection, ainsi que, (3) la fonctionnalisation du bola(amphiphile) C. La tête hydrophile neutre originale a été remplacée par un segment PolyEthylene Glycol (PEG) ayant comme propriété de minimiser le phénomène d'agrégation, d'augmenter l'efficacité de transfection et de masquer le surplus de charges cationiques des complexes, ou par un peptide TAT dont la capacité d'augmenter l'internalisation cellulaire et le ciblage nucléaire ont clairement été démontrés.

J'ai effectué toutes les expériences physico-chimiques présentées dans l'article. De plus, j'ai mis au point un protocole permettant de qualifier le niveau de protection des complexes vis à vis les DNases. J'ai aussi fait un stage à l'Université d'Avignon pour effectuer des expériences avec un spectromètre à fluorescence. Cet appareil m'a permis de caractériser les interactions entre les bola(amphiphile)s et l'ADN et d'illustrer le stade de condensation de l'ADN dans les bolaplexes. J'ai aussi effectué des expériences de transfection avec une co-formulation bola(amphiphile)s-lipide fusogénique (DOPE), des expériences de transfection en présence de sérum ainsi que les expériences de co-formulations et de transfection avec le Bola C fonctionnalisé.

Les résultats ont permis de démontrer que la nature chimique de la tête cationique influence le processus de condensation de l'ADN. Le niveau de perfluoruration du bola(amphiphile) influence la condensation de l'ADN et la stabilité des complexes en solution. Le bola(amphiphile) monofluoré avec une tête lysine (Bola C) a une forte affinité de liaison avec l'ADN permettant la formation de nanoparticules stables en solution. Seulement les complexes formés du Bola C et du Bola F ont démontré une efficacité de transfection *in vitro*. En comparaison avec la référence des standards de transfection *in vitro* (la PEI branchée), les complexes Bola C/ADN ont une efficacité de transfection de seulement 25 fois inférieure et sont peu cytotoxiques. Les résultats de transfection en présence de sérum indiquent une forte diminution de l'efficacité de transfection des complexes Bola C/ADN et l'utilisation du Bola C fonctionnalisé n'indique aucune induction de l'efficacité de transfection. Suite à ces deux derniers résultats, nous avons décidé d'effectuer des études supplémentaires *in vitro* avant d'examiner *in vivo* les bolaplexes les plus performants.

En résumé, j'ai contribué à la conception de l'article, j'ai mis au point des protocoles expérimentaux et effectué toutes les expériences. J'ai participé activement à la rédaction de l'article.

A Structure-Activity Investigation of Hemifluorinated Bifunctional Bolaamphiphiles Designed for Gene Delivery

*M. Brunelle,^b A. Polidori,^{*a} S. Denoyelle,^a A.S. Fabiano,^a P.Y. Vuillaume,^{b,†} S. Laurent-
Lewandowski,^b B. Pucci^{*a}*

^a Laboratoire de chimie biorganique et des systèmes moléculaires vectoriels, Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, 33 rue Louis Pasteur, F-84000 Avignon, France. Fax: 33 4 90 14 44 49; Tel: 33 4 90 14 44 42.

^b Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada J2S 2M2. Tel: 1 450 773 8521 (extension 18518).

[†] Current address: Conseil national de recherches Canada, Institut des matériaux industriels, 75 Blvd. de Mortagne, Boucherville, (Québec) J4B 6Y4 Canada

* 

ABSTRACT. A new series of dissymmetric hemifluorocarbon bolaamphiphiles was designed to investigate their main characteristics as a non viral gene transfer carrier. The dissymmetric functionalization of diiodoperfluorooctane led to bolaamphiphile molecules composed of a partially fluorocarbon core end-capped with a glycoside and an ammonium salt. The physical-chemical results, cytotoxic effect, gene complexation and transfection efficiency were analysed and functional relationships were addressed. The study clearly showed that the chemical structure of bolaamphiphiles influences the complexation with DNA, gene transfer, and cytotoxicity. Two different polar head groups (histidine and lysine) have been tested for their efficiency to complex DNA. The impact of the side-chain of bolaamphiphile on the interaction with DNA was also investigated. Good transfection activity was demonstrated for partially fluorinated bolaamphiphile having lysine head-group. Weak cell cytotoxicity, positive surface charge of bolaplexes, well-defined structure, and protection from the DNAses seem to be essential characteristics for efficient transfection.

Keywords: bolaamphiphile, hemifluorinated surfactants, gene transfer, bolaplexes, cell cytotoxicity, cationic polar head.

1. INTRODUCTION. Synthetic cationic lipids are becoming alternatives to viruses as DNA carrier and transfection agents due to their low immunogenicity and higher cargo carrying capacity for gene therapy agents [1,2]. Furthermore, they can be readily prepared and handled. However, since the discovery of the (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) (DOTMA)[3] and its *in vitro* transfection ability, a large array of molecules has been developed to improve the low transfection rates usually observed *in vivo* by using synthetic carriers [4-14] This loss of activity is in part due to the extra and intra-cellular barriers that have to be by-passed to induce the final gene expression [15]. These barriers may be broken through, if the carriers surface has been first functionalized by groups that allow them to escape the reticulum endothelial system, aim at other target tissues in the liver or lungs and get through the cell membrane down to the cytoplasm. Each problem has its solution, but the accumulation of problems to be solved leads researchers to design more complex carriers, either by post functionalizing the head groups on their outer surface or by using adequate formulations [16]. One approach that would both theoretically and simultaneously allow to complex DNA and to functionalize the

surface carrier through membrane targeting, membrane crossing or invisibility agents consists in using dissymmetric bolaamphiphiles (Figure 1).

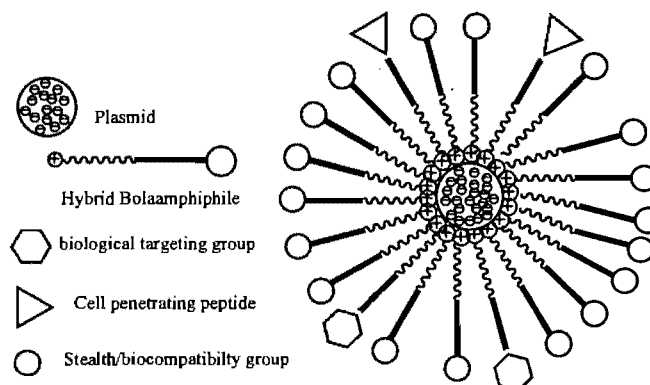


Figure 1. Schematic representation of a polyfunctionalized bolaplex

Bolaamphiphiles are surfactants made of one or two hydrophobic chains linked by their ends to two polar groups providing them water-solubility and amphiphilic properties [17]. They can self organize as monolamellar membranes likely to close up as vesicles [18]. Assymmetric aggregation of those layers around the DNA might be expected by using a cationic polar head (dedicated to the complexation of nucleic acids) and a second non ionic glycosylated polar head for instance. Cationic DNA carriers suffer of severe limitations to their use due to their rapid clearance from the blood together with their strong cytotoxicity – particularly of a hepatic nature [19-25]. In that condition, one may assume that if the bolaplexes are endowed with a non ionic outer surface, then their interactions with the RES, as well as their gene delivery efficiency and their cytotoxicity, would be reduced. Moreover, the application of an adapted formulation composed of bolaamphiphiles first functionalized with targeting or membrane crossing agents would improve the *in vivo* efficiency of these DNA carriers. A few papers describe the potentialities of this family of compounds in DNA vectorization technologies, but none of them studied the correlations between their structures, phase behaviours, and DNA complexation and transfection activities [26-33]. We have developed a new family of dissymmetric hemifluorinated bolaamphiphiles (Figure 2) [34].

These compounds showed remarkable modularity which favours variations in a number of their structural subunits: i) a cationic polar head derived from amino acids such as lysine or

histidine to complex DNA by electrostatic interactions ii) a glycosylated non ionic polar head made of galactosyl or lactobionamide units to ensure surface neutrality of the complex and the possible targeting of membrane cells bearing specific lectins (in particular hepatocytes membranes) [30] iii) a hemifluorinated hydrophobic part linked to two polar caps through amide bounds.

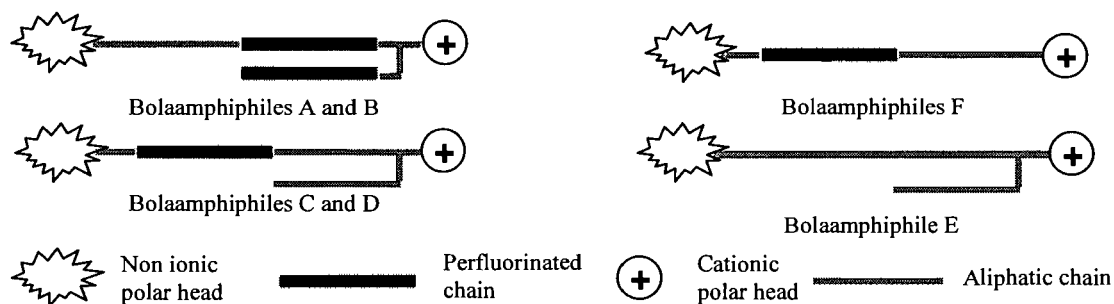


Figure 2. Schematic representation of dissymmetric bolaamphiphiles.

Hydrophobic character can be reinforced by addition of a lateral chain grafted onto amino-acid. The hydro or perfluorinated nature of the side-link chain will be determined by the place of the perfluorinated segment on the main chain. Because of the lipophobic character exhibited by fluorinated chains and in order to favour bolaplexes organization, the side chain must be located opposite a hydrophobic segment of similar nature [35-38].

Inserting a perfluorinated segment is justified by several reasons. Because of their extremely high hydrophobic character, perfluorinated surfactants tend to form in aqueous solutions stable and compact self-organized membrane systems [35]. Thus, the fluorinated core may favour the stacking of the bolaplexes by increasing the cationic charge density around nucleic acids through hydrophobic interactions. Hui *et al* have already shown that hemifluorinated surfactants could self-organize so as to form an asymmetric monolamellar membrane by bringing together all the fluorinated segments [38]. Thus, with such hemifluorinated bolaamphiphiles, the demixing of hydro and perfluorinated units should induce the formation of monolamellar membranes showing asymmetric polycationic and non ionic surfaces. Such an asymmetry is then likely to favour a single level of DNA complexation, thus bringing about the formation of a neutral small-sized bolaplex. The aim

of this paper is to demonstrate the impact of each of the five bolaamphiphiles structural subunits on their associative behaviour in aqueous milieu, their complexation efficiency of a DNA plasmid, the organization and physicochemistry of the bolaplexes formed, their cytotoxicity and their relative capacity to transfect DNA.

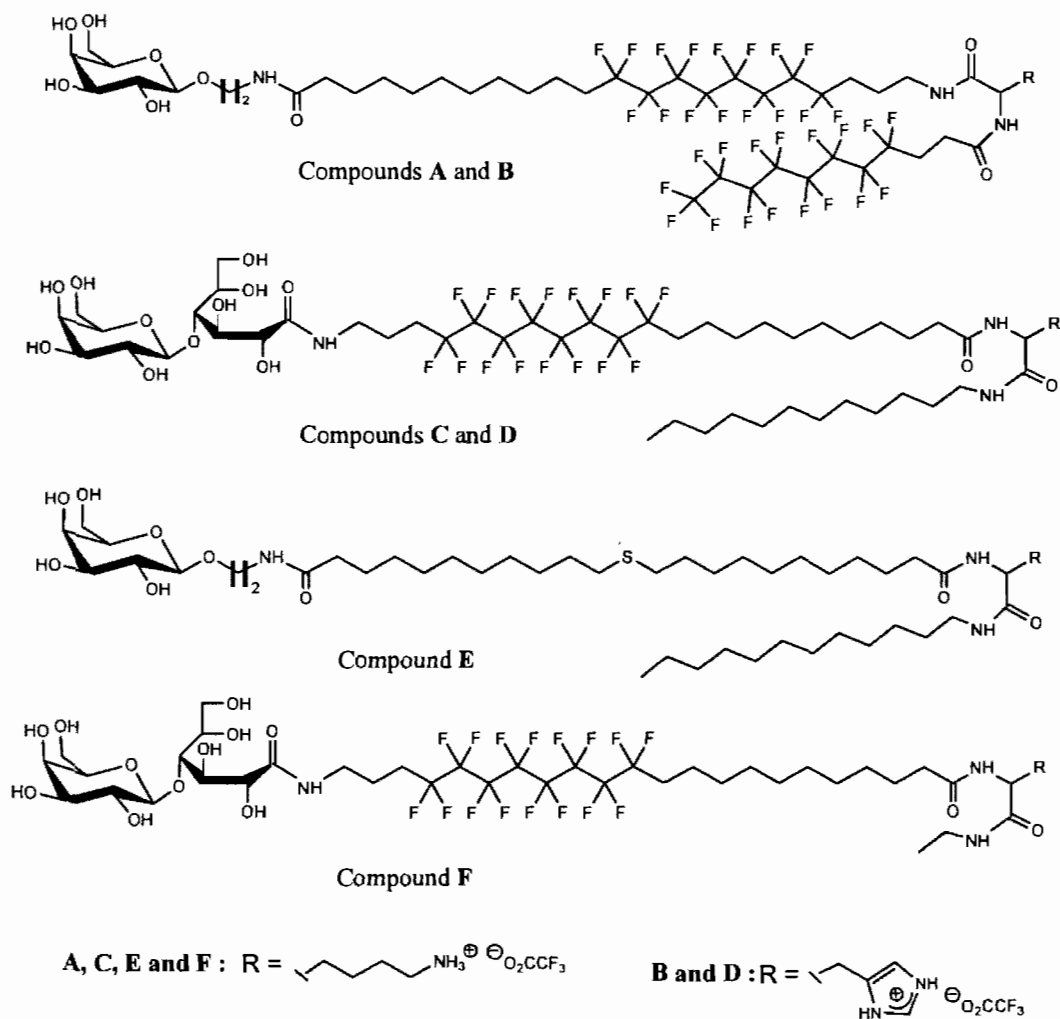


Figure 3. Chemical structure of hybrid dissymmetric bolaamphiphiles A-F

2. Experimental procedures

2.1. General procedure and materials

The synthesis of hemifluorinated and hydrocarbonated bolaamphiphiles **A-E** were described earlier [34]. All solvents were purchased from Acros Organics: CH₂Cl₂ was distilled from P₂O₅ and THF from sodium. Other solvents were used without further purification. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Acros Organics and were used without purification. Reactions were monitored by thin layer chromatography, using Merck precoated 60F₂₅₄ silica gel plates. Purifications were achieved by column chromatography over silica gel (Merck 60). Melting points were measured on an electrothermal apparatus and are uncorrected. ¹H NMR, ¹³C NMR and ¹⁹F spectra were recorded on a Bruker AC 250 spectrometer and processed using XWIN NMR (Bruker). Chemical shifts are given in ppm relative to tetramethylsilane using the deuterium signal of the solvent as a heteronuclear reference for ¹H, ¹³C and ¹⁹F. Mass spectra were recorded on a APT III plus Sciex apparatus. The branched polyethylenimine 25 kDa (PEI), fluorescent dye ethidium bromide (EtBr) and water (DNase/RNase Free H₂O, molecular biology reagent) used for complexation experiments were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Plasmid pBudCE4.1/LacZ/CAT, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and OPTI-MEM I and reduced serum medium were purchased from GIBCO Invitrogen (Burlington, ON). Foetal bovine serum (FBS) was from Medicorp (Montreal, PQ). The COS7 cell line (Simian virus 40-transformed kidney cells of an African green monkey) was from American Type Culture Collection (ATCC) (Valencia, CA). Cultureware was from Fisher Scientific (Montreal, PQ). The MTT cell proliferation kit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] and the β-GAL ELISA kit were purchased from Roche Diagnostics GmbH (Laval, PQ). RQ1 RNase-Free DNase was from Promega (Madison, WI). 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) was from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL).

2.2. Synthesis

Hemifluorinated bolaamphiphile **F** was synthesized according to scheme 1 with compound **2** described earlier [34] as starting material, following a convergent synthetic pathway.

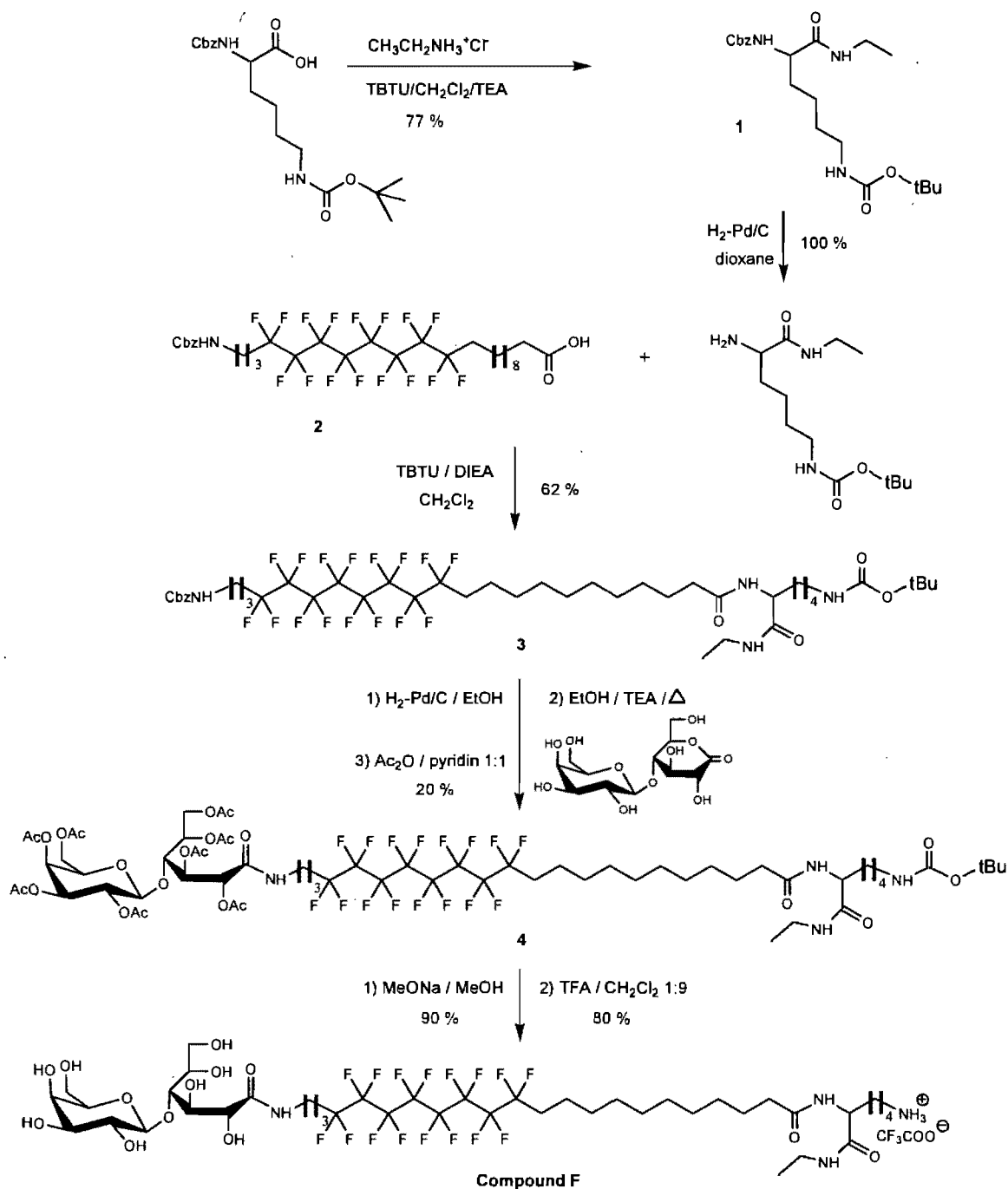
In a first sequence, *Z*-(*N*^ε-Boc)lysine was treated with ethylamine hydrochloride in the presence of *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) as coupling reagent to give compound **1** in good yield (77 %). After removal of the α-amino

protective group (hydrogenolysis in the presence of Palladium on charcoal), the resulting amine was coupled with compound **2** [34] in the presence of TBTU to provide derivative **3** in 62 % yield. Hydrogenolysis of the benzyloxycarbonyl group allowed condensation with lactobionolactone in boiling methanol with triethylamine. To carefully purify this compound through silica gel column chromatography, the sugar residue was acetylated with an acetic anhydride-pyridine mixture to give protected bolaamphiphile **4**. In a final sequence, removal of the acetyl groups with sodium methoxide and the Boc amino acid protecting group with TFA resulted in final bolaamphiphile **F**.

2.2.1. Synthesis of N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-N-Ethyl lysinamide 1. In a sealed flask, Z-Lys(Boc)OH (1 g, 2.63 mmol), ethylamine hydrochloride (0.322 g, 3.95 mmol) and TBTU reagent (1.27 g, 3.95 mmol) were dissolved in 15 mL of freshly distilled CH₂Cl₂ under argon. The pH of the solution was raised with TEA (pH 8-9). After stirring for 16h at room temperature, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 4:6) to yield 0.830 g (2.04 mmol, 77 %) of racemic compound **1** as a white solid. *R*_f: 0.5 (AcOEt-cHex 5:5 (v/v)), mp: 117.9-119.5°C. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.10 (3H, t, CH₃, J³ = 7.17 Hz), 1.29-1.47 (11H, m, CH-CH₂-CH₂, C(CH₃)₃), 1.61 (2H, m, CH₂-CH₂-NH(Boc)), 1.80 (2H, m, CH-CH₂), 3.20 (2H, m, NH-CH₂-CH₃), 3.24 (2H, m, CH₂-NH(Boc)), 4.6 (1H, m, CH-CH₂), 4.80 (1H, s, NH), 5.02 (2H, s, CH₂-Φ), 5.86 (1H, s, NH), 6.59 (1H, s, NH), 7.35 (5H, s, CH_{arom.}). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.7 (CH₃), 22.5 (CH-CH₂-CH₂), 28.4 (C(CH₃)₃), 29.6 (CH₂-CH₂-NH(Boc)), 32.2 (CH-CH₂), 34.4 (NH-CH₂-CH₃), 39.9 (CH₂-NH(Boc)), 54.9 (CH-CH₂), 66.9 (CH₂-Φ), 79.1 (C(CH₃)₃), 128.0-128.5 (CH_{arom.}), 136.2 (C_{arom.}), 156.3-156.4 (2 HN-CO-O), 171.1 (CH-CO-NH).

2.2.2. Synthesis of N^α-[20-(N-benzyloxycarbonyl)amino- 12,12,13,13,14,14,15,15,16,16, 17,17 dodecafluoro- eicosanoyl]amido-N^ε-t-butylloxycarbonyl-N-ethyl lysinamide 3. Compound **1** (245 mg, 0.602 mmol) was dissolved in 10 mL of dioxane. The solution was stirred and cooled to 0°C and palladium on charcoal (36 mg, 60 mg.mmol⁻¹) was added portion wise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bars) for 6 h at room temperature and was then filtered over Celite. The solvent was next removed *in vacuo*. The crude product (164 mg, 0.602 mmol) was dissolved in 5 mL of freshly distilled CH₂Cl₂ under argon. Compound **2** [34] (360 mg, 0.463 mmol) and TBTU (193 mg, 0.602 mmol)

were the added. The pH of the mixture was adjusted to pH 8 with DIEA. After stirring for 16 h under argon at room temperature, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 7:3) to yield compound **3** (296 mg, 0.287 mmol, 62 %). R_f : 0.58 (AcOEt-cHex 5:5). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 1.14 (3H, t, CH_3 , $J^3 = 7.24$ Hz), 1.25-1.38 (14H, m, CH_2 linear chain, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.45 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48-1.61 (8H, m, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{Boc})$, 2 $\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 1.84 (2H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 1.99-2.24 (6H, m, 2 CH_2-CF_2 , $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}$), 3.11 (2H, m, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$), 3.30 (4H, m, $\text{CH}_2-\text{NH}(\text{Boc})$, (Z) $\text{NH}-\text{CH}_2$), 4.12 (1H, td, $\text{CH}-\text{CH}_2$, $J^3 = 6.64$ Hz, $J^3 = 7.50$ Hz), 4.75 (1H, s, NH), 5.03 (1H, s, NH), 5.12 (2H, s, $\text{CH}_2-\Phi$), 6.50 (1H, d, $\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2$, $J^3 = 7.59$ Hz), 6.67 (1H, s, NH), 7.37 (5H, s, $\text{CH}_{\text{arom.}}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.86 MHz): δ 14.6 (CH_3), 20.1-29.6 (CH_2 linear chain, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_2$), 30.9 (2 CH_2-CF_2), 32.1 ($\text{CH}-\text{CH}_2$), 34.4 ($\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 36.5 ($\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 40.0-40.1 ($\text{CH}_2-\text{NH}(\text{Boc})$, $\text{CH}_2-\text{NH}(\text{Z})$), 52.8 ($\text{CH}-\text{CH}_2$), 66.9 ($\text{CH}_2-\Phi$), 79.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 106.9-121.4 (CF_2), 128.1-128.6 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 136.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 156.2-156.5 (2 $\text{NH}-\text{CO}-\text{O}$), 171.6-173.4 ($\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$, $\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}$). ^{19}F NMR (CDCl_3 , 235.19 MHz): δ -114.07 to -114.32 (4F, d, 2 CH_2-CF_2), -121.79 (8F, m, 4 CF_2), -123.48 (4F, s, 2 CF_2).



Scheme 1. Synthetic pathway to bolaamphiphile **F**

2.2.3. *Synthesis of N^α -[20-(N-lactobionocarbonyl)amino-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17-dodecafluoro-eicosanoyl]amido- N^ϵ -*t*-butyloxycarbonyl-*N*-ethyl lysinamide **4**.* Compound **3** (175 mg, 0.170 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol. The solution was stirred and cooled to 0°C and palladium on charcoal (10 mg, 60 $\text{mg}\cdot\text{mmol}^{-1}$) was added

portion-wise. The mixture was stirred under hydrogen pressure (8 bar) for 48 h at room temperature. The mixture was filtered over Celite and the solvent was removed *in vacuo* to yield the amine (148 mg, 0.165 mmol, 97 %) as a white powder. At the same time, lactobionic acid (89 mg, 0.248 mmol) was dissolved in 20 mL of a 1:1 toluene-methanol mixture. A few drops of TFA were added and the solvents were removed *in vacuo*. The operation was repeated twice and the lactobionolactone obtained was added to the previous amino compound. Then, the mixture was dissolved in 20 mL of distilled ethanol under argon, the pH of the solution was raised with TEA to pH 8-9 and the mixture refluxed under argon for 16 h. After removing the solvent *in vacuo*, 20 mL of a mixture of 1:1 acetic anhydride-pyridine were added. The reaction was stirred for 12 h at room temperature. The mixture was poured into a cooled 1M HCl solution and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with a saturated NaHCO₃ solution, then with brine and dried over sodium sulfate. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt-cHex 7:3 to AcOEt-cHex 9:1) to yield the fully protected bolaamphiphile **4** (54 mg, 0.034 mmol, 20 %). *R*_f: 0.4 (AcOEt), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +5.16° (*c* 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 1.13 (3H, t, CH₃, *J*³ = 7.25 Hz), 1.25-1.37 (14H, m, CH₂ linear chain, CH-CH₂-CH₂), 1.44 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.51-1.68 (8H, m, CH₂-CH₂-NH(Boc), 2 CF₂-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CO-NH), 1.75-2.24 (32H, m, CH-CH₂, 8 CO-CH₃, 2 CH₂-CF₂, CH₂-CO-NH), 3.11 (2H, m, CH₃-CH₂-NH), 3.18-3.32 (4H, m, CH₂-NH(Boc), NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 3.93-4.18 (4H, m, CH_(5'), CH_{2(6')}, CH₍₆₎), 4.30-4.41 (2H, m, CH-CH₂, CH₍₄₎), 4.55-4.67 (1H, m, CH₍₆₎), 4.70 (1H, d, CH_(1'), *J*³ = 7.87 Hz), 4.89 (1H, m, NH), 4.92-5.22 (3H, m, CH_(2'), CH_(3'), CH₍₅₎), 5.39 (1H, m, CH_(4')), 5.54-5.58 (2H, m, CH₍₂₎, CH₍₃₎), 6.41-6.46 (2H, m, NH), 6.60 (1H, m, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.86 MHz): δ 14.6 (CH₃), 20.5-29.6 (CH₂ linear chain, CH-CH₂-CH₂-CH₂, C(CH₃)₃, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CF₂, CH₂-CF₂, CO-CH₃), 32.2 (CH-CH₂), 34.4 (NH-CH₂-CH₃), 36.5 (CH₂-CO-NH), 37.9 (NH-CH₂-(CH₂)₂-CF₂), 39.4 (CH₂-NH(Boc)), 52.8 (CH-CH₂), 60.9 (CH_{2(6')}), 61.6 (CH₂₍₆₎), 66.8-71.6 (CH₍₂₎, CH₍₃₎, CH₍₅₎, CH_(2'), CH_(3'), CH_(4'), CH_(5')), 77.4 (CH₍₄₎), 79.1 (C(CH₃)₃), 101.7 (CH_(1')), 111.2-121.4 (CF₂), 156.2 (NH-CO-O), 167.4-173.2 (3 CO-NH, CO-CH₃). ¹⁹F NMR (CDCl₃, 235.19 MHz): δ -114.06 to -114.35 (4F, d, 2 CH₂-CF₂), -121.81 (8F, m, 4 CF₂), -123.55 (4F, s, 2 CF₂).

2.2.4. *Synthesis of N^α -[20-(N-lactobionocarbonyl)amino-12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17 dodecafluoro-eicosanoyl]amido- N^ϵ -ammonium trifluoroacetate -N-ethyl lysinamide F.* Compound **4** (50 mg, 0.0315 mmol) was dissolved in 10 mL of freshly distilled methanol. A catalytic amount of sodium methoxide was added. After stirring for 12 h, IRC50 ion exchange resin (1g) was added. After 10 min the mixture was filtered. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by size exclusion chromatography using Sephadex LH20 (MeOH) to yield deacetylated compound **F** as a white powder (34.4 mg, 0.0284 mmol, 90 %). Then, this compound was dissolved in 9 mL of freshly distilled CH_2Cl_2 . 1 mL of TFA was added dropwise. After stirring for 48 h at room temperature, the solvents were removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in diethyl ether and the solvent was removed *in vacuo*. The operation was repeated twice. Lastly, the crude product was purified by size exclusion chromatography using Sephadex LH20 (MeOH) to yield compound **F** as a white powder (28.3 mg, 0.0227 mmol, 80 %). mp (dec): 64 -75.5°C. ^1H NMR (CD_3OD , 250 MHz): δ 1.13 (3H, t, CH_3 , $J^3 = 7.23$ Hz), 1.31-1.46 (14H, m, CH_2 linear chain, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.62-1.73 (8H, m, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$, 2 $\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 1.84 (2H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 2.15-2.30 (6H, m, 2 CH_2-CF_2 , $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 2.94 (2H, m, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.21-3.96 (14H, m, $\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$, $\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CF}_2$, $\text{CH}_{(4)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{2(6)}$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(4')}$, $\text{CH}_{(5')}$, $\text{CH}_{2(6')}$), 4.29-4.53 (4H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2$, $\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(1')}$), 8.05 (2H, m, NH). ^{13}C NMR (CD_3OD , 62.86 MHz): δ 13.4 (CH_3), 19.9-31.2 (CH_2 linear chain, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_2$, CH_2-CF_2 , $\text{CH}-\text{CH}_2$), 33.9 ($\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 35.4 ($\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$), 37.2 ($\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CF}_2$), 39.5 ($\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$), 53.0 ($\text{CH}-\text{CH}_2$), 61.0 ($\text{CH}_{2(6')}$), 62.4 ($\text{CH}_{2(6)}$), 69.0-75.8 ($\text{CH}_{(2)}$, $\text{CH}_{(3)}$, $\text{CH}_{(5)}$, $\text{CH}_{(2')}$, $\text{CH}_{(3')}$, $\text{CH}_{(4')}$, $\text{CH}_{(5')}$), 81.9 ($\text{CH}_{(4)}$), 104.4 ($\text{CH}_{(1')}$), 106.8-122.9 (CF_2), 172.5, 174.1, 175.0 (3 $\text{CO}-\text{NH}$). ^{19}F NMR (CD_3OD , 235.19 MHz): δ -76.75 (3F, s, $^-\text{O}_2\text{C}-\text{CF}_3$), -115.29 (4F, s, 2 CH_2-CF_2), -122.77 (8F, m, 4 CF_2), -124.47 (4F, s, 2 CF_2). (ESI-MS): $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ m/z = 1139.7 (without $\text{O}_2\text{C}-\text{CF}_3$), $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ m/z = 1161.7 (without $\text{O}_2\text{C}-\text{CF}_3$).

2.3. Preparation of bola/DNA complexes

Dispersion of bolaamphiphiles in a buffer was carried out using two different methods. In the first method (method A) the bolaamphiphile powder (10 mg) was vortex-mixed for 5 minutes in DNase free water (2 mL). For the second method (method B), the bolaamphiphile (10 mg) was dissolved in methanol in a round-bottomed flask (typically 50

mL). Organic solvent was removed under reduced pressure (rotary evaporator) giving a thin-lipid film that was dried *in vacuo*. Then DNase free water (2 mL) was added to hydrate the thin-lipid film. The mixture was mixed-vortexed for 5 minutes and then sonicated for 2 h in a sonication bath (ultrasonic Branson 3510 bath) at 60°C. Plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT (8433 bp) encoding β -galactosidase under the control of the CMV promoter was used for all the experiments reported in this paper and produced as described elsewhere [39]. Bolaplexes were prepared at different electrostatic charge ratios (N/P) at a final DNA concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Sigma DNase/RNase Free H_2O . In each case, the appropriate amount of bola solution (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added in a final volume of 500 μL of water to obtain the appropriate concentration for the desired N/P ratios. N/P ratios were calculated from the number of the electrostatic charges present in bola (terminal NH_2 groups) and DNA (phosphate groups). The solution was gradually added to the 500 μL of DNA solution (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), with a vortex time of 30 s between each addition. After complete addition, the resulting solution (containing **A**, **B**, **C**, **D**, **E** or **F**-Bolaplexes) was stirred for 30 seconds and incubated at room temperature for 15 min.

2.4. Preparation of C-bolaplexes containing DOPE

Bola **C** was mixed with DOPE in a round bottom flask at a molar ratio of 1:1 and diluted in methanol. The mixture was then dried, vacuum desiccated and resuspended in water at a final bola **C** concentration of 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ before being vortexed and sonicated for 1 h at 60°C in a sonication bath. The resulting solution (bola **C**/DOPE) was used for the preparation of bolaplexes in exactly the same way as the other bola solutions.

2.5. Agarose gel electrophoresis retardation assays

Interactions between plasmid DNA and bola dispersions were investigated by electrophoresis on agarose gels. Bolaplexes were prepared at different N/P ratios with bolaamphiphiles **A-F** as described above. The naked DNA solution, as control, or 40 μL of bolaplexes containing each 400 ng of DNA were mixed with bromophenol blue in glycerol. They were then subjected to electrophoresis on a 0.8% (w/v) agarose gel [Tris-acetate-EDTA buffer (TAE) pH 8.5, 90 V, 90 min]. DNA bands were visualized by UV illumination after coloration with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 30 min. The complete complex formation resulted in retardation of the DNA in the loading well of the gel.

2.6. Ethidium bromide exclusion assay

Fluorescence studies with EtBr fluorescent dye were carried out at 24°C with a Fluoromax-2, Horiba, Jobin Yvon Spex, fluorescence spectrometer (1 cm path length; quartz cell; slit width 5 nm; xenon lamp 150 Watts). As reported elsewhere, λ excitation and λ emission were set at 520 nm and 597 nm, respectively. In the displacement assay, DNA was first mixed and vortexed with fluorescent dye EtBr, at final concentrations of 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 400 ng.mL^{-1} respectively, as suggested elsewhere [42]. Dye-labeled DNA was allowed to equilibrate for 5 min in the dark after which complexes of dye-labeled DNA with bolaamphiphiles were formed by adding the bola solutions at the desired N/P ratios with an equal volume of dye-labeled DNA solution (final concentrations of DNA 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The bolaplexes were allowed to equilibrate in the dark for 15 min before fluorescence measurement. Controls were performed with PEI complexes using similar N/P ratios. The relative fluorescence intensity of the resulting complex was expressed by the following equation: relative fluorescence intensity (I) = $F_{\text{obs}} - F_0 / F_{\text{DNA}} - F_0$; where F_{obs} is the fluorescence intensity of the bolaplexes, F_0 is the fluorescence intensity of the dye in water alone, and F_{DNA} is the dye-labeled DNA in the absence of bola. Experiments were repeated three times.

2.7. Stability of bolaplexes to DNase I

The stability of the bolaplexes to the action of DNase I was analyzed with respect to the N/P ratio and time. Naked DNA used as positive control and bolaplexes containing both 10 μg pBudCE4.1/LacZ/CAT were incubated with DNase I (1 Unit by μg of DNA) in the presence of 1 \times DNase I reaction buffer. The reaction was carried out at 37°C and the aliquots for analysis were taken at 0, 10 and 30 min. For inhibition of the enzymatic reaction, incubation during 10 min at 60°C with 0.5 M EDTA (for a final concentration of 50 mM) was adopted. Finally, to favour the decomplexation between the DNA and the bola, a 10% SDS solution was added (for a final 2% concentration). DNA degradation was observed following an agarose gel electrophoresis of the resulting solution. Experiments were repeated three times. It has to be noted that bolaplexes containing 10 μg pBudCE4.1/LacZ/CAT were also incubated only in the presence of buffers utilized (data not shown), as control, to verify the impact of the buffers on the integrity of complexation.

2.8. Size distribution and zeta (ζ) potential measurements

Bolaamphiphiles solutions were dispersed using an ultrasonic Branson 3510 bath. Size and surface charges (ζ -potential) of bolaplexes prepared at different N/P ratios were measured by quasi-elastic light scattering (QELS) using a Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600). Experiments in triplicate were performed for each freshly prepared bolaplex, starting with the size measurement and followed by the ζ -potential measurements. The same disposable cell (Folded capillary cell DTS 1060) was used for ζ -potential and size measurements. The instrument was equipped with a monochromatic coherent helium neon laser (633 nm) as a light source. The scattered light was recorded at an angle of 173° , and the analysis of the autocorrelation function was performed automatically to yield diffusion coefficients, D_T , taking the values 1.33 and 25°C for refractive index and temperature, respectively. Volume distributions were given according to the hydrodynamic diameter using multimodal distribution. ζ -Potentials, that were calculated using the Schmoluchowsky approximation, were directly performed after size measurements.

2.9. Transmission electron microscopy (TEM)

Bolaamphiphiles **A-F** and the corresponding bolaplexes were deposited on a 150-mesh copper grid covered with Formvar. The excess of solution was gently wicked off with filter paper. Bolaamphiphiles **A-F** or **A-F**- bolaplexes deposited on the grid were then negatively stained with a droplet of 1% aqueous uranyl acetate (without pH adjustment and filtered on $0.22\ \mu\text{m}$). The excess of colorant was gently wicked off with filter paper and the grid was air-dried. The observations were performed on a Philips EM 410 to 80 kV acceleration voltage and 3000-250,000X magnification.

2.10. Materials for complexation and transfection experiments

Fetal bovine serum (FBS) and 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE) were obtained from Medicorp (Montreal, PQ), and Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) respectively. Bolaamphiphile **C** was mixed with DOPE in a glass vial at a molar ratio 1:1 and diluted in methanol. The mixture was then dried, vacuum desiccated and resuspended in water at a final concentration of $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ before being vortexed and sonicated for 1 h at 60°C . The resulting solution was used for the preparation of bolaplexes in exactly the same way as the other bolaamphiphile complexation.

2.11. *In vitro* transfection experiments

COS7 cells were used for transfection and cell viability tests. Plasmid pBudCE4.1/lacZ/CAT (8433 bp) was used for the experiment. Cells were grown before in 6-well plates for 24 h at an initial seeding density of 2.7×10^5 per well at 37°C using DMEM containing L-glutamine, 10% FBS and 1% gentamicin. Cells were transfected at 90% confluence. Just before the transfection experiment, the medium was removed and the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Transfections were performed in a serum free solution: 1 mL of OPTI-MEM I serum-free medium was added before the addition of the bolaplex solution (500 μ L, equivalent to 5 μ g of DNA/well). Serum-free transfection mixtures were incubated for 4 h after which the medium was replaced with complete medium for 20 h. Transfection studies were also performed in presence of 2.0% serum and with the help of a co-lipid (DOPE). For transfection experiments in the presence of serum, 1 mL of complete medium containing 2.0% of serum (without antibiotics) was used instead of the OPTI-MEM I serum-free medium. For transfection in presence of bolaamphiphile C/DOPE, the method employed for the traditional complexes was used. After total incubation for 24 h, cells were harvested, as described in the commercial available kit, after what β -galactosidase concentration was measured. Results were expressed as pg of β -galactosidase/ μ g of total protein previously determined by the BCA (Bicinchonic acid) assay (Pierce). Controls were performed with the naked DNA plasmid (5 μ g of DNA) as negative control or with PEI using a PEI-DNA N/P ratio of 10, i.e., corresponding to optimal conditions defined elsewhere, as positive control [43]. Transfection experiments were repeated three times.

2.12. *Cytotoxicity assay.*

The cytotoxic effect of bolaamphiphiles or bolaplexes were evaluated by measuring the viability of the cells treated. The metabolic activity of viable COS7 cells was measured using the MTT Cell Proliferation Assay kit 24 h after incubation of the cells with varying bola concentrations corresponding to the quantity of bola(amphiphile)s used at the different N/P ratios tested in the transfection experiment or with the bolaplexes at the indicated N/P ratio. Cells were firstly grown in 96-well plates 24 h before the experiment at an initial seeding density of 1.9×10^4 cells/well in 100 μ L of complete medium. The medium was removed and replaced by the bola solution prepared in the OPTI-MEM I. Cells treated were incubated for 24 h and then tested for their metabolic activity. 10 μ L of MTT reagent (10%

v/v; final concentration 0.5 mg/mL) was added to each well. After 4 h of incubation at 37°C, the purple insoluble salt was dissolved by adding 100 µL of solubilization solution. The plates were incubated in the dark at 37°C for 24 h. Absorbance was measured at 550 nm using a reference wavelength of 650 nm. The results were expressed as a relative percentage of cell viability related to the control (naked DNA-treated cells). The cell viability of cells treated with naked DNA only was used as 100% of cell viability. Cell viability (relative %) = $(OD_{(550-650) \text{ sample}} / OD_{(550-650) \text{ control}}) \times 100$. PEI cytotoxicity was also evaluated for comparison purposes by using relative equivalent concentration. Cell cytotoxicity experiments were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of A-F bolaamphiphiles aqueous dispersions

The objective was to correlate the structure of the bolaamphiphile organizations formed in water to their ability to complex DNA. Indeed, the shape of clusters formed by the cationic lipids could have an impact on their capacity to complex DNA, so finally on the rate of measured transfection [44-47]. It is well-admitted that the lamellarity and/or the fluidity of liposomes influence the transfection rates. It is therefore useful to specify the shape of aggregates formed by these bolaamphiphiles in aqueous solutions. In that way, after aqueous dispersions, the sizes of bolas A-F aggregates were characterized by QELS and morphology observations were performed by TEM (Figure 4).

Table 1. Physicochemical properties of bolaamphiphiles A-F

Bolas	Number of fluorinated segments	Dispersibility ^a	Morphology aggregates ^b	Mean particles diameter	
				Volume (nm)	distribution PDI ^c
A	2	Fair	fibers	73 (73%); 965 (26%)	0.37
B	2	Poor	vesicles and fibers	404 (100%)	0.32
C	1	Good	vesicles	90 (100%)	0.26
D	1	Fair	vesicles and fibers	323 (43%); 1306 (56%)	0.48
E	0	Good	micelles and fibers	13 (93%); 793 (6%)	0.56
F	1	Good	micelles and fibers	24 (52%); 157 (47%)	0.22

^a Visual assessment; ^b studied by TEM; ^c Polydispersity Index.

The organized systems were prepared by the film method (method B, see the experimental part). The quality of the dispersion, the size and the morphology of these aggregates in water are reported in Table 1. Compounds **A** and **B** made of two perfluorinated segments badly scattered in water: their aqueous dispersions exhibited very poor stability and precipitated after 15 minutes. In that case, TEM micrographies clearly showed the formation of vesicles that quickly clustered in the form of tubular structures (Figures 4a, b). This property of bolaamphiphiles was already evidenced through peptidic [48-49], glycosidic [50-51] or nucleobase [52-55] derivatives. Moreover, some published data reported that the fluorine content had an impact on the tubules formation in water, due to the added rigidity of fluorocarbon chains as compared to the hydrocarbon analogues [56-

59]. This effect must be granted priority to explain the associative behavior of compounds A and B.

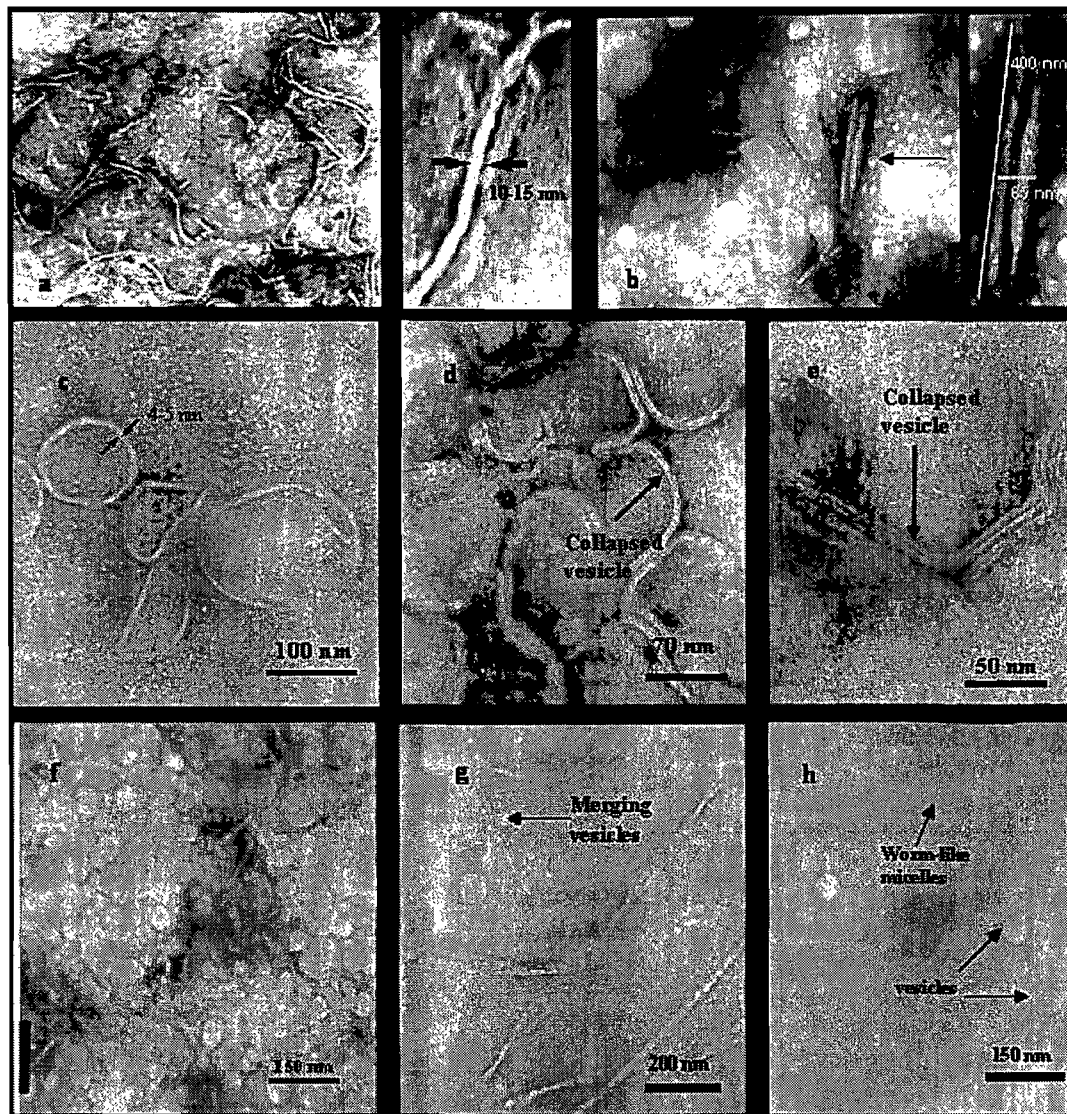


Figure 4. TEM micrographies of the self-assembled structure formed in water from bolaamphiphiles a) A, b) B, c, d, e) C, f) D, g) E, h) F.

In that way, replacement of fluorinated chains by hydrocarbon chains (compounds C and D) led to an increase of solubility and dispersions stabilization. In such case, the formation of vesicles (compound D, Figure 4f) or of monolamellar membrane systems (compound C, Figures 4c,d,e) were noted. The nature of cationic polar head groups also influenced the organization capacity of those bolaamphiphiles. Dispersion of bolaamphiphile C was

indeed easier. Bolaamphiphiles endowed with cationic lysine derived polar head gave much more stable dispersion than their analogues bearing histidine moiety, *i.e.* an imidazole moiety. To explain such a difference one can observe that at pH = 7, imidazole group (pKa = 6) is only partially protoned and this low ionization can explain its poor dispersibility in aqueous solution (Table 1, entry 4).

Among the four hemifluorinated double stranded bolamphiphiles, compound **C** seemed to show the best ability leading to stable vesicle dispersions. Their sizes were lower than 100 nm together with their poor polydispersity index pointed to the formation of very homogeneous solutions. TEM observations allowed us to specify the membrane thickness which was in the range of 4-5 nm, *i.e.* thickness of lipid bilayers. This likely suggested monolamellar organization of bolamphiphiles (Figure 4c). Very fluidic vesicles tended to collapse under the observation conditions of the TEM. These collapsed vesicles looked like classic membrane systems with lipid bilayers (Figures 4d, 4e).

When the perfluorinated segment was replaced by a hydrocarbon segment (compound **E**) or when the side chain was suppressed (compound **F**) the hydrophobic character of the compound is markedly decreased. QELS measurements showed that there were two kinds of supramolecular organization: a major population whose size varied from 13 (compound **E**) to 24 nm (compound **F**) and which should correspond to the formation of large micelles or worm-like micelles detectable by TEM (Figures 4g, 4h), next to these micelles, larger aggregates coexisted. Compound **E** formed lamellar structures (that can be seen on the ribbons on Figure 4f) from the fusion of smaller particles, micelles and vesicles. Compound **F** self organized as vesicles, too. The coexistence of micelles and vesicles was likely due to the association under folded or extended shapes of this single thread hemifluorinated compound.

3.2. Study of the complexation of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis.

To determine the impact of the bolas dispersion method on their ability to efficiently complex plasmid DNA pBudCE4.1/lacZ/CAT (8433 bp) encoding β -galactosidase, the bolaamphiphiles **A-F** were prepared by two methods (see experimental part). Briefly, following method A, the bolaamphiphile powder was vortex-mixed for 5 minutes in water,

then the appropriate amount of DNA was added and the solution was stirred. For the second method (method B), a thin film of bolaamphiphile was hydrated, the solution was mixed-vortexed and sonicated in a sonication bath, then the appropriate amount of DNA was added and the mixture was stirred. Their ability to complex and neutralize plasmid DNA was investigated by agarose gel electrophoresis. Agarose gel shift assays were performed on bolaplexes **A-F** formed at different N/P ratios (Figure 5, 6). Observation of a complete gel retardation of DNA usually indicates that charge neutralization is achieved since agarose gel electrophoresis separates macromolecules according to their charge and size.

As we can observe on Figure 5, whatever the type of bolaamphiphiles employed, method A was far less efficient than method B to complex DNA. Self-organization of bolas –carried out thanks to method B- consequently seemed a necessary preliminary step for an efficient formation of bolaplexes. Electrophoresis demonstrated that all these bolaamphiphiles were able to neutralize the DNA. However, the proportion of bolaamphiphiles required to immobilize DNA was largely influenced by their chemical structures. Bola **C** was the most efficient double strand hemifluorinated compound since DNA was completely neutralized at a charge ratio close to 1. In contrast, bolaamphiphiles **A**, **B**, and **D** needed to be used at higher N/P ratios (1.75, 2.5, and 1.75, respectively) to reach complete DNA neutralization. Bolaamphiphiles with a histidine head group (bolaamphiphiles **B**, **D**) were less efficient and needed higher N/P ratios to completely neutralize DNA comparatively to lysine head group-bolaamphiphiles **A** and **C**. This was not surprising, as it has been noted, given that a large proportion of free amines of the imidazole groups was probably not protonated (pK_a close to the physiological pH) under experimental conditions.

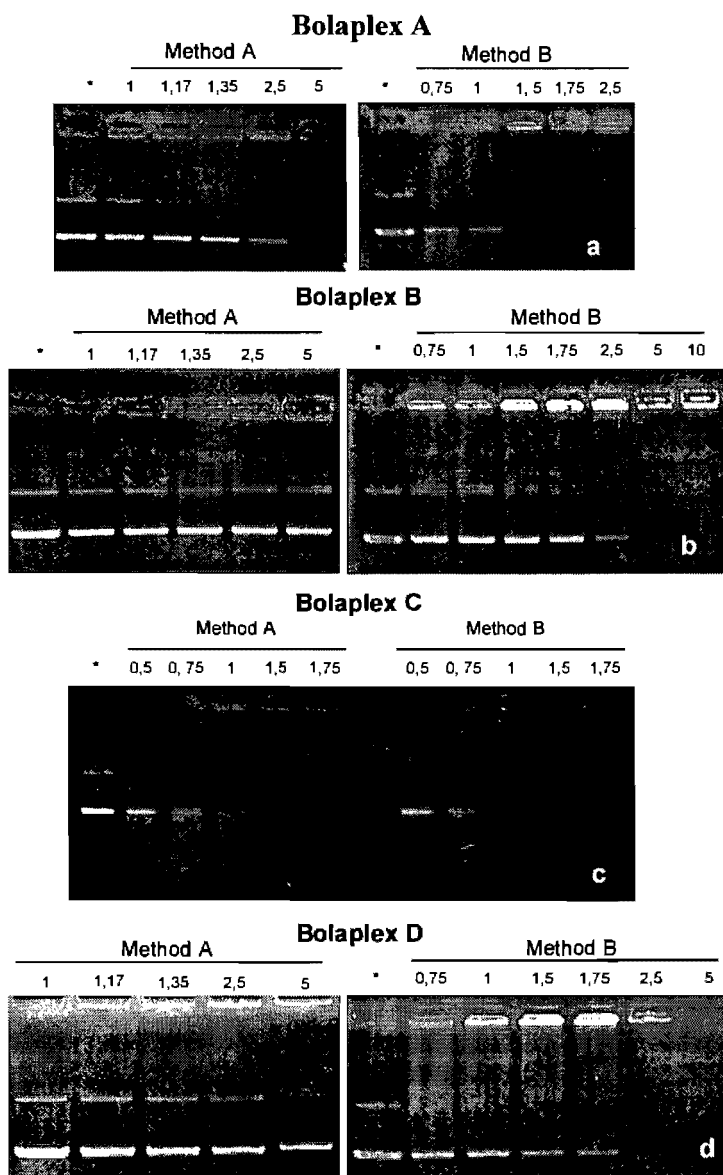


Figure 5. Representative gel electrophoresis shift assays showing the migration of A-D based bolaplexes formed with pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid. Wells were loaded with an equivalent of 400 ng of DNA. Figures show the migration of bolaplexes formed from bolaamphiphiles: a) A; b) B; c) C; d) D N/P ratios are indicated above the wells. Naked DNA was used as a negative control (*).

The lack of flexibility induced by the presence of a fluorinated chain resulted in less efficient complexation, since these lysine derivatives complexed the plasmid to a higher N/P ratio. The presence of a residual fluorescence in the wells suggest that DNA was not in a highly condensate state. Thus it has to be underlined that a parallel cannot be drawn between the self associative capacity of those bolaamphiphiles and their DNA complexation efficiency. Notably, the formation of fibrous type organized systems (compounds **A**, **B**, and **D**) was apparently detrimental for efficient plasmid complexation (Figure 5). Compound **C** that was found clustered in water in fluid bilayers self-organized more easily with DNA, which entailed N/P load charges very close to 1 when completely complexing DNA. The absence of fluorinated segment within the hydrophobic core of the bola (bola **E**) seemed to have high influence on DNA neutralization and on the condensation process, since higher N/P ratios had to be used (Figure 6). Again, the presence of notable residual fluorescence in the wells of bolaplexes **E** probably indicated a poorly condensed DNA state (Figure 6a). Single stranded compound **F** complexed the DNA at N/P ratio weaker than 1.75 (Figure 6b). For the latter, it is worth noting the emergence, at weak N/P ratios, of a spot evidencing higher electrophoretic mobility than super coiled DNA. This rare phenomenon was also reported by Behr *et al* with nanometric DNA particles [60]. Such an observation suggested that, a part of DNA was condensed in small negatively charged particles that probably spread more quickly in the gel than super coiled DNA. Moreover, for bolaplexes **C**, no residual fluorescence was visible in the well at complete neutralization (N/P=1) comparatively to other lysine head group bolaamphiphiles. The latter result suggested that other structural parameters over the nature of the charge might influence the interaction of bolaamphiphiles with DNA. The actual physical basis remains to be clearly elucidated.

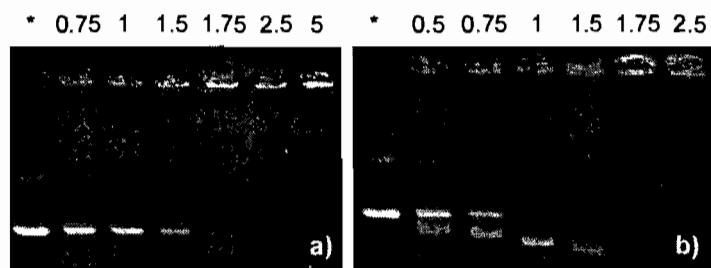


Figure 6. Representative gel electrophoresis shift assays of bolaamphiphiles a) **E** and b) **F** complexed with pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid. Wells were loaded with 400 ng of DNA (one equivalent). N/P ratios are indicated above the wells. Naked DNA was used as a control (*).

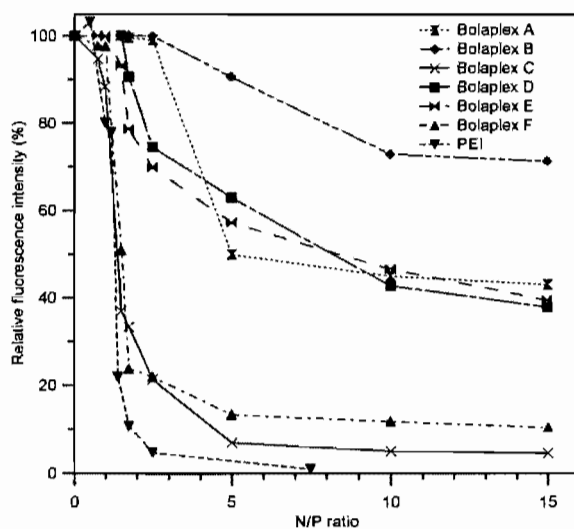


Figure 7. Ethidium bromide spectrofluorimetric displacement assays. Complexation of DNA plasmid by the bolaamphiphiles was illustrated by the displacement of the fluorescent probe ethidium bromide (EtBr). The relative fluorescence intensity of the resulting complex was expressed by the following equation: $Relative\ fluorescence\ intensity\ (I) = \frac{F_{obs} - F_0}{F_{DNA} - F_0}$; where F_{obs} is the fluorescence intensity of the bolaplexes, F_0 is the fluorescence intensity of the dye in water alone, and F_{DNA} is the dye-labeled DNA in the absence of bola.

3.3. Study of the complexation of plasmid DNA by ethidium bromide spectrofluorometric displacement assay.

Displacement assays employing a fluorescent dye is commonly used to characterize the interactions between cationic carriers and DNA and in particular to illustrate the state of condensation of DNA in the complexes. It allows for a qualitative comparison of binding affinities within a series of compounds with similar structures [41]. In the present study, an Ethidium Bromide (EtBr) displacement assay was employed to compare the interaction of bolaamphiphiles **A-F** with DNA according to the N/P ratios. The ability of bolaamphiphiles **A-F** to displace EtBr from DNA is shown in Figure 7. The lower relative fluorescence intensity (*I*) pointed out a greater interaction between bola and plasmid DNA. Data showed that as the proportion of bola (N/P ratios) increased for the preparation of bolaplexes, the relative fluorescence intensity (*I*) of the EtBr/DNA complexes decreased down to a minimum level. The decrease in the fluorescence intensity depended on the N/P ratio utilized and this was distinctive of each bola tested. Data presented in Figure 7 showed that bola **A**, **B**, **D** and **E** have similar affinities to DNA since high N/P ratios had to be used to reach 50% inhibition of the initial DNA-EtBr fluorescence (IC_{50}). Even at high N/P ratios DNA intercalation of ethidium bromide was possible. These observations suggested that the affinities of these bolaamphiphiles to DNA were relatively weak.

The IC_{50} values of bolaamphiphiles **C** (1-1.5 N/P ratios) and **F** (1.5 N/P ratio) were smaller than those calculated for bolaamphiphiles **A** (5), **B** (>30), **D** (>5) and **E** (10) (see Figure 7). In the case of **C** or **F**-bolaplexes (*i.e* bolaamphiphiles/DNA complexes), at a ratio N/P of 2.5, the residual fluorescence was almost close to baseline fluorescence (~ 20% of the 100% fluorescence associated with the naked DNA-EtBr complex) and to that of PEI bolaplex. Though these data did not offer visualized indications of DNA condensation, they may suggest important morphological changes in DNA structure during its complexation process with **C** or **F** bolaamphiphiles and an affinity to double-helical DNA higher than EtBr (which is usually high and specific). Thus we can assume that structural parameters influence the interactions of **C** or **F** bolaamphiphiles with DNA; at least a cationic head group derived from lysine (or other amine having high pKa) and a monofluorinated main chain seem to be essential for maximal interaction of bola with DNA.

3.4. Stability of A-F-bolaplexes to Dnase I treatment.

Stability measurements of bolaplexes against DNase I treatment were performed to investigate the degree of protection conferred to DNA when complexed with bolaamphiphiles. Figure 8 shows DNase I treatments (three replicated studies) of bolaplexes formed with plasmid DNA and bolaamphiphiles **C**, **E** or **F** prepared by the method B. Naked DNA was utilized as a positive degradation control. Results showed that the level of DNA degradation evolved according to the N/P ratio used and the time of treatment. Well A (naked DNA treatment) showed that, after 10 minutes incubation, complete DNA degradation was done, since no signal was detectable. For **A**, **B**, or **D**-bolaplexes, 30 minutes nuclease treatment resulted in complete degradation of DNA for any N/P ratios tested, except for the highest N/P ratios (data not shown). This observation indicated that DNA complexation with histine head group bolaamphiphiles did not prevent the degradation of plasmid DNA by nucleases. In contrast, DNA complexation with bolaamphiphiles **C**, **F**, or **E** bearing lysine group offered an effective protection of plasmid DNA.

Following a 10 minutes DNase I treatment, it is worth noting that the proportion of non digested DNA seemed to be higher for **C** and **F**-bolaplexes. As a higher level of protection was observed for lysine head group-bearing bolaamphiphiles, once again it can be suggested that the nature of the ionic head group is crucial for the DNA protection against nuclease. Moreover, as fluorinated bolaamphiphiles **C** and **F** seemed to confer higher levels of protection compared to the non fluorinated analogue **E**, it can be still assumed that the fluorinated chain was an important structural parameter implied in the protection of DNA against DNases.

The type and strength of interaction with DNA imposed by the structural characteristics of bolaamphiphiles during complexation could be largely involved in their protection. Indeed, among the bolaamphiphiles and variable N/P ratios implemented in this study, no total protection from hydrolysis by DNase I could be observed. Many hypotheses could explain this observation. For instance, DNA could be trapped at the surface of the nanospheres and consequently be more exposed to DNase attacks. An other cause would be that, DNA compaction by bolaamphiphiles is not completely achieved due to the limiting amount of cationic charge available.

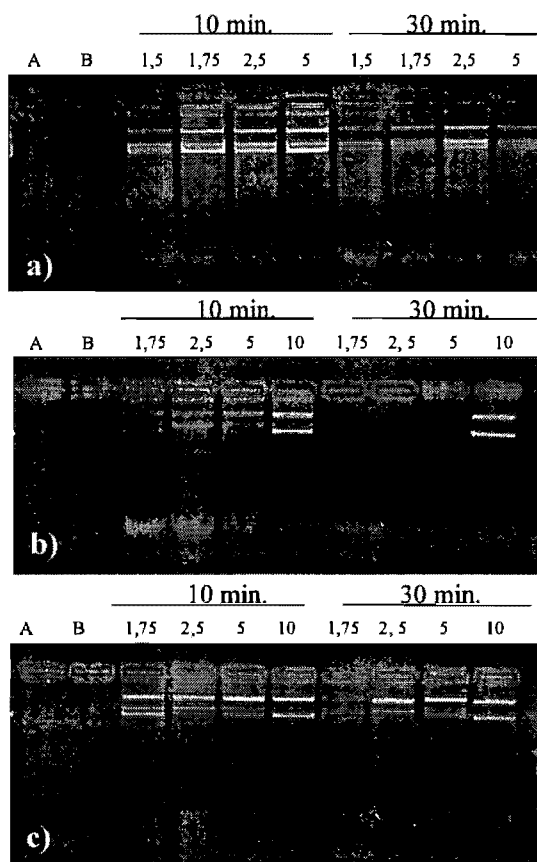


Figure 8. Stability of bolaplexes against *in vitro* DNase I treatment. DNA degradation was visualized with agarose gel following incubation of bolaplexes over 10 or 30 minutes with 1 U of DNase I/ μ g of DNA. Treatment of (a) bolaplex C; (b) bolaplex E and (c) bolaplex F were reported. Duration of the nuclease treatment and N/P ratios are indicated above the wells. Naked DNA was used as positive control (A, B lanes) of DNase activity.

3.5. Physicochemical characterizations of bolaplexes. Size, zeta potential and Transmission Electron Microscopy

A summary of the particle size and zeta potentials of bolaplexes as measured in water at room temperature is shown in Table 2. It is well-known that the size and the surface charge of the complexes play a critical role in gene transfer efficiency [61], complexes greater than 150 nm appearing less capable to be endocytosed by somatic cells [62]. The data presented in Table 2 show that the size of the **A** and **D** bolaplexes increased with the increase in their N/P ratios. Both bolaplexes had a negatively charge surface (measured by ζ -potential) at all of the charge ratios suggesting that charge neutralization did not occur. Yet, electrophoresis experiments clearly showed DNA complexation at a 2.5 N/P ratio, but EtBr displacement as well as resistance to DNAses experiments have shown that DNA was not settled under very condensed form. Consequently, it can be assumed that part of the DNA could be immobilized on the outer surface of the bolaplex. For compound **B**, no size measurement could be obtained, due to the the marked instability of the bolaplexes. The peculiarity of the three (**A**, **B**, **D**) bolaamphiphiles was their strong hydrophobic character; due to either their fluorinated content (compounds **A** and **B**) and/or the presence of imidazole moiety, as DNA complexing group partly protonated at physiological pH (compound **D**). These strong hydrophobic properties were probably the driving force for the aqueous thread-like self-organization of these bolaplexes (Figure 9). With **A**-bolaplex solutions, TEM evidenced spherical particles formation (Figure 9a) whose size confirmed data obtained from QELS (100-200 nm for N/P=1.75). **D**-bolaplexes solutions are composed of fibrous structures and vesicles (Figure 9b) detected by QELS as two aggregates populations.

As regards compound **C**, ζ -potential measurement indicated that this bolaamphiphile was able to neutralize the DNA charges. We noted an inversion of ζ -potential to positive values beyond an electric charge ratio higher than 1. It has to be underlined the increase in the particle size when electroneutrality was reached (N/P= 0.9-1). Then, when the charge of **C**-bolaplexes became positive (N/P > 1), the particle size decreased [40,63].

Table 11. The ζ -potential and mean diameters of A-F bolaplexes

Bolas	N/P ratios	Zeta potential (mv) ^a	Mean diameter (nm) ^b
A	0.75	-22.1±1.5	85 (0.34) ^d
	1	-30.7±3.8	75 (0.27)
	1.5	-34.2±2.7	67 (0.21)
	1.75	-35.4±0.7	115 (0.28)
	2.5	-11±1.5	224 (0.50)
B	1.75	-31±1	- ^c
	2.5	-4.5±1.2	- ^c
C	0.85	-37.3±1.9	65 (0.17)
	0.9	-10.4±1.0	167 (0.21)
	1	-14.2±0.1	150 (0.30)
	1.16	28.1±1.4	142 (0.61)
	1.29	21.5±2.7	85 (0.70)
	1.4	45±2.4	- ^c
D	1.75	57.4±1.3	- ^c
	1	-23.6±0.3	76 (0.35)
	2.5	-31.1±0.5	152 (0.33)
	5	-20.1±3.0	218 (0.78)
E	1	-34.9±1.4	324 + 79
	1.75	-28±0.5	500 + 120
	2.5	- ^c	- ^c
	5	48±0.7	1200 + 200
F	0.75	-43±2.8	- ^c
	1	-34±4.3	65 (0.32)
	1.5	-25±1.5	84 (0.22)
	1.75	-26±1.8	80 (0.26)
	2.5	-28±2.2	66 (0.43)
	5	36±1.3	81 (0.35)

^a Zeta potential ± SD (mv) ^b volume distribution ^c unstable preparation

^d Polydispersity index

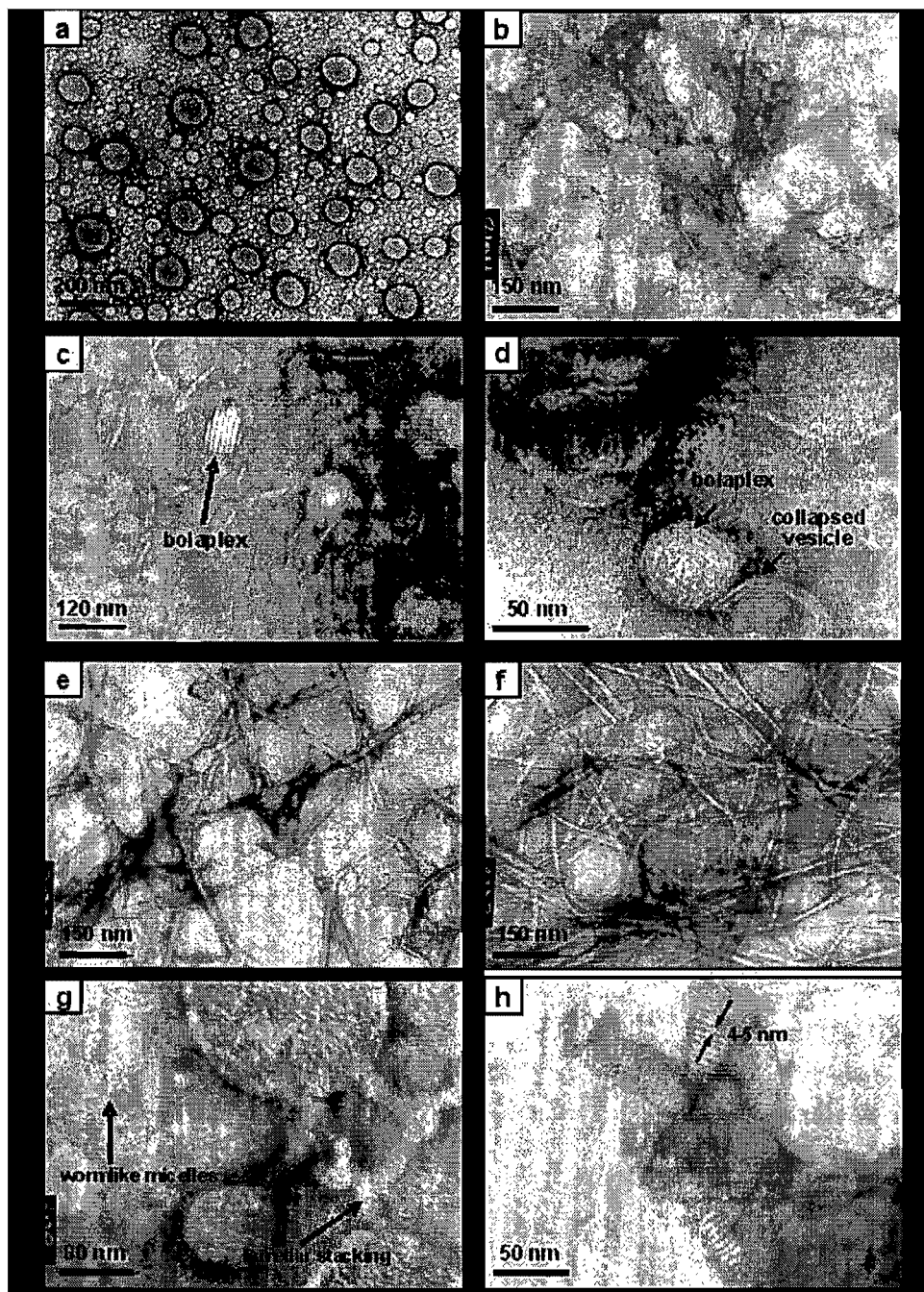


Figure 9. Representative TEM images showing the morphology of a) **A-bolaplexes** ($N/P=1.75$), b) **D-bolaplexes** ($N/P=1.75$), c) **C-bolaplexes** ($N/P=1.75$), d) bolaplex **C** ($N/P=5$), e) **E-bolaplexes** ($N/P=1.75$), f) **E-bolaplexes** ($N/P=5$), g) **F-bolaplexes** ($N/P=1$) and h) **F-bolaplexes** ($N/P=5$).

Bolaplexes with net positive charge showed sizes lower than 100 nm. TEM images clearly showed the presence of small-sized particles with internal lamellar-like order (Figure 9c-d). Similar ordered structures have already been observed for lipoplexes through electronic microscopy [64-69]. It is worth noting that bola **E** - the fully hydrocarbon analogue of compound **C** - did not form the same type of bolaplex. QELS indicated the emergence of two aggregates populations, one of which is very large and corresponds to the formation of thread-type structures visible in TEM (Figures 9e and 9f). When the N/P ratio increased, the proportion of fibers present in the solution also increased markedly (Figure 9f). At lower N/P ratio (Figure 9e), vesicles probably corresponding to the smaller population detected by QELS (80-200 nm) could also be noted. Even when the surface charge of these aggregates was reversed, aggregates size thus formed went on increasing. For N/P = 2.5, size and zeta potential measurements indicated the instability of the aggregates formed, which suggest that the charges neutralization ratio is reached. The neutralization of DNA phosphate groups was achieved with N/P ratios higher than those previously measured with compound **C**.

On the other hand, without hydrocarbon lateral chain, compound **F** formed small self-assembled lamellar bolaplexes (Figure 8b), namely smaller than 100 nm [for N/P ratios varying between 1 and 5 and even if surface charge reversal was only achieved for high charges ratios (N/P = 5)]. Nevertheless, data obtained with ethidium bromide displacement assays indicated that complete complexation of DNA was reached at the same N/P ratio than compound **C**. The affinity for DNA appeared to be identical but charge reversal was achieved for higher N/P values. TEM images of **F**-bolaplex showed the same regular organization as for **C**-bolaplexes (Figure 9g-9h). Therefore it seems that the formation of self-organized multilamellar systems was closely linked to the hemifluorinated structure of these bolaamphiphiles.

TEM observations (Figure 4) and QELS studies (Table 1) showed the micellar behavior of compound **F** alone in aqueous solution. This micellar behavior linked with the formation of small-size aggregates was also evidenced by Pitard and coworkers using lipopolyamine [64]. Micelles are dynamic organization whose life-spans are much shorter than membrane systems, therefore, bolaplexes organization becomes virtually independent from the bolaamphiphile initially organized structure if the latter is fluid and reversible.

Nevertheless, this lability may become a hindrance to plasmid complexation, as the forces leading to DNA complexation are of electrostatic and hydrophobic origins in the case of bolaplexes organization.

The surface electric charge of bolaplexes formed from compounds **C** and **F** was totally different at a N/P = 1.75 ratio. ζ -Potential of **C**-bolaplexes equaled +57.4 mV and that of **F**-bolaplexes -26 mV. The difference in electric charge behavior between the two bolaplexes might be correlated to the structure of the associations formed before complexation. Compound **C** self-organized as monolayer vesicles (Figures 4c and e). In that case, it was likely that charge distribution occurred in a statistical manner on either side of the membrane in order to decrease the electrostatics repulsive interactions between polar heads. This metastable monolayer system distributed itself around the DNA to complex it without breaking-up while maintaining its original membrane structure. Such an organization might lead to the formation of sandwich-like lamellar structures whose surface would be covered by cationic and glycosidic polar head-groups, so to a net positive surface electric charge (Figure 10).

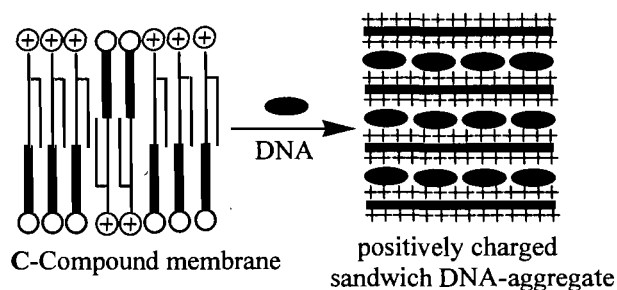


Figure 10. Lamellar complexation of DNA plasmid by C-bolaamphiphiles membrane

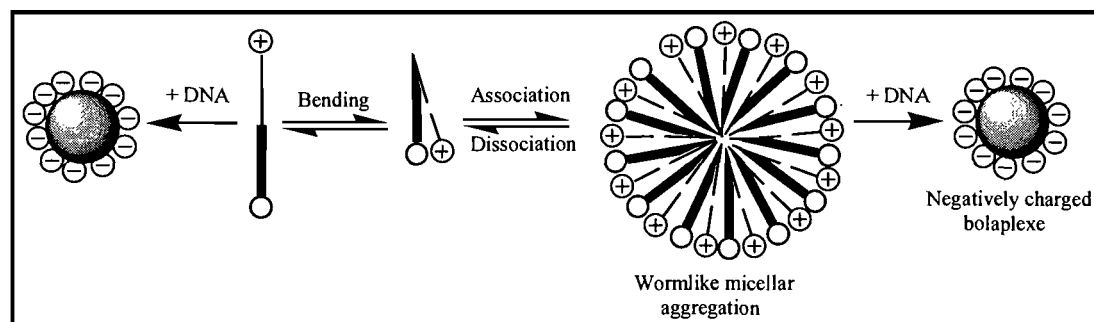


Figure 11. Complexation of DNA plasmide with F-bolaamphiphile micelles

As regards F-bolaplex, TEM and QELS experiments clearly indicated that this bolaamphiphile self-organized in water as micelle-like systems. In this context, plasmid complexation would be achieved from micelles or free bolaamphiphiles (Figure 11).

Finally, in figure 9h, it has to be underlined that the F-bolaplex (N/P = 5 ratio, positive zeta potential) presented a periodic lamellar internal structure with a thickness of 4-5 nm section that was the same as the one of a monolamellar membrane formed from bolaamphiphile C (Figure 4c). Such a result tend to show that, when electroneutrality is reached (for a high N/P ratio), F-bolaplexes present a close behavior to C-bolaplexes.

3.6. Cell viabilities studies

The effect of bolaamphiphiles and bolaplexes amount on cell viability (metabolic activity) were investigated and are presented in Figure 12a and 12b. The relative percentage of cell viability of COS7 cells was firstly reported for varying bolaamphiphile concentrations (calculated in accordance with the different N/P ratios experiments) and secondly for different N/P bolaplexes ratios (varying between 1 and 10) after a treatment of 24h. Branched poly(ethylenimine) (PEI) 25KDa was reported as a standard. PEI is known to be a potent transfectant but with acute cellular cytotoxicity.

The results indicated that bolaamphiphiles **A, B, D, F** had a moderate toxic effect (much lower than the PEI) on the cell. Cell viability decreased with the increase of bolaamphiphile concentration. As PEI was reported to be less toxic than the lipids [70], we can indirectly affirm that our bolaplexes are systems less cytotoxic than other lipid transfectant reagents. Furthermore, we can note that compound **F** exhibited a higher toxicity than compound **C**. As we mentioned above, compound **F** could fold its main chain to self-organize as micelles. This structural and behavior specificity could explain its higher toxicity. Indeed, Fyles et al showed that membrane disruption mechanism might occur via U-shaped conformation of the bolaamphiphiles [71]. Therefore, the presence of a side chain might prevent the folding and cytotoxicity of those bolaamphiphiles.

3.7. Reporter gene expression in COS-7 cells.

In order to evaluate the gene delivery potential of **A-F** bolaplexes, the *in vitro* transfection efficiency of **A-F** bolaplexes were performed on COS-7 cell lines. Data corresponding to

the different transfection experiments are presented in Figure 13. **A**, **B**, **D** and **E** bolaplexes failed to transfect COS-7 cells regardless the N/P ratio used, contrasting with **C** and **F** bolaplexes. The difference in the transfection efficiencies observed between **C**-bolaplex and **E**-bolaplex might be due at least in part to the inability of the non fluorinated bolaform to bind, protect and condense efficiently DNA. This result suggests that the partial fluorination of the hydrophobic core of these bolaamphiphiles increases not only the self association and DNA complexation abilities of these compounds but also their DNA transfection efficiency. Bolaamphiphiles **C** and **F** that alone were capable to organize the plasmid in the form of a small-size multilamellar bolaplex, were also the only ones in a position to efficiently transfect DNA. **F**-bolaplexes offered COS-7 cell transfection rates considerably lower than **C**-bolaplexes, but in both types of bolaplexes, DNA internal organization and condensation rate appeared very close to each other. As the apparent organization of both bolaplexes was virtually identical, there followed that their main discrepancy factor was their surface electric charge at the respective maximal N/P ratio – negative for **F**-bolaplexes and positive in the case of type-**C** bolaplexes. Gene transfer is known to be optimal when particles are positively charged for binding the anionic cell surface of the cells. As reported elsewhere [68, 72-73], the decrease in transfection efficacy for **F**-bolaplexes could be related to the repulsive interaction between negative surface charge of bolaplexes and the negative charge of the plasma membrane. **C**-bolaplexes generated a significant transfection level, presenting a bell-shaped profile and a maximum level of transfection at a N/P ratio of 1.5, typically higher than three orders of magnitude than naked DNA although lower than the positive transfection control tested. Whereas, it is worth noting that **C**-bolaplexes were efficient transfection reagents with relatively low cytotoxicity comparatively to the PEI.

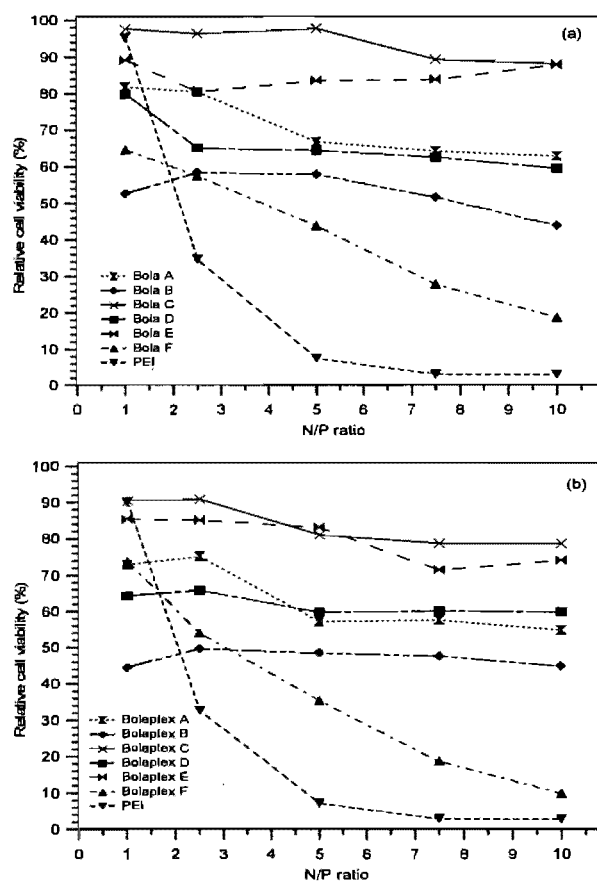


Figure 12. *In vitro* cells viability of COS7 cells treated with bolaamphiphiles A-F alone (a) and A-F type bolaplexes (b) In the two figures, the relative viability of COS7 cells after a 24-h treatment is expressed as a function of N/P ratio.

3.8. Transfection with DOPE-based complexes.

DNA affinity and complexation process reversibility appeared to be important factors allowing lipofection efficacy. Other teams showed effectively that existence of strong binding interactions between DNA and the cationic liposome or polymer induce poor gene transfer efficacies [13,45,47,74-76]. On the other hand, following the hypothesis that structural organization within lipoplexe would have a considerable impact on lipofection [45] Zuhorn and coworkers showed that the presence of DOPE in SAINT-containing lipoplexes induced a less effective packaging of the DNA [74]. According to these observations, DOPE was introduced in C-bolaplexes formation in order to increase the

transfection efficiency of bola C. Higher transfection levels were measured by the addition of DOPE in bolaplexes formation comparatively to the original C-bolaplexes (see Figure 13). Notably at small N/P ratios ($N/P=1$ and 1.5), the presence of DOPE dramatically increases (40 X) the transfection efficiency of the bolaamphiphile C. Thus, the existence of structural defects within lipoplex organization might optimize lipofection [45]. According to this hypothesis, by most likely introducing bolaplex disruption, DOPE use (as a helper lipid) would allow an increase in bolaplex lipofection capacity. Zuhorn et al. showed that DOPE incorporated to lipoplexes induced a less effective packaging of the DNA as reflected by an enhancement in accessibility of the plasmid for labelling with picogreen [74].

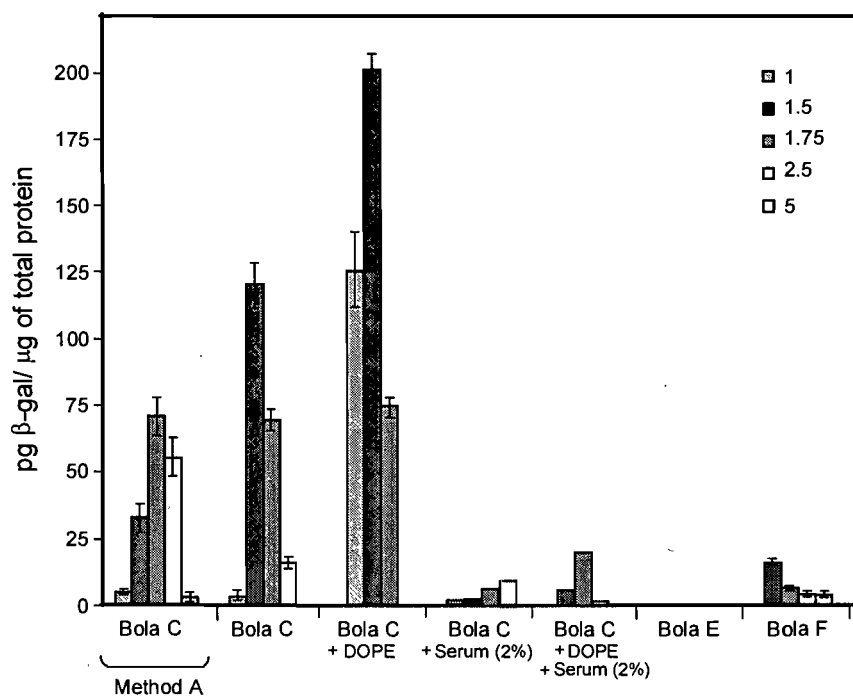


Figure 13. Transfection efficiency of pBudCE4.1/lacZ/CAT complexed with bola C, E or F (prepared by using N/P ratios in the range of 1 to 5) in the presence or not of serum and or DOPE using the COS7 cell line. Results were expressed as the pg concentration of β -galactosidase/ μ g of total protein.

3.9. Transfection in presence of serum

C, **E**, **F** and **C-DOPE** bolaplexes were also tested for their *in vitro* transfection efficiency in the presence of 2.0% serum. Data are presented in Figure 13. It is shown that transfection efficiency with **C** and **C-DOPE** bolaplexes decreased drastically in the presence of serum. The presence of serum completely inhibited the low transfection capacity of bola **E** and **F** (data not shown). Moreover, in spite of higher transfection level observed for bola **C-DOPE** (compared to **C**-bolaplex), the presence of co-lipid helper seems not to help the transfection in presence of serum. The decrease in the transfection efficiency in presence of serum suggests that the stability/integrity of bolaplexes is greatly disturbed in such situation. It illustrates a weak interaction between bola(amphiphile) and DNA that facilitated the precocity of decomplexation of bolaplexes in presence of serum. The anionic and cationic species present in the serum appear to be detrimental for the stability of the bolaplexes. In addition, the decrease in transfection efficiency can be attributed to the poor resistance to DNAses present in the serum. Finally, the positive charge of the bola **C** based complexes have an effective negative impact on the transfection level in presence of serum; the interactions with negatively charged proteins weakens DNA complexation, allowing access to DNases. However, other factors than the charge surface seem to influence the transfection efficiency in presence of serum since transfection with negatively charged **F**-bolaplexe has a reduced efficiency. Complex instability could be the main factor related transfection efficiency decrease in presence of serum.

4. Conclusions. A new series of dissymmetric hemifluorocarbon bolaamphiphiles was evaluated for DNA complexation as well as *in vitro* gene transfer carrier. The data demonstrated that the complexation efficiency between the two oppositely charged partners was affected by the method of preparation of the bolaamphiphiles dispersion. Bolaamphiphiles organized in a bilayer form allowed for a more efficient complexation and condensation of DNA. The chemical structure of the bolaamphiphiles also affected the DNA condensation. Bolaamphiphiles with lysine head-groups were much prone to neutralize and condense DNA than their analogues with histidine groups. The incorporation of two fluorinated segments in the molecular structure of the bolaamphiphiles is detrimental for an efficient DNA condensation. In contrast, a partial fluorination of the hydrophobic core of bolas increased not only the DNA complexation abilities but also DNA transfection efficiency. Relatively high transfection activity was obtained for the bolaamphiphile possessing a lysine head-group and one fluorinated segment close to the carbohydrate moiety. This result could be explained by the small size and the positive surface charge of the bolaplex. However, this positive charge have a negative impact on the transfection level in the presence of serum; the interactions with negatively charged proteins decreases DNA complexation and the transfection efficiency of such compounds as already noted with various lipoplexes. According to this hypothesis, works are currently undertaken to prepare new dissymmetric fluorinated bolaamphiphiles leading to small bolaplexes showing a very low electric charge on their outer surface.

Acknowledgements. This work was in part supported by Valorisation Recherche Québec (Gouvernement du Québec, Project Number: 2201-141) and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Français which provided a grant to Ph-D student Séverine Denoyelle. We are thankful to Diane Montpetit for her invaluable help in conducting examination by transmission electronic microscopy, Professor René Roy (UQAM, Québec) for his valuable suggestions and councils, Horiba group, Jobin Yvon Spex, fluorescence spectrometer.

References

- [1] V.V. Kumar, R.S. Singh and A. Chaudhuri, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 1297 and the references therein.
- [2] A.D. Miller, *Angew. Chem., Int. Ed.* 37 (1998) 1768 and the references therein.
- [3] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, W. Chan, M. Wenz, J. P., Northorp, G.M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 7413.
- [4] A. Bajaj, P Kondiah and S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 2432.
- [5] M.N. Antipina, M. Schulze, B. Dobner, A. Langner and G. Brezesinski, *Langmuir* 23 (2007) 3919.
- [6] J. Leblond, N. Mignet, C. Largeau, M.-V. Spanedda, J. Seguin, D. Scherman and J. Herscovici, *Bioconjugate Chem.* 18 (2007) 484.
- [7] V. Gopal, T.K. Prasad, N.M. Rao, M. Takafuji, M.M. Rahman and H. Ihara, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 1530.
- [8] K.K. Ewert, H.M. Evans, N.F. Boussein and C.R. Safinya, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 877.
- [9] M.A. Ilies, W.A. Seitz, B.H. Johnson, E.L. Ezell, A.L. Miller, E.B. Thompson and A.T. Balaban, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3872.
- [10] P.P. Karmali, B.K. Majeti, B. Sreedhar and A. Chaudhuri, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 159.
- [11] V. Gopal, T.K. Prasad, N.M. Rao, M. Takafuji, M.M. Rahman and H. Ihara, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 1530.
- [12] E. Picquet, K. Le Ny, P. Delépine, T. Montier, J.-J. Yaouanc, D. Cartier, H. des Abbayes, C. Férec and J.-C. Clément, *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 1051.
- [13] J. Sen and A. Chaudhuri, *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 903 and references therein.
- [14] P. Chabaud, M. Camplo, D. Payet, G. Serin, L. Moreau, P. Barthélémy and M.W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 466.
- [15] M. Belting, S. Sandgren and A. Wittrup, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 505.
- [16] K. Kostarelos, A.D. Miller, *Chem. Soc. Rev.* 34 (2005) 970.
- [17] J.H. Fuhrhop and T. Wang, *Chem. Rev.* 104 (2004) 2901.
- [18] J. Guilbot, T. Benvegna, N. Legros, D. Plusquellec, J.-C. Dedieu and A. Gullik, *Langmuir* 17 (2001) 613.

- [19] O. Zelphati, L.S. Uyechi, L.G. Barron and F.C. Szoka, *Biochim. Biophys. Acta* 1390 (1998) 119.
- [20] I. Moret, J.E. Peris, V.M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasi, A. Crespo and S. F. Alino, *J. Control. Release* 76 (2001) 169.
- [21] D.L. Reimer, S. Kong, M. Monck, J. Wyles, P. Tam, E.K. Wasan, M.B. Bally, J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 807.
- [22] D.M.L. Morgan, V. L. Larvin and J. D. Pearson, *J. Cell Sci.* 94 (1989) 553.
- [23] I.R.C. Hill, M.C. Garnett, F. Bignotti and S.S. Davis, *Biochim. Biophys. Acta* 1427 (1999) 161 (see references therein).
- [24] J.D. Toussignant, A.K. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, S.J. Eastman and R.K. Scheule, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 2493.
- [25] S. Loisel, C. Le Gall, L. Doucet, C. Ferec and V. Floch, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001) 685.
- [26] M.A.W. Eaton, T.S. Baker, C.F. Caterall, K. Crook, G.S. Macaulay, B. Mason, T.J. Norman, D. Parker, J.J.B. Perry, R.J. Taylor, A. Turner and A.N. Weir, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 4063.
- [27] V., Weissig and V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49 (2001) 127.
- [28] T. Yoshimura, S. Hasegawa, N. Hirashima, M. Nakanishi and T. Ohwada, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 2897.
- [29] T. Ren, G. Zhang and D. Liu, *Tet. Lett.* 42 (2001)1007.
- [30] T. Ren, G. Zhang and D. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (2001) 2969.
- [31] J. Gaucheron, C. Santaella and P. Vierling, *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 569.
- [32] K. Fabio, J. Gaucheron, C. Di Giorgio and P. Vierling, *Bioconjugate Chem.* 14 (2003) 358.
- [33] M.-L. Miramon, N. Mignet and J. Herscovici, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 6949.
- [34] S. Denoyelle, A. Polidori, M. Brunelle, P.Y. Vuillaume, S. Laurent, Y. El Azhary and B. Pucci, *New J. Chem.* 30 (2006) 629.
- [35] E. Kissa, Fluorinated surfactants. Synthesis, properties, applications, in Marcel Dekker, *Surfactants sciences series* 50, New York, 1994.
- [36] M. Kadi, P. Hanson and M. Almgren, *Langmuir* 18 (2002) 9243.
- [37] P. Barthelemy, V. Tomao, J. Selb, Y. Chaudier and B. Pucci, *Langmuir* 18 (2002) 2557.

- [38] K. Liang and Y. Hui, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 6588.
- [39] P.Y. Vuillaume, M. Brunelle, M.R. Van Calsteren, S. Laurent-Lewandowski, A. Bégin, R. Lewandowski, B.G. Talbot and Y. El Azhary, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1769.
- [40] V.A. Izumrudov, M.V. Zhiryakova and A.A. Goulko, *Langmuir* 18 (2002) 10348.
- [41] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman and A. Minsky, *Biochemistry* 32 (1993) 7143.
- [42] O. Boussif, F. Lezoualch, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J.P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7297.
- [43] H. Faneca, S. Simões and M.C. Pedroso de Lima, *Biochim. Biophys. Acta* 1567 (2002) 23.
- [44] M.A. Wolfert, P.R. Dash, O. Nazarova, D. Oupicky, L.W. Seymour, S. Smart, J. Strohmalm and K. Ulbrich, *Bioconjugate Chem.* 10 (1999) 993.
- [45] N.J. Zuidam, D. Hirsch-Lerner, S. Margulies and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta* 1419 (1999) 207.
- [46] A. Ito, R. Miyazoe, J. Mitoma, T. Akao, T. Osaki and T. Kunitake, *Biochem Int.* 22 (1990) 235.
- [47] T. Akao and A. Ito, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1997) 213.
- [48] M. Kogiso, S. Ohnishi, K. Yase, M. Masuda and T. Shimizu, *Langmuir* 14 (1998) 4978.
- [49] M. Kogiso, T. Hanada, K. Yase and T. Shimizu, *Chem. Commun.* (1998) 1791.
- [50] T. Shimizu and M. Masuda, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 2812.
- [51] I. Nakazawa, M. Masuda, Y. Okada, T. Hanada, K. Yase, M. Asai and T. Shimizu, *Langmuir* 15 (1999) 4757.
- [52] M. Masuda and T. Shimizu, *Langmuir* 20 (2004) 5969.
- [53] T. Shimizu, R. Iwaura, M. Masuda, T. Hanada and K. Yase, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 5947.
- [54] R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, K. Yase and T. Shimizu, *Chem. Mater.* 14 (2002) 3047.
- [55] R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, M. Ohnishi-Kameyama, M. Yoshida and T. Shimizu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 42 (2003) 1009.
- [56] L. Zarif, T. Gulik-Krzywicki, J.G. Riess, B. Pucci, C. Guedj and A.A. Pavia, *Colloids Surf., A* 84 (1996) 107.

- [57] F. Giulieri, M.-P. Krafft and J.G. Riess, *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* 33 (1994) 1514.
- [58] F. Giulieri, F. Guillod, J. Greiner, M.-P. Krafft and J.G. Riess, *Chem.-Eur. J.* 2 (1996) 1335.
- [59] F. Giulieri and M.-P. Krafft *J. Colloid Interface Sci.* 258 (2003) 335.
- [60] E. Dauty, J.-S. Remy, G. Zuber and J.-P. Behr, *Bioconjugate Chem.* 13 (2002) 831.
- [61] A.D. Miller, *Methods Mol. Med.* 90 (2004) 107.
- [62] C. W. Pouton, L.W. Seymour, *delivery. Adv. Drug Deliver. Rev.* 34 (1998) 3.
- [63] Y. Zhang, T.J. Anchordoquy, *Biochim. Biophys. Acta* 1663 (2004) 143.
- [64] B. Pitard, O. Aguerre, M. Airiau, A.-M. Lachagès, T. Boukhnikachvili, G. Byk, C. Dubertret, C. Herviou, D. Scherman, J.-F. Mayaux, J. Crouzet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 14412.
- [65] L. Cui, L. Zhu, *Langmuir* 22 (2006) 5982.
- [66] J. Smisterova, A. Wagenaar, M.C.A. Stuart, E. Polushkin, G. ten Brinke, R. Hulst, J.B. Engberts, D. Hoekstra, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47615.
- [67] B.K. Majeti, P.P. Karmali, S.S. Madhavendra, A. Chaudhuri, *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 676.
- [68] T. Blessing, J.-S. Remy, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1427.
- [69] E. Dauty, J.-S. Remy, T. Blessing, J.-P. Behr, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 9227.
- [70] C.L. Gebhart, A.V. Kabanov, *J. Control. Release* 73 (2001) 401.
- [71] T. M. Fyles, B. Zeng, *J. Org. Chem.* 63 (1998) 8337.
- [72] A. Salvati, L. Ciani, S. Ristori, G. Martini, A. Masi, A. Arcangeli, *Biophys. J.* 121 (2006) 21.
- [73] K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 12349.
- [74] I.S. Zuhorn, V. Oberle, W.H. Visser, J.B.F.N. Engberts, U. Bakowsky, E. Polushkin, D. Hoekstra, *Biophys. J.* 83 (2002) 2096.
- [75] D. Hirsch-Lerner, M. Zhang, H. Eliyahu, M.E. Ferrari, C.J. Wheeler, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta* 1714 (2005) 71.
- [76] I. Honoré, S. Grosse, N. Frison, F. Favatier, M. Monsigny, I. Fajac, *J. Control. Release* 107 (2005) 537.

ARTICLE IV

(Soumis chez Biomacromolecules Automne 2008)

Résumé de L'Article IV

**Tail-End Amphiphilic Dimethylaminopyridinium-Containing
Polymethacrylates for Gene Delivery**

Suite aux résultats présentés dans l'article III, j'ai travaillé sur une seconde famille de polymères cationiques, les poly(amphiphile)s de type méthacrylate (PAMs). Ces polymères m'ont paru intéressants à étudier puisqu'il s'agissait de molécules amphiphiles (un lien avec les bola(amphiphile)s présentés dans l'article précédent) possédant une charge positive nécessaire pour la condensation de l'ADN et un domaine hydrophobe reconnu pour favoriser les interactions avec la membrane cellulaire.

Dans ce travail, j'ai évalué l'effet de l'architecture du polymère [longueur du bras espaceur des segments aliphatiques (8, 12 et 16 unités méthylènes)] ainsi que de la nature du contre-ion (brome (Br-) ou octyl sulfonate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{SO}_3^-$) sur les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés biologiques *in vitro* des complexes formés. J'ai effectué toutes les expériences physico-chimiques et biologiques présentées dans l'article IV qui décrit les résultats de ce travail. J'ai démontré que l'architecture du polymère (autant la longueur du bras espaceur que la nature du contre-ion) influence fortement le processus de condensation de l'ADN et l'efficacité de transfection. Le résultat le plus intéressant de l'article est la démonstration que l'efficacité de transfection *in vitro* du PAMs C12Br- (12 unités méthylènes comme longueur du bras espaceur et contre-ion bromure) est similaire à celle du test de référence des standards de transfection *in vitro* (PEI branchée) et que ce polymère est très peu cytotoxique.

Suite à ces résultats *in vitro*, il serait très intéressant d'examiner les complexes PAMs/ADN *in vivo*. Par contre, des essais supplémentaires de transfection en présence de sérum devraient être effectués pour ajuster les ratios de transfection pour une complexation maximale en présence de sérum et estimer leur capacité de transfection *in vivo*.

En résumé, j'ai contribué à la conception de l'article, j'ai effectué toutes les expériences et écrit la majorité de l'article avec l'aide du chimiste de notre groupe de recherche.

Tail-End Amphiphilic Dimethylaminopyridinium-Containing Polymethacrylates for Gene Delivery

Pascal Y. Vuillaume,^{†,‡,*} Mélanie Brunelle,[†] C. Géraldine Bazuin,[‡] Brian G. Talbot,⁺

André Bégin,[§] Marie-Rose Van Calsteren,[§] Sylvette Laurent-Lewandowski[†]

Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Département de pathologie et microbiologie, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada J2S 2M2

Université de Montréal, Faculté des arts et des sciences, Département de chimie, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3J7

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur les aliments, 3600 boul. Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada J2S 8E3

Université de Sherbrooke, Faculté des sciences, Département de biologie, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec), Canada J1K 2R1

(*) To whom correspondence should be addressed: e-mail, [REDACTED]

[†] Département de pathologie et microbiologie

[‡] Département de chimie

[§] Agriculture et Agroalimentaire Canada

⁺ Département de biologie

[‡] Current address: Conseil national de recherches Canada, Institut des matériaux industriels, 75 boul. de Mortagne, Boucherville (Québec), Canada J4B 6Y4

ABSTRACT

Amphiphilic dimethylaminopyridinium alkyl polymethacrylates (aPP's) were tested for gene complexation, cell cytotoxicity, and *in vitro* gene expression for use as a gene delivery agent. The aminopyridinium groups are terminal moieties of side-chain spacers containing 8, 12, or 16 methylene units and are neutralized by bromide or octylsulfonate counterions. This investigation measured the impact of the spacer length and the chemical nature of the counterion on the physicochemical properties and biological activity of the polyplexes formed by the complexation of DNA with the aPP's. The aPP's self-assemble with DNA by neutralizing the DNA phosphate charges through the pyridinium moieties. The degree of DNA condensation is higher for the shorter-spacer ($n = 8, 12$) and bromide-neutralized aPP's in comparison with the longer-spacer ($n = 16$) and octylsulfonate-neutralized aPP's. Several of the aPP-DNA complexes form well-defined nanoparticles, which are usually but not always positively charged. Their sizes range from 30 to 150 nm and, in some cases, have an internal lamellar structure visible by TEM. All of the aPP's were found to be much less cytotoxic than the popular commercially available transfection agent, branched poly(ethyleneimine) [(PEI), 25 kDa]. The degree of cytotoxicity of the aPP's depends mildly on the spacer length and counterion: a longer spacer ($n = 16$) tends to decrease the cell viability more than the shorter spacers and, at the highest aPP concentrations tested, bromide counterions more than octylsulfonate counterions. The transfection efficiency also depends on the spacer length and counterion type. Polyplexes obtained from the Br-neutralized aPP's with the $n = 12$ spacer at the aPP/DNA weight ratio of 2.5, for which negatively charged nanoparticles are formed, were found to be by far the most efficient gene delivery agents, as efficient as PEI-based polyplexes. Interestingly, this demonstrates that, endosomolytic fragments and positively charged polyplex surfaces are not required for efficient gene expression. The mechanism of the transfection process is hypothesized to involve fusion of the polyplexes with the cell membranes, which is probably influenced by the spacer length and counterion type.

INTRODUCTION

In a few decades, gene therapy may well be a routine tool for the treatment of genetic diseases. The success of such therapy is related to the efficiency of the delivery of the DNA encoding the therapeutic proteins. Viral vectors are the most efficient gene delivery systems developed to date, owing to their high capacity for physical condensation of genetic material within the virus capsid, together with their efficient infection mechanisms. However, viruses also present serious drawbacks, including their immunogenicity and potential recombination. Many investigations have been carried out to design safe and versatile synthetic carriers with viral-like transfection efficiency. Amphiphilic block copolymers,¹ cationic polymers,^{2, 3} noncondensing polymers,^{4, 5} but also a large number of surfactants⁶ with different molecular structures (gemini⁷ and bolaforms^{8, 9}), have been tested. Several models of the relationship between structure and biological properties have been proposed.⁶

At first sight, amphiphiles (lipids and surfactants) appear promising as gene delivery systems, but they are often accompanied by undesirable cytotoxicity due to the destabilization of the cell membrane caused by their hydrophobic domains.¹⁰ On the other hand, highly ionic polymers and peptides can be effective gene condensing agents and delivery systems.¹¹ However, these compounds are relatively cytotoxic, related in part to their high cationic charge density.^{12, 13} The cationic charges, which are needed for efficient DNA condensation, and hydrophobic domains, which promote membrane interaction, have been combined in hydrophobically modified poly(ethyleneimine) (PEI), poly(L-lysine) (PLL), poly(amidoamine) (PAMAM), and poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) salts (PEVP).¹³⁻¹⁷ In some cases, this strategy successfully reduced toxicity without strongly affecting the transfection efficiency.¹⁸ In other instances, the most hydrophobic poly(β -amino ester)s, among a large library of molecules, were found to be the most toxic.¹⁹ Also, PAMAM's with a head-tail geometry, where positive charges ("head") are located within or close to the polymer backbone and covalently linked to aliphatic or lipid-like side-chains ("tail"), have been found to be quite cytotoxic.¹³ On the other hand, no polymers with a tail-end geometry, where the charges are covalently attached to the end of the aliphatic side-chains,²⁰ have so far been investigated for their transfection properties and cytotoxicity.

In the field of cationic amphiphiles designed for gene transfer, those incorporating heterocyclic pyridinium moieties have attracted particular attention owing to their low cytotoxicity and high transfection efficiency.²¹⁻²⁸ By contrast, polycations incorporating amphiphilic pyridinium-containing segments have been far less investigated. Compared to small cationic amphiphiles, the advantage of polymers with high cationic density is their condensation of DNA into small particles and their ability to form stable complexes with DNA. In this paper, we report on amphiphilic aminopyridinium-containing polymethacrylates (aPP's) with tail-end geometry and a relatively low cationic content as potential low-cytotoxic gene delivery candidates. The thermotropic properties of these types of cationic tail-end polyamphiphiles have been described previously.²⁹⁻³¹ Here we focus on the physicochemical and biological properties of poly(ω -dimethylaminopyridinium alkylmethacrylate)s with octyl, dodecyl, and hexadecyl spacers, neutralized by bromide (Br) and octylsulfonate (S8) counterions (see Figure 1). These compounds are referred to by the acronym PnDMAP-X where P, n, DMAP, and X refer to the polymethacrylate backbone, the number of methylene units in the side-chain spacer, the dimethylaminopyridinium cationic group, and the type of counterion (Br or S8), respectively. We investigate, in particular, the influence of the spacer length and the chemical nature of the counterion on the specified properties.

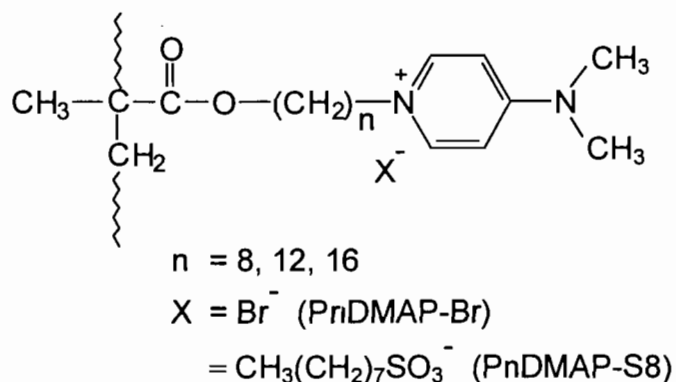


Figure 1. Chemical structure and acronyms of the bromine- and octylsulfonate-neutralized dimethylaminopyridinium poly(alkyl methacrylate)s studied.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods. Sterile water (DNase/RNase free, molecular biology reagent), PEI (25 kDa, branched), and ethidium bromide were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Cell culture plastics were purchased from Corning Costar (Corning, NY). Zeocin, pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid (8433 bp) encoding β -galactosidase under the control of the CMV promoter and *Escherichia coli* Top 10 chemically competent cells were obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and OPTI-MEM I reduced serum medium were purchased from GIBCO Invitrogen (Burlington, ON). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Medicorp (Montreal, QC). The COS7 cell line (Simian virus 40-transformed kidney cells of an African green monkey) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Valencia, CA). The MTT cell proliferation kit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] and the β -galactosidase ELISA kit were purchased from Roche Diagnostics GmbH (Laval, QC).

Synthesis of the Polyamphiphiles. The synthesis and characterization of the aPP's are described elsewhere.^{29, 31} In contrast to P8DMAP-Br and P12DMAP-Br, P16DMAP-Br was polymerized in the presence of a small amount of transfer agent, 2-mercaptoethanol, to reduce the molar mass in order to improve the polymer solubility for subsequent ion exchange. The molar mass of the aPP's could not be determined with precision. However, based on recent NMR and osmometry investigations (see comments in reference³¹), molar masses are estimated to be above 10000.

Preparation of Polyamphiphile/DNA Complexes (Polyplexes). Plasmid pBudCE4.1/LacZ/CAT was amplified and used for all of the experiments, as described elsewhere.¹³ Polyplexes were prepared at different weight ratios (aPP/DNA w/w) with a final DNA concentration of 10 μ g/mL in sterile water. In each case, considering the desired aPP/DNA w/w ratio, an appropriate amount of aqueous polyamphiphile solution (0.5 mg/mL) was added to a final volume of 500 μ L of water, and this was gradually added to an appropriate amount of aqueous DNA solution (20 μ g/mL), with a vortex time of 30 s between each addition. The final solution was stirred for 2 min and incubated at room temperature for 15 min to improve stabilization.

Gel Electrophoresis. A control DNA solution or 40 μ L of polyplex, both containing 400 ng of DNA, was mixed with bromophenol blue in glycerol, after which they were subjected to electrophoresis on a 0.8% (w/v) agarose gel [tris-acetate-EDTA buffer (pH 8.5), 90 V, 90

min]. DNA bands were visualized by UV illumination after coloration with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min. Complete neutralization of the charges on the DNA results in its immobilization in the loading well of the gel.

Size Distribution and Zeta (ζ) Potential Measurements. The polyplexes were prepared at different weight ratios under conditions identical to those employed for gel electrophoresis experiments. The sizes, size distributions and the ζ -potentials were measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer (Malvern, NanoZS ZEN3600) and the same disposable cell (folded capillary cell DTS 1060). The instrument was equipped with a monochromatic coherent helium neon laser (633 nm) light source. The scattered light was recorded at an angle of 173° , and the analysis of the autocorrelation function was performed automatically to yield the diffusion coefficient, D_T , using values of 1.33 and 25°C for the refractive index and temperature, respectively. Intensity and number distributions were obtained relative to the hydrodynamic diameter using a unimodal distribution. The tail of the correlation function was also examined to determine if aggregates were present. The average particle sizes and standard deviations are given as the mean from six measurements. The ζ -potential was calculated by using the Schmoluchowsky approximation³² and carried out directly after the particle size measurements. The mean ζ -potentials were obtained from three determinations per sample.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Selected aPP's and polyplexes with weight ratios (w/w) varying from 1:1 to 1:10 (prepared as described above), were chosen for morphological investigations. Ten microlitres of sample were deposited on a 150-mesh copper grid coated with Formvar, followed by careful removal of excess solution using the edge of a moist filter paper. Samples were then negatively stained for 2 min with a droplet of 1% uranyl acetate (aqueous solution, pH 4.5). After removal of the excess stain solution with a moist filter paper, the grid was air-dried. Observations were made using a Phillips EM 410 at 80 kV.

Cytotoxicity Assays. The metabolic activity of viable COS7 cells was measured, using the MTT Cell Proliferation Assay kit, 24 h after incubation of cells with various PnDMAP-X concentrations [1.5 to $22.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$]. These concentrations corresponded to the quantity of polymer used in the transfection experiments. Cells were grown in 96-well plates for 24 h before the treatment at an initial seeding density of $1.9 \cdot 10^4$ cells/well in 100 μL of complete

medium. Various concentrations of PnDMAP-X were directly prepared in OPTI-MEM I without serum and applied on the cells. Cells were grown for 24 h in the presence of PnDMAP-X and then tested for metabolic activity. MTT reagent (10% v/v) was added to each well (final concentration 0.5 mg/mL). After 4 h of incubation at 37 °C, the purple insoluble salt was dissolved by adding 100 µL of "solubilization solution". The plate was incubated in the dark at 37 °C for 24 h. Absorbance was measured at 550 nm using a reference wavelength of 650 nm. The viability of cells treated with DNA alone was used as the relative 100% cell viability. The results were expressed as the relative percentage of cell viability relative to the untreated control: $\text{relative cell viability (\%)} = (\text{OD}_{(550-650)\text{sample}} / \text{OD}_{(550-650)\text{ naked DNA}}) \times 100$. PEI cytotoxicity was also evaluated for comparison purposes, using equivalent concentrations. Experiments were performed in triplicate.

Transfection Protocol. The day preceding the transfection experiment, COS7 cells were seeded on a 6-well plate at a density of $2.9 \cdot 10^5$ cells/well in complete medium [90% (v/v) DMEM-containing L-glutamine, 10% FBS] at 37 °C in 5% CO₂ (v/v) to reach 90% confluence at the moment of transfection. Polyplexes were prepared as described above at w/w ratios varying between 1:1 and 5:1. Immediately before the transfection experiment, the medium was removed. The cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and then 1 mL of serum-free OPTI-MEM I medium followed by the polyplex solution (500 µL, 5 µg of DNA/well) was added to the cells. These serum-free transfection mixtures were incubated for 4 h, after which the medium was replaced with complete medium for 20 h. The β-galactosidase content was determined using the ELISA kit. Total protein content was determined by bicinchoninic acid assay (BCA) from Pierce. Results are expressed as (pg of β-galactosidase)/(µg of total protein). Negative and positive transfection controls were performed using naked DNA (5 µg) and PEI polyplexes (at a PEI/DNA N/P ratio of 10),⁸ respectively. Transfection experiments were repeated three times.

RESULTS

Charged Site and Stability Characteristics of PnDMAP-X. Tail-end PnDMAP-X polyamphiphiles bear aliphatic side-chains with terminal groups that possess two kinds of amino moieties. One is a quaternary ammonium that forms part of the pyridinium heterocycle, the other a tertiary amine tail linked directly to the heterocycle. The former is permanently charged, whereas the latter was found to not be protonated under physiological conditions nor under much more acidic conditions ($\text{pH} \sim 1$), probably due to the withdrawing effect of the pyridinium group and the delocalization of the charge over the aromatic ring, both of which decrease the basicity. The acid dissociation constant (pK_a) of the tertiary amine was estimated using the ACD/Labs calculator program for a methacrylic dimer with unpolymerized double bonds (neglecting any resonance effects). The negative pK_a value obtained (-4.1) is in agreement with the value (-4.4) reported elsewhere.³³ ^1H NMR chemical shift data, which showed no change with varying pH , also indicate that there is no protonation of the tertiary amine under acidic conditions ($\text{pH} \sim 1$). These results confirm that the exocyclic DMAP nitrogen is virtually non-ionizable in water. Consequently, it may be anticipated that the only cationic charge involved in the electrostatic binding process with the DNA phosphate groups is the permanently charged pyridinium moiety. Under acidic conditions, the methacrylate ester link is potentially hydrolyzable. This was monitored by ^1H NMR. It was observed that even a drastic increase in the temperature ($80\text{ }^\circ\text{C}$) combined with a harsh acidic environment ($\text{pH} \sim 1$) resulted in no change in the ^1H NMR spectra, probably because of the stability of the polyamphiphile superstructures in H_2O (see next section) that protect the ester link. These experiments suggest that the structural integrity of the PnDMAP-X in the form of micelles should not be affected by the acidic conditions prevailing in the endosome.

Aggregation Behavior of PnDMAP-X in H_2O . Aggregation of PnDMAP-X in water before complexation is expected to have an impact on their interaction with DNA. This was examined first by visual observation of PnDMAP-X aqueous solutions at two different concentrations, low (0.5 mg/mL) and high (3-5 mg/mL). Solutions of the short-spacer PnDMAP-X ($n = 8$; $X = \text{Br}$, S8) appeared transparent, and thus soluble, at all of the concentrations tested. They were also quite viscous at high concentrations. Low concentrations of the longer-spacer PnDMAP-X ($n = 12, 16$; $X = \text{Br}$, S8) were also transparent; however, high concentrations were turbid, indicating the presence of

suspensions large enough to scatter light. An increase in temperature during sonication enhanced their solubility somewhat, but without eliminating all turbidity. Furthermore, after both cold storage (4 °C) and lengthy periods at room temperature, gels were easily visible. This was most evident for P12DMAP-X, which was polymerized without transfer agent, compared to the P16DMAP-X, polymerized in the presence of transfer agent – probably a consequence of the higher molar mass of the former, as explained in previous publications.^{29, 31} The negative stain TEM technique allows direct observations of the PnDMAP-X morphologies, which were investigated at low and high concentrations (0.5 and 3.4 mg/mL, respectively). Representative images are shown in Figure 2. The images obtained from high concentrations of PnDMAP-X, $n = 12$ and 16 , are characterized by a mixture of wormlike and spherical micelles (Figure 2a for P16DMAP-S8). The diameters of the spherical micelles of P16DMAP-S8 are 20-70 nm and the tube diameters about 6 nm. Similar shapes were observed for the more dilute solutions (0.5 mg/mL) of the longer-spacer polyamphiphiles ($n = 12$ and 16). All PnDMAP-X studied present tube diameters of 5-7 nm, whereas the diameters of the spherical micelles vary widely from about 20 to 130 nm, as shown for PnDMAP-S8 ($n=12, 16$) in Figure 2.b and 2.c. For P8DMAP-X, aggregates also appear to be present at both low and high concentrations, but they are only barely visible and their shape is poorly defined (images not shown). The TEM observations thus indicate that all of the PnDMAP-X present some degree of aggregation in both the dilute and concentrated solutions investigated, even those that were visually transparent.

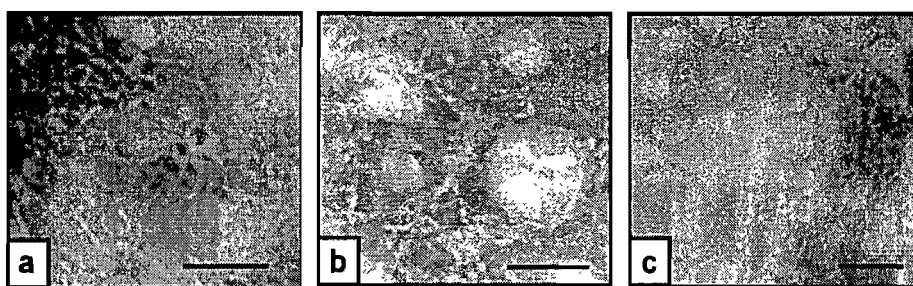


Figure 2. Representative negative-stain TEM images showing the morphology of the amphiphilic polymethacrylates prepared from solutions at the concentrations indicated: a) P16DMAP-S8 (3.4 mg/mL; $\times 175000$; bar = 100 nm); b) P16DMAP-S8 (0.5 mg/mL; $\times 175000$; bar = 100 nm); c) P12DMAP-S8 (0.5 mg/mL; $\times 175000$; bar = 50 nm).

Complexation of PnDMAP-X with DNA. To evaluate the capability of PnDMAP-X to neutralize DNA, agarose gel shift assays were performed. Observation of complete gel retardation of DNA usually indicates that charge neutralization of DNA was achieved. Figure 3 shows representative images of agarose gel electrophoresis for PnDMAP-X/DNA polyplexes formed at different weight ratios. Naked DNA was used as a control. The images suggest that complete neutralization of the negative charge (phosphate groups) of the plasmid DNA can indeed be achieved by the positive charges (pyridinium moieties) of the PnDMAP-X. For P8DMAP-X and P12DMAP-X, the minimum weight ratios required are about 1.5 and 3-5, respectively, whereas for P16DMAP-X weight ratios of 2.5-5 and 5-7.5 for X=Br and S8, respectively, are necessary. Table 1 gives the charge ratios corresponding to the weight ratios, showing that the decrease in charge density of PnDMAP-X with increase in spacer length cannot account for the differences in minimum weight ratio necessary to achieve complete gel retardation. This indicates that the amount of PnDMAP-X required to arrest DNA migration increases with the spacer length. Any dependence on the nature of the counterion is less clear, except for $n = 16$ where a higher weight ratio appears necessary for S8 than for Br.

Figure 3 also suggests that the degree of DNA condensation depends on the spacer length. For instance, a marked fluorescence on the anode side of the loading wells can be observed for P16DMAP-X at weight ratios ≥ 5 . This might indicate that DNA was imperfectly condensed, so that ethidium bromide could still diffuse within the DNA strands in the complex. Similar behavior was reported for hydrophobized and highly charged PAMAM.¹³ Within the PnDMAP-Br series, the fluorescence in the loading wells appears more intense for $n = 8$ and 16 than for $n = 12$. In contrast, within the PnDMAP-S8 series, $n = 8$ shows the lowest fluorescence intensity in the wells.

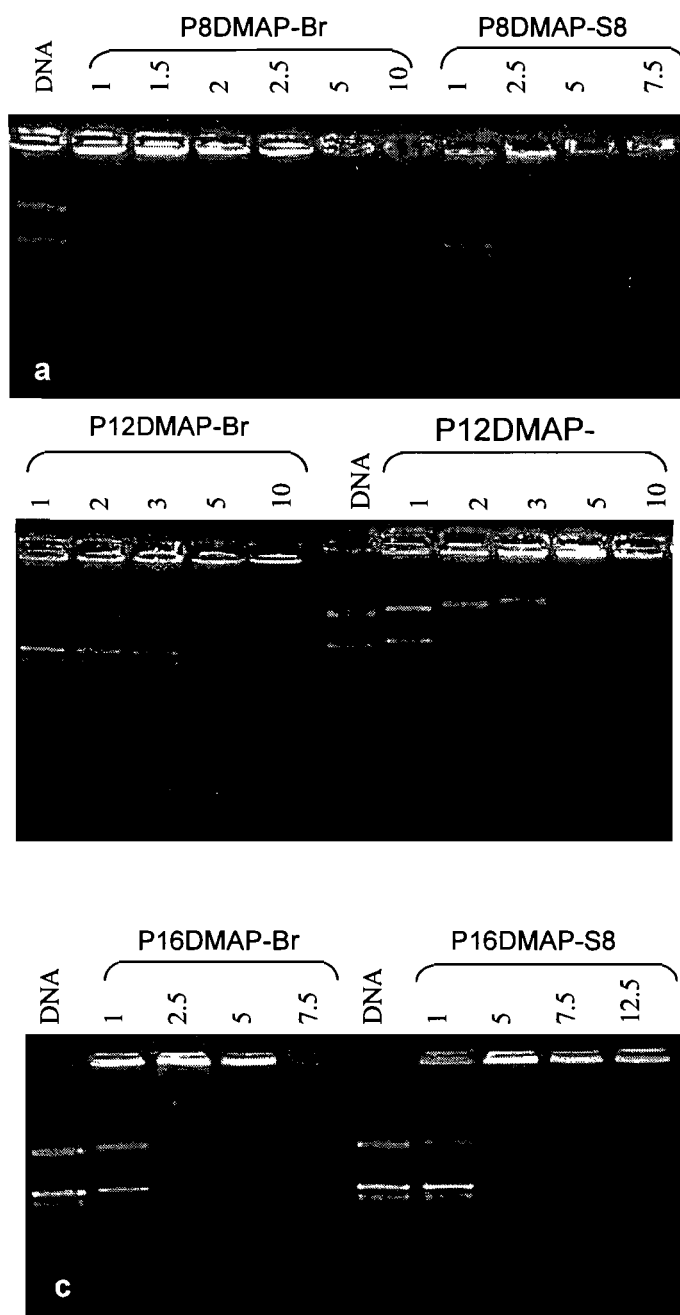


Figure 3. Representative gel electrophoresis shift assays of the PnDMAP-X-based polyplexes with pBudCE4.1/LacZ/CAT plasmid. Wells were loaded with the equivalent of 400 ng of DNA. Naked DNA was used as control.

ζ -potential of the Polyplexes. It has been observed that nonspecific absorptive endocytosis of nanoparticles formed from cationic polymers is possible with positively charged complexes.³⁴ To determine the influence of the surface charge of PnDMAP-X polyplexes on the transfection efficiency, ζ -potentials of polyplexes were measured. The data are given in Table 1. Polyplexes prepared from the shorter-spacer polyamphiphiles ($n = 8$) present charge inversion between weight ratios of 1 and 1.5 (or +/- charge ratio of ~ 1). The ratio for charge inversion tends to increase with spacer length [at least for P12DMAP-Br, where it occurs above a weight ratio of 2.5 (+/- ratio of ~ 2), and for P16DMAP-S8, where it occurs between weight ratios of 10 and 12 (+/- ratio of ~ 6)]. A clear difference between the Br and S8 counterions is observed only for $n = 16$, with charge inversion occurring at a much lower ratio for Br than for S8. In fact, the polyplex with P16DMAP-S8 stands out with the very high ratio required for its ζ -potential charge inversion, which is, furthermore, much higher than that required to completely retard DNA. In contrast, ζ -potential charge inversion for $n = 8$ (and possibly $n = 12$, although this is less evident) is consistent with that required for complete retardation of DNA migration in gel electrophoresis.

Size and Stability of the Polyplexes by DLS. Previous investigations have suggested that polycations capable of compacting DNA into stable nanoparticles (<200 nm) allow an effective entry of the polyplexes into the cell through an endocytosis mechanism³⁵ and promote intracellular trafficking.³⁶ With this in mind, we used DLS to determine the sizes (hydrodynamic radii) of the various polyplexes. Data obtained from the number distribution curve, given in Table 1, indicate that all of the aPP's studied can condense DNA to relatively small particles, generally less than 100 nm. Polyplexes with the smallest diameters (44 nm) are formed from P12DMAP-Br at a weight ratio of 2.5. All polyplexes are characterized by a large polydispersity index (>0.17), indicating a broad size distribution. In two cases, for P16DMAP-S8/DNA polyplexes at weight ratios of 10 and 12, the number distribution curve is bimodal, which can be attributed to a small amount of particle aggregation [see the TEM image in Figure 5f, where many interconnections between particles are visible]. This is not observed in the intensity distribution curve because large objects scatter light much more strongly than small ones, resulting in much more weight given to the larger particles. In comparison, the bimodal number distribution

of sizes demonstrates the coexistence of a small proportion of aggregates and a predominant fraction of small-sized particles. On the other hand, the validity of DLS experiments on these suspensions might be questioned given the nonspherical aspect of a significant portion of the objects as observed by TEM (see next section). For instance, flexible and uncondensed DNA [see TEM observations of P8DMAP-X polyplexes ($w/w = 1$)] should scatter light less extensively than condensed DNA (Figure 4a).³⁷ Nevertheless, sizes obtained by light scattering data are in good agreement with those obtained from TEM.

Table I. Sizes distributions and ζ -potentials of PnDMAP-X/DNA polyplexes of various weight and molar charge ratios, as determined by dynamic light scattering (DLS).

Polymer	Ratios		Distribution (intensity)		Distribution (number)	ζ -potential mV
	w/w	+/- ^b	^a Size (SD) ^a nm	PDI nm	Size (SD) ^a nm	
P8DMAP-Br	1	0.9	383 (25)	0.26	147 (8)	-24
	1.5	1.3	171 (6)	0.24	73 (4)	15
P8DMAP-S8	1	0.7	141 (20)	0.22	62 (5)	-37
	1.5	1.0	179 (11)	0.23	94 (7)	8
P12DMAP-Br	2	1.6	175 (8)	0.19	96 (7)	-25
	2.5	1.9	198 (14)	0.39	44 (3)	-21
P12DMAP-S8	3	1.9	217 (33)	0.23	103 (14)	16
	5	3.1	141 (9)	0.21	69 (5)	19
P16DMAP-Br	3.5	2.4	124 (3)	0.17	64 (4)	25
	5	3.5	172 (12)	0.36	49 (2)	36
P16DMAP-S8	7.5	4.2	175 (9)	0.26	85 (13)	-52
	10	5.7	394 (54)	0.33	170 (23)/73 (16)	-18
	12	6.8	343 (21)	0.42	156 (15)/72 (17)	29

^a SD: standard deviation; PDI: polydispersity index

^b Molar ratios of charges (+/-) were calculated supposing that the small counterions [Br or S8 for aPP's, Na and Mg (assuming a proportion of 50/50 Na/Mg w/w) for DNA] remain present in the polyplexes. If these counterions are totally absent, the ratios are only slightly modified: e.g. for the P8DMAP-Br/DNA polyplex of 0.9 charge ratio with the small counterions present as specified becomes exactly equimolar (1.0 charge ratio) if no small counterions are present.

Morphology of Polyplexes Determined by TEM. According to previous investigations,³⁶ the degree of compaction of the plasmid DNA and the morphology (spherical/toroidal) of the particles are critical factors for transfection efficiency. In the present study, TEM observations were used to observe the morphologies and to confirm the sizes of polyplexes obtained by DLS measurements. Representative TEM images of freshly prepared polyplexes are presented in Figures 4 and 5.

PnDMAP-Br series. P8DMAP-Br/DNA polyplexes formed at a weight ratio of 1, for which there is incomplete neutralization, appear as a mixture of different morphologies (Figure 4a). Particles with roughly spherical shapes and small sizes (~50 nm) as well as particles with a fibrillar-like morphology are clearly visible throughout the preparation. These particles are either isolated (see insert in Figure 4a) or in the form of bundles, and are reminiscent of the morphology reported for functional PAMAM.³⁸ This morphology cannot be attributed to free DNA, since the diameters of the small thread-like objects (axial diameter ~25 nm) is not commensurate with the thickness of the DNA double helix (2.55 nm for the B-DNA form).³⁹ It is likely that this structure is the result of incomplete condensation of the DNA due to partial neutralization of the phosphate groups by the pyridinium moieties at this weight ratio, in accordance with the ζ -potential data. Moreover, a small proportion of the particles visible in Figure 4a are aggregated. An increase in the proportion of P8DMAP-Br to weight ratios of ~2.5 (not shown in Figure 4) and 5 results in the formation of positive complexes and leads to a better compaction of DNA with a more uniform particulate morphology with sizes ranging from 35 to 50 nm (Figure 4b). In this case, there are no visible interconnections between surface-charged particles.

As shown in Figure 4c-f, polyplexes formed from both P12DMAP-Br and P16DMAP-Br also show mixed morphologies. For P12DMAP-Br, at a weight ratio of 2.5, the predominant form are small, spherical particles of ~43 nm (Figure 4c), in accordance with the DLS data; they are characterized by an internal lamellar-like structure with a repeat distance of ~7 nm (see insert of Figure 4c). For P16DMAP-Br (investigated at a weight ratio of 5.0), the polyplex particles are 50-100 nm in size, but generally not spherical (Figure 4e). In addition, particles with a toroidal-like morphology, of diameter 100-125 nm for P12DMAP-Br (Figure 4d) and ~290 nm for P16DMAP-Br (Figure 4f), are occasionally observed. This is worthy of mention because, to our knowledge, this is the first observation

of these structures in polymethacrylate systems, whereas they have been reported for other polymeric systems^{13, 40-42} and small polyamine molecules.⁴³

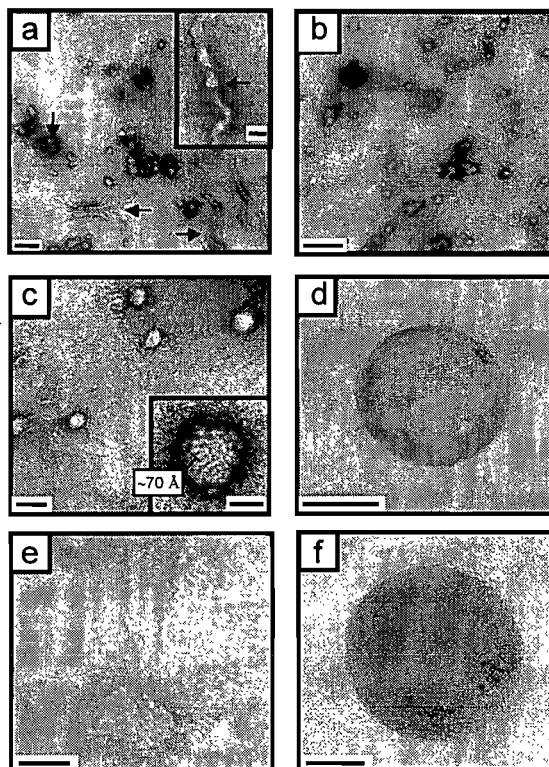


Figure 4. Representative negative-stain TEM images showing the morphologies of the PnDMAP-Br/DNA polyplexes: a) $n = 8$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 1$, ($\times 37500$, bar = 200 nm); arrows point to aggregated nanoparticles and fibrillar-like objects; the insert shows a magnification of one incompletely condensed DNA fragment ($\times 175000$, bar = 25 nm); b) $n = 8$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 5$, ($\times 37500$, bar = 200 nm); c) $n = 12$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 2.5$ ($\times 62500$, bar = 100 nm); the insert shows a magnification of a nanoparticle with internal lamellar-like order ($\times 230000$, bar = 50 nm); d) $n = 12$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 2.5$ ($\times 300000$, bar = 100 nm); e) $n = 16$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 5$ ($\times 175000$, bar = 50 nm); f) $n = 16$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 5$ ($\times 105000$, bar = 100 nm).

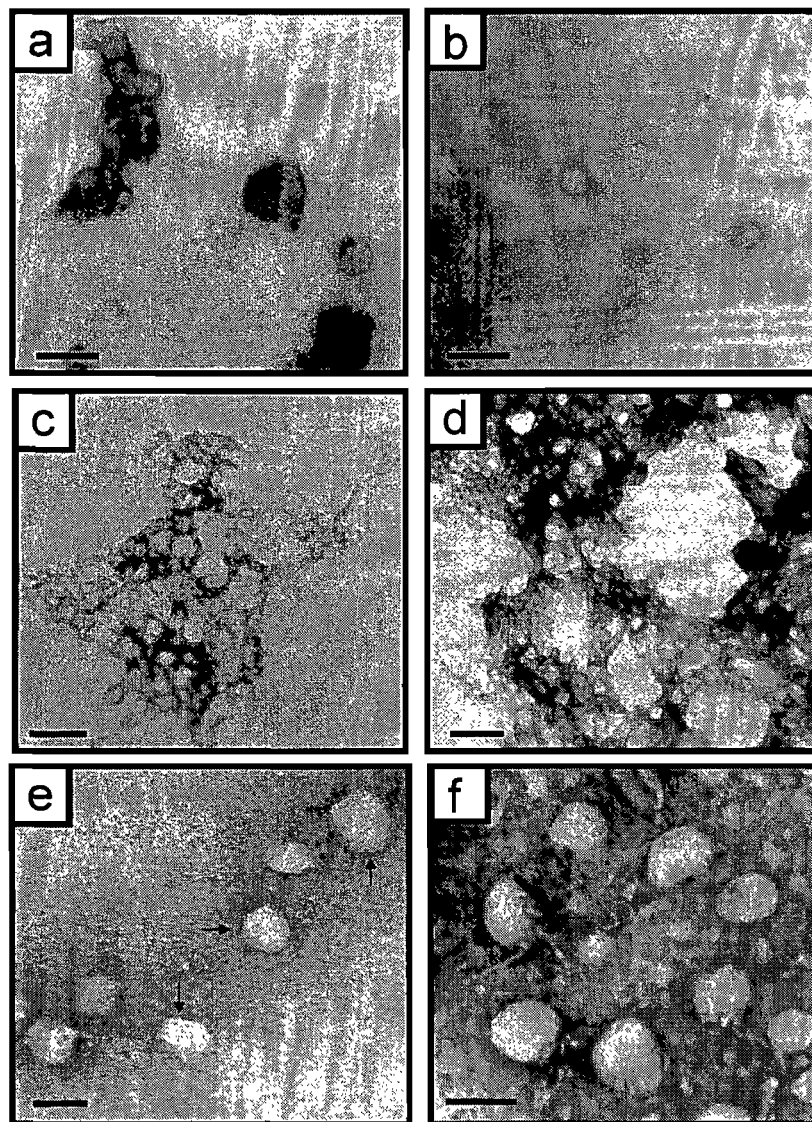


Figure 5. Representative negative-stain TEM images showing the morphology of the PnDMAP-S8/DNA polyplexes (bar = 100 nm unless otherwise mentioned): a) $n = 8$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 1$ ($\times 62500$); b) $n = 8$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 2.5$ ($\times 62500$); c) $n = 12$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 1$ ($\times 62500$); d) $n = 12$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 2.5$ ($\times 62500$); e) $n = 16$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 10$ ($\times 175000$, bar = 50 nm), arrows indicate particles with internal order; f) $n = 16$, $\text{ratio}_{(w/w)} = 10$ ($\times 175000$).

PnDMAP-S8 Series. The TEM images of P8DMAP-S8 polyplexes at weight ratios of 1 and 2.5, given in Figure 5a-b, show the presence of heterogeneous DNA structures with incompletely condensed DNA as well as uniform particles. For the polyplexes based on P12DMAP-S8 and P16DMAP-S8, TEM observations indicate, in accordance with the gel electrophoresis results that a larger amount of polyamphiphile is necessary to condense DNA into small and well-defined particles. The images for P12DMAP-S8 polyplexes in Figure 5c-d show that well-defined condensed particles are not yet attained for a weight ratio of 2.5, contrasting with the P12DMAP-Br polyplex at the same weight ratio. In contrast, a weight ratio of 10 for P16DMAP-S8 polyplexes does result in the formation of well-defined particles (~50 nm), which, moreover, show an internal structure in some cases.

Thus, a common trend indicated by the TEM images of the various PnDMAP-X polyplexes (Figures 4 and 5) is the increased ratio of polyamphiphile necessary for the development of small-sized spherical nanoparticles as the spacer length increases. On the other hand, at any given weight ratio, the substitution of Br counterions by the S8 counterions tends to decrease the ability of the polyamphiphiles to efficiently condense DNA and generate discrete well-defined nanoparticles.

Cytotoxicity of the PnDMAP-X Polyamphiphiles. The variations of the *in vitro* cell cytotoxicity observed for the two series of polyamphiphiles are presented in Figure 6 and compared with the cytotoxicity of branched PEI. The cytotoxicity is expressed as the relative percentage of metabolically active cells as a function of the aPP concentration, which varies from 1.5 to 22.5 $\mu\text{g/mL}$. At a given concentration, all of the PnDMAP-X are always less cytotoxic than PEI. For example, at a polymer concentration of 3.75 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to the concentration of polycation in a polyplex of weight ratio 2.5), 85-90% of the cells are still viable compared to less than 50% viability for cells treated with PEI. In the PnDMAP-Br series, the cytotoxicity depends on the spacer length, the longest-spacer aPP's ($n = 16$) being significantly more cytotoxic ($p < 0.05$) than the shorter-spacer aPP's ($n = 8, 12$). The PnDMAP-S8 series shows a similar relationship of cytotoxicity with spacer length, although more weakly. The nature of the counterion also affects the cytotoxicity profile of the polyamphiphile, but there is no general trend. However, at high concentrations of polyamphiphile (22.5 $\mu\text{g/mL}$; 7.5-22.5 for $n=16$), the cell viability is higher for S8 than for Br ($p < 0.05$).

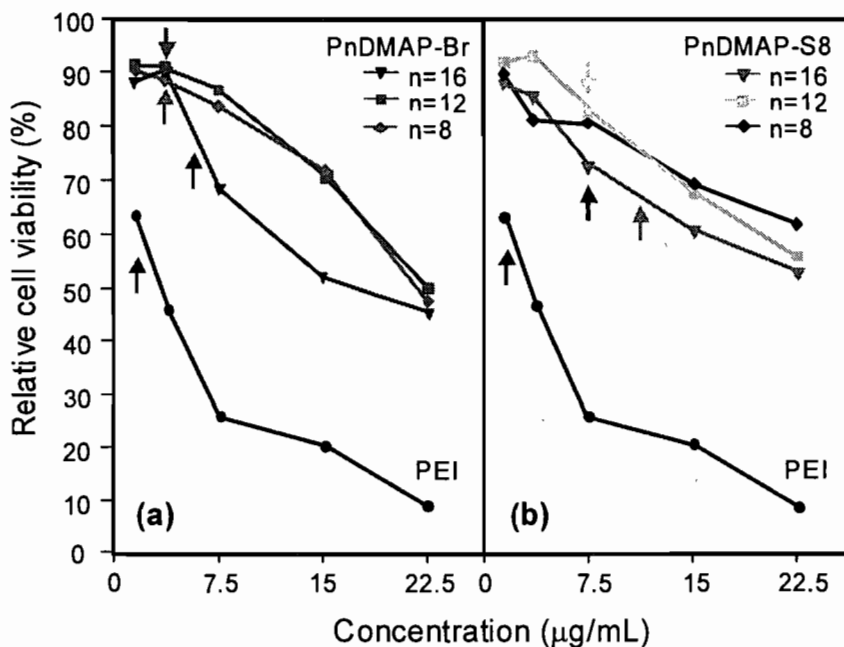


Figure 6. The relative cell viability of the COS7 cells after a 24 h exposure as a function of the polycation concentration for the PnDMAP-X polyamphiphiles in comparison with PEI. Cells treated with (a) PnDMAP-Br and (b) PnDMAP-S8. Arrows indicate the concentration corresponding to optimal transfection efficiency for each polycation.

***In Vitro* Transfection Efficiency of Polyplexes.** The impact of the counterion, spacer length and weight ratio complexation on the *in vitro* transfection efficiency was also examined. Naked DNA and PEI-based polyplexes were employed as negative and positive controls, respectively. Figure 7 displays the transfection efficiencies of the various polyplexes. The expression level of the transgene as a function of the ratio employed appeared as a bell-shaped profile for all of the aPP's tested. The maximum transfection efficiency is obtained for polyplexes with P12DMAP-Br at a weight ratio of 2.5 (charge ratio of 1.9). Its value is much higher than that of any of the other PnDMAP-X polyplexes (more than 5 times higher than the next best one, P12DMAP-S8 at w/w=5), and of the same order of magnitude as that generated by PEI polyplexes (N/P=10).

Within the PnDMAP-Br series, the optimum weight ratio for transfection varies with spacer length, ranging from 2.5 for $n = 8$ and 12 to 3.75 for $n = 16$. Moreover, the transfection efficiency is highest for $n = 12$, followed by $n = 8$, with $n = 16$ giving much poorer results. Within the PnDMAP-S8 series, the optimum weight ratios for transfection ranges from 5

for $n = 8$ and 12 to 7.5 for $n = 16$. Thus, optimum transfection occurs at higher weight ratios in the S8 series compared to the Br homologues. The transfection efficiency as a function of spacer length follows the same trend in both series ($12 > 8 > 16$), although the differences are much less marked in the S8 series. Possibly, additional weight ratio optimization may further improve the transfection efficiency of the PnDMAP-X/DNA polyplexes.

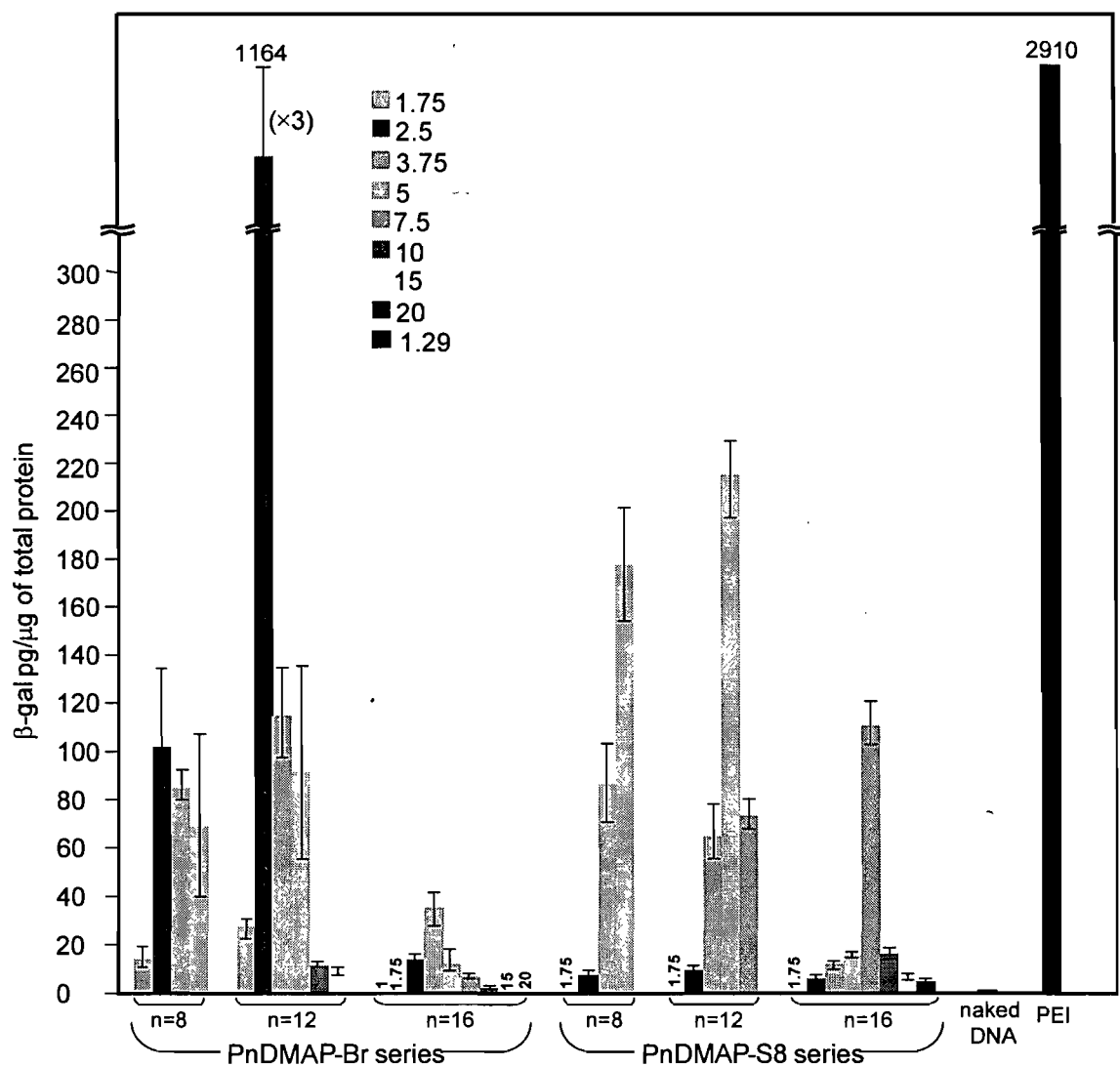


Figure 7. Transfection of COS7 cells using the plasmid pBudCE4.1/LacZ/CAT complexed with various PnDMAP-X in the weight ratio range 1-20. Bars indicate standard deviation. A weight ratio of 1.29 [corresponding to $N/P=10$] was used for the preparation of PEI-based polyplexes.

DISCUSSION

Tail-end amphiphilic polymethacrylates with different spacer lengths and counterions [inorganic (bromide) vs. organic (octylsulfonate)] were investigated, and evaluated for plasmid DNA condensation, cell cytotoxicity, and *in vitro* transfection efficiency. Both spacer length and nature of counterion were found to have significant impacts on the physicochemical and biological characteristics of the resulting polyplexes.

Physicochemical Properties of the Polyplexes. All of the PnDMAP-X polyamphiphiles neutralize and condense DNA via electrostatic interactions between negatively charged DNA phosphate groups and positively charged dimethylaminopyridinium “tail-end” groups. This concurs with several studies that have demonstrated that permanently charged polycations (ammonium or pyridinium)¹⁵ are better condensing agents than protonable polycations whose charge density is pH-dependent.⁴⁴ Moreover, the position of the cationic charge near the end of a flexible sidechain makes it more accessible, which probably facilitates electrostatic interactions with the DNA.

This investigation shows that an increase in spacer length and, for P16DMAP-X, the use of long counterions (S8) decrease the efficiency of the neutralization and condensation processes. This is the first reported evidence of the effect of the chemical nature of counterions (for permanently charged polycations) on the neutralization and physical structure of polyplexes. The spacer effect could be attributable, at least in part, to the change in overall hydrophilic/hydrophobic balance of the PnDMAP-X, which dictates the structural organization of PnDMAP-X in solution and thereby influences the subsequent electrostatic interactions with DNA. For example, the lack of well defined and thus more soluble micellar superstructures of P8DMAP-X in solution could explain their more efficient neutralization at lower polymer/DNA weight ratios compared with the longer-spacer aPP's (n = 12 and 16). These latter complexes have well defined micellar superstructures in solution in which the cation may be less available for interaction, thus requiring higher amounts of PnDMAP-X for efficient DNA neutralization and condensation. On the other hand, the S8 counterion can reduce the accessibility of the pyridinium group due to its size and/or the hydrophobicity of its alkyl chain.

Biophysical Characteristics of the Polyamphiphiles and Polyplexes. The influence of the structural characteristics of polyamphiphiles on cell viability is still poorly understood despite extensive investigations.^{13, 34, 45} The combination of characteristics such as the cationic charge⁴⁶ and the presence of lipid-like segments⁴⁷ can result in acute cytotoxicity. In particular, as we reported elsewhere,¹³ the covalent attachment of aliphatic segments to a permanently charged PAMAM backbone is detrimental to cell viability due to a detergent effect on the cell membrane. Within the PnDMAP-X series, the combination of aliphatic side chain spacers and quaternized DMAP terminal groups leads to only mild cytotoxicity. Furthermore, PnDMAP-X polyamphiphiles are much less cytotoxic than PEI (branched, 25 kDa). This relatively low cytotoxicity of the polyamphiphiles may be explained by their lower charge density. The molar ratio of charges for a weight ratio of 1 for aPP's varies between 1 for P8DMAP-Br and 0.56 for P16DMAP-S8 (see Table 1) compared to 4.5 for fully ionized PEI. The tail-end geometry of the PnDMAP-X polyamphiphiles that is responsible for micelle formation may also account for the weak cytotoxicity by masking the hydrophobic segments of PnDMAP-X. It is further possible that the rigidity of the terminal pyridinium fragments decreases the detergent effect of the aPP's. The latter is supported by observations reported for N-containing heterocycle polycations⁴⁸ and surfactants,⁴⁹ indicating that pyridinium head-groups have little impact on cytotoxicity because they limit the interactions with the cell-membrane. In many instances, high cytotoxicity interferes with the transfection process and can explain differences in transfection efficiency between gene delivery systems.^{50, 51} Given the relatively low cytotoxicity of all of the PnDMAP-X, the differences observed in transfection efficiency should not be attributed to this factor but mainly to physicochemical characteristics.

In terms of the potential of the aPP's as new gene transfer agents, the present investigation indicates that the spacer length and the nature of the counterion, in addition to the aPP/DNA weight (or charge) ratio, strongly influence the level of transfection. In general, a small size, a regular shape (spherical/toroidal), and a net positively charged surface are considered to be essential characteristics for efficient gene transfer into cells.³⁴⁻³⁶ Other factors such as endosomal buffering capacity,^{11, 52} an appropriate association and dissociation strength between the DNA and polycations^{10, 53} and the stability of the polyplexes in solution⁵⁴ are also important for efficient gene transfer. In the present study, maximum transfection

efficiency occurs at a particular weight ratio for each PnDMAP-X tested, which may correspond to optimal physicochemical properties for the transfection process. Furthermore, since good transfection efficiencies are obtained from formulations where an excess of polyamphiphile is present, it is likely that uncomplexed segments of PnDMAP-X are implicated in stabilization of the polyplexes and in the endocytosis process.⁵⁵

On the other hand, this work demonstrates that a positive surface charge of polyplexes based on PnDMAP-X is not crucial for high transfection efficiency, as was also observed for carboxylated poly(amidoamine)s^{38, 56, 57} and, to a lesser extent, for functional poly(histidine)s.⁵⁸ Indeed, the only PnDMAP-X of those investigated that competes with PEI as a gene transfer agent, P12DMAP-Br at w/w = 2.5, has a negative surface charge (-21 mV). [In the P16DMAP-S8 series, the w/w ratio giving the highest transfection efficiency also has a negative surface charge (-52 mV).] The P12DMAP-Br-based polyplexes at w/w=2.5 also form stable particles of small size (ca. 45 nm) and with a well-defined morphology. For polyplex-mediated gene transfer, cellular uptake does not appear to be exclusively governed by endocytosis in all cases. For instance, Ferruti and coworkers invoked a pinocytosis mechanism to explain the cell internalization of carboxylated poly(amidoamine)-based polyplexes. In the present case, we hypothesize that the transfection efficiency of the negatively charged polyplexes is explained by the amphiphilic side-chains of the PnDMAP-X that interact directly with the cell membrane,⁵⁵ inducing cell membrane fusion, and mediate the subsequent internalization into the cell.⁵⁹ Such a process would not require a positive ζ -potential, in contrast to absorptive endocytosis.

To rationalize in part why P12DMAP-Br of weight ratio 2.5 is by far the most efficient gene delivery agent of all of the aPP's investigated, reference can be made to previous reports on amphiphilic poly(methacrylate)s,⁶⁰ poly(vinylpyridine)s,⁶¹ and, more recently, poly(ethyleneimine),¹⁷ which demonstrated that interactions between polyplexes and the cell membrane depend on the length of the alkyl side chain. In the case of the PnDMAP-X, the amphiphilic character is modulated by the spacer length and the counterion size. A spacer length of $n = 8$ may be too short to destabilize the cell membrane, whereas a spacer length of $n = 16$ causes major cell membrane disruption that is reflected by the increased cytotoxicity. A polyamphiphile possessing a spacer with 12 CH₂ units may thus represent the optimum length that allows for an appropriate hydrophilic/hydrophobic balance and for

the most efficient non-specific lipophilic interaction with the cell membrane. These remarks appear to be in agreement with the conclusions for hydrophobized (branched) PEI reported by Doody and coworkers.¹⁷

On the other hand, the mediated-polyplex gene transfection process is complex, and incompletely understood even in the best-studied systems. The fact that one example of the present system has a transfection efficiency competitive with that of PEI demonstrates its potential as effective gene transfection agents that merit further study. This is all the more true because their tail-end architecture combining polymer and surfactant character is novel for gene transfection agents. Besides the demonstration of their interest for gene transfection applications, this study has made a beginning in correlating physicochemical and biological characteristics of these particular types of polyplexes. Given the limited number of parameters investigated and the many other parameters that may be varied (in particular, molecular parameters), it may be expected that conditions for still higher transfection efficiencies may be found. In the course of further study, the novel architecture involved may also provide new insights into the transfection process in general.

CONCLUSIONS. This study describes a novel family of amphiphilic “tail-end” polymethacrylates with pyridinium cationic charges that can potentiate efficient gene delivery. Both the spacer length and the nature of the counterion influence the physicochemical characteristics of the polyplexes and their transfection efficiencies. Negatively charged polyplexes are able to transfect cells at a level similar to PEI-based polyplexes and this while being less cytotoxic. This contrasts with the general belief that polyplexes characterized by a high positive ζ -potential are essential for gene transfer. Finally, this family of tail-end polyamphiphiles is of interest not only for its promise as a gene transfection agent, but also because a number of structural parameters can be easily modified [aliphatic spacer length, nature of the counterion, type of pyridinium group^{16, 19, 20}] to both optimize their activity and to study transfection mechanisms. In addition, copolymers could also be envisaged,⁶² including in the form of a mixture of counterions.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by Valorisation Recherche Québec (Gouvernement du Québec, Project Number: 2201-141). We are thankful to D. Montpetit (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe (QC)) for his invaluable help with transmission electron microscopy and N. Robert (Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe (QC)) for his technical contribution to the gel electrophoresis experiments. Discussions with Dr A. Morphesis from Malvern were highly appreciated. PYV thanks Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe (QC) for technical support.

REFERENCES

1. Kabanov, A. V.; Lemieux, P.; Vinogradov, S.; Alakhov, V., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, (2), 223-233.
2. Wagner, E.; Kloeckner, J., *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 192, 135-173.
3. Merdan, T.; Kopecek, J.; Kissel, T., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, (5), 715-758.
4. Mendiratta, S. K.; Quezada, A.; Matar, M.; Wang, J.; Hebel, H. L.; Long, S.; Nordstrom, J. L.; Pericle, F., *Gene Therapy* **1999**, 6, (5), 833-839.
5. Lemieux, P.; Guerin, N.; Paradis, G.; Proulx, R.; Chistyakova, L.; Kabanov, A.; Alakhov, V., *Gene Therapy* **2000**, 7, (11), 986-991.
6. Martin, B.; Sainlos, M.; Aissaoui, A.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P., *Curr. Pharm. Design* **2005**, 11, (3), 375-394.
7. Bell, P. C.; Bergsma, M.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Stuart, M. C. A.; Rowan, A. E.; Feiters, M. C.; Engberts, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (6), 1551-1558.
8. Denoyelle, S.; Polidori, A.; Vuillaume, P. Y.; Brunelle, M.; Laurent, S.; El Azhary, Y.; Pucci, B., *New J. Chem.* **2006**, 1, 629-646.
9. Brunelle, M.; Polidori, A.; Denoyelle, S.; Fabiano, A. S.; Vuillaume, P. Y.; Laurent-Lewandowski, S.; Pucci, B., submitted for publication.
10. Zelikin, A. N.; Trukhanova, E. S.; Putnam, D.; Izumrudov, V. A.; Litmanovich, A. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (45), 13693-13699.
11. Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, (16), 7297-7301.
12. Zelikin, A. N.; Putnam, D.; Shastri, P.; Langer, R.; Izumrudov, V. A., *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13, (3), 548-553.
13. Vuillaume, P. Y.; Brunelle, M.; Van Calsteren, M. R.; Laurent-Lewandowski, S.; Begin, A.; Lewandowski, R.; Talbot, B. G.; ElAzahary, Y., *Biomacromolecules* **2005**, 6, (3), 1769-1781.
14. Thomas, M.; Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 14640-14645.
15. Kabanov, A. V.; Astafyeva, I. V.; Chikindas, M. L.; Rosenblat, G. F.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S.; Kabanov, V. A., *Biopolymers* **1991**, 31, (12), 1437-1443.
16. Kabanov, V. A.; Kabanov, A. V.; Astavieva, I. N., *Polym. Reprints* **1991**, 32, 592-593.

17. Doody, A. M.; Korley, J. N.; Dang, K. P.; Zawaneh, P. N.; Putnam, D., *J. Control. Release* **2006**, 116, (2), 227-237.
18. Brown, M. D.; Schatzlein, A.; Brownlie, A.; Jack, V.; Wang, W.; Tetley, L.; Gray, A. I.; Uchegbu, I. F., *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11, (6), 880-891.
19. Akinc, A.; Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Langer, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (18), 5316-5323.
20. Laschewsky, A., *Adv. Polym. Sci.* **1995**, 124, 1-86.
21. Scarzello, M.; Smisterova, J.; Wagenaar, A.; Stuart, M. C. A.; Hoekstra, D.; Engberts, J.; Hulst, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (29), 10420-10429.
22. Scarzello, M.; Chupin, V.; Wagenaar, A.; Stuart, M. C. A.; Engberts, J.; Hulst, R., *Biophys. J.* **2005**, 88, (3), 2104-2113.
23. Hulst, R.; Muizebelt, I.; Oosting, P.; van der Pol, C.; Wagenaar, A.; Smisterova, J.; Bulten, E.; Driessen, C.; Hoekstra, D.; Engberts, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, (4), 835-849.
24. Pijper, D.; Bulten, E.; Smisterova, J.; Wagenaar, A.; Hoekstra, D.; Engberts, J.; Hulst, R., *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 22, 4406-4412.
25. Roosjen, A.; Smisterova, J.; Driessen, C.; Anders, J. T.; Wagenaar, A.; Hoekstra, D.; Hulst, R.; Engberts, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, (7), 1271-1277.
26. Kuiper, J. M.; Buwalda, R. T.; Hulst, R.; Engberts, J., *Langmuir* **2001**, 17, (17), 5216-5224.
27. Meekel, A. A. P.; Wagenaar, A.; Smisterova, J.; Kroeze, J. E.; Haadsma, P.; Bosgraaf, B.; Stuart, M. C. A.; Brisson, A.; Ruiters, M. H. J.; Hoekstra, D.; Engberts, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, (4), 665-673.
28. Wagenaar, A.; Smisterova, J.; Hoekstra, D.; Engberts, J., *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.* **1999**, 218, U432-U433.
29. Vuillaume, P. Y.; Bazuin, C. G.; Galin, J. C., *Macromolecules* **2000**, 33, (3), 781-790.
30. Vuillaume, P. Y.; Bazuin, C. G., *Macromolecules* **2003**, 36, (17), 6378-6388.
31. Vuillaume, P. Y.; Sallenave, X.; Bazuin, C. G., *Macromolecules* **2006**, 39, (24), 8339-8346.
32. von Schmoluchowsky, M. Z., *Phys. Chem.* **1917**, 92, 129-168.
33. Forsythe, P.; Frampton, R.; Johnson, C. D.; Katritzky, A. R., *J. Chem. Soc., Perkins Trans. 2* **1972**, 2, (5), 671-673.
34. Anderson, D. G.; Akinc, A.; Hossain, N.; Langer, R., *Mol. Ther.* **2005**, 11, (3), 426-434.

35. Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 30, (1-3), 97-113.
36. Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J.; Escande, D., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, (13), 7507-7511.
37. See: Kabanov, A. V.; Felgner, P. L.; Seymour, L. W., *Self-assembling Complexes for Gene Delivery From Laboratory to Clinical Trial*. John Wiley & Sons: New York, 1998 and references therein.
38. Richardson, S. C. W.; Patrick, N. G.; Man, Y. K. S.; Ferruti, P.; Duncan, R., *Biomacromolecules* **2001**, 2, (3), 1023-1028.
39. Kabanov, V. A.; Sergeev, V. G.; Pyshkina, O. A.; Zinchenko, A. A.; Zezin, A. B.; Joosten, J. G. H.; Brackman, J.; Yoshikawa, K., *Macromolecules* **2000**, 33, 9587-9593.
40. Golan, R.; Pietrasanta, L. I.; Hsieh, W.; Hansma, H. G., *Biochemistry* **1999**, 38, (42), 14069-14076.
41. Wittmar, M.; Ellis, J. S.; Morell, F.; Unger, F.; Schumacher, J. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Davies, M. C.; Kissel, T., *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, (6), 1390-1398.
42. Tang, M. X.; Szoka, F. C., *Gene Therapy* **1997**, 4, (8), 823-832.
43. Baeza, I.; Gariglio, P.; Rangel, L. M.; Chavez, P.; Cervantes, L.; Arguello, C.; Wong, C.; Montanez, C., *Biochemistry* **1987**, 26, (20), 6387-6392.
44. Wolfert, M. A.; Dash, P. R.; Nazarova, O.; Oupicky, D.; Seymour, L. W.; Smart, S.; Strohm, J.; Ulbrich, K., *Bioconjug. Chem.* **1999**, 10, (6), 993-1004.
45. Lv, H. T.; Zhang, S. B.; Wang, B.; Cui, S. H.; Yan, J., *J. Control. Release* **2006**, 114, (1), 100-109.
46. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 22, 12349-54.
47. Yaroslavov, A. A.; Sukhishvili, S. A.; Obolsky, O. L.; Yaroslavova, E. G.; Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A., *FEBS Letters* **1996**, 384, (2), 177-180.
48. Fischer, D.; Li, Y. X.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T., *Biomaterials* **2003**, 24, (7), 1121-1131.
49. Ilies, M. A.; Johnson, B. H.; Makori, F.; Miller, A.; Seitz, W. A.; Thompson, E. B.; Balaban, A. T., *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 435, (1), 217-226.
50. van de Wetering, P.; Cherng, J. Y.; Talsma, H.; Hennink, W. E., *J. Control. Release* **1997**, 49, (1), 59-69.
51. van de Wetering, P.; Cherng, J. Y.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., *J. Control. Release* **1998**, 53, (1-3), 145-153.

52. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, (9), 5177-5181.
53. Schaffer, D. V.; Fidelman, N. A.; Dan, N.; Lauffenburger, D. A., *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 67, 598.
54. Luten, J.; Akeroyd, N.; Funhoff, A.; Lok, M. C.; Talsma, H.; Hennink, W. E., *Bioconjug. Chem.* **2006**, 17, (4), 1077-1084.
55. Shen, W. C.; Ryser, H. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, 75, 1872-1876.
56. Ferruti, P.; Manzoni, S.; Richardson, S. C. W.; Duncan, R.; Pattrick, N. G.; Mendichi, R.; Casolaro, M., *Macromolecules* **2000**, 33, (21), 7793-7800.
57. Franchini, J.; Ranucci, E.; Ferruti, P., *Biomacromolecules* **2006**, 7, (4), 1215-1222.
58. Putnam, D.; Zelikin, A. N.; Izumrudov, V. A.; Langer, R., *Biomaterials* **2003**, 24, (24), 4425-4433.
59. Almofti, M. R.; Harashima, H.; Shinohara, Y.; Almofti, A.; Baba, Y.; Kiwada, H., *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 410, (2), 246-253.
60. Kuroda, K.; DeGrado, W. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (12), 4128-4129.
61. Tiller, J. C.; Liao, C.-J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 5981-5985.
62. Vuillaume, P. Y.; Galin, J. C.; Bazuin, C. G., *Macromolecules* **2001**, 34, (4), 859-867.

TOC

ARTICLE V

(Soumis chez Antiviral Research, Automne 2008)

Résumé de l'Article V

Strategies for the improvement of a genetic vaccine against bovine viral diarrhea virus

Parallèlement aux expériences avec les molécules de transport présentées dans les 4 articles précédents, j'ai travaillé sur le prototype de vaccin à ADN contre le BVDV (codant pour la protéine E2 de la souche NADL) développé dans le laboratoire du Dr Elazhary. J'ai apporté plusieurs modifications pour augmenter le pouvoir immunologique du vaccin à ADN. Premièrement, les codons de E2 ont été optimisés à l'espèce bovine grâce à la synthèse chimique. Deuxièmement, une courte séquence riche en résidus hydrophobes située en C-terminal de la glycoprotéine (propice à l'ancrage membranaire) a été retirée et remplacée par le signal de translocation de la protéine Erns des pestivirus. La séquence E2 optimisée a été clonée dans le vecteur pBudCE4.1 sous le promoteur du cytomégalo virus (CMV) [pBud/E2-2] et la séquence E2-2 optimisée contenant la séquence de translocation (Δ E2-2) a été clonée dans le vecteur pBudCE4.1 sous le promoteur EF-1 α [pBud/ Δ E2-2]. Troisièmement, un vecteur d'expression contenant à la fois la séquence optimisée E2 d'une souche du génotype I (E2-1) et la séquence E2 optimisée d'une souche du génotype II (E2-2 ou Δ E2-2) a été construit afin de contrer la forte diversité antigénique des souches du BVDV et générer un spectre de protection plus large contre des souches hétérologues de BVDV [pBudE2-1/E2-2 et pBudE2-1/ Δ E2-2].

J'ai effectué plusieurs expériences (transfection transitoire, immunofluorescence, Western blot) pour caractériser l'expression des séquences modifiées présentes dans les nouveaux vecteurs construits. Pour évaluer le pouvoir immunologique des différentes constructions plasmidiques, une vaccination expérimentale chez la souris a été effectuée. Dans un premier temps, les objectifs étaient : (1) d'évaluer l'effet sur la réponse immunitaire de l'ajout d'une séquence de translocation à la séquence E2-2 optimisée et (2) d'évaluer l'effet sur la réponse immunitaire de l'utilisation de vecteurs plasmidiques contenant les séquences de 2 gènes différents sous des promoteurs différents. Est-ce que la présence d'un second gène influence l'intensité de la réponse E2-2 spécifique? De plus, puisque l'efficacité de transfection *in vitro* des bola(amphiphile)s en présence de sérum était relativement faible (Article III) et l'efficacité de transfection *in vitro* avec les poly(amphiphile)s de type méthacrylate (PAMs) présentée dans l'article IV n'était pas encore connue (les molécules de transports les plus efficaces) lorsque les expériences de

l'article V ont été effectuées, nous n'avons pas inclus de molécules de transport dans ces dernières expériences *in vivo*.

Les résultats *in vivo* indiquent que l'ajout d'une séquence de translocation sur E2-2 induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire. L'utilisation de la séquence Δ E2-2 induit la production d'IgG1 et l'apparition d'anticorps neutralisants dans le sérum des animaux inoculés ainsi que l'induction d'une forte réponse de type Th1, illustrée par une production élevée d'INF- γ . Nous avons aussi démontré que l'inoculation d'un plasmide contenant deux gènes (pBud/E2-1/E2-2 et pBud/E2-1/ Δ E2-2) affecte l'intensité des réponses immunitaires E2-2 spécifiques respectives, comparativement à leurs expressions suite à l'inoculation de pBud/E2-2 ou pBud/ Δ E2-2. La réponse immunitaire induite par l'inoculation d'un vecteur contenant deux gènes est dans les deux cas inférieure à celle induite par leurs homologues ne contenant que le gène E2-2.

En résumé, j'ai effectué toutes les expériences reliées aux résultats présentés dans l'article. De plus, j'ai effectué toutes les expériences reliées à l'inoculation *in vivo* chez la souris et j'ai écrit la totalité de l'article.

Suite à la démonstration de l'immunogénicité de pBud/ Δ E2-2 chez la souris et de la forte efficacité de transfection des polyméthacrylates, nous sommes confiants que des réponses immunitaires contre des complexes PAMS/pBud Δ E2-2 chez le bovin ne pourraient qu'être supérieures puisque l'optimisation des codons a été élaborée en fonction de cette espèce.

Strategies for the improvement of a genetic vaccine against bovine viral diarrhoea virus

Mélanie BRUNELLE^a, Sylvette LAURENT-LEWANDOWSKI^a, Youssef ELAZHARY^a,
and Brian G. TALBOT^{b*}

^a Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Montréal, Faculté de médecine
vétérinaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^b Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Faculté des sciences, 2500 Boulevard
de l'Université, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

(*) Corresponding author:

[REDACTED]
[REDACTED]

Abstract- There is a need to develop a vaccine that can induce protect animals against the two common genotypes of BVDV since available vaccines do not provide complete cross-protection. Previously, our laboratory has reported that a DNA plasmid vaccine encoding the E2 protein from the NADL strain, induced protection in cattle against challenge with homologous BVDV strains. The present study describes strategies designed to improve the efficiency of this prototype vaccine by increasing the extracellular antigen distribution and by including protection against both genotypes. *In vitro* analysis demonstrated that deletion of the E2 transmembrane anchor and the addition of the E^{ms} translocation peptide resulted in secretion of E2 in contrast to the membrane bound unmodified protein. In BALB/c mice, a plasmid encoding the modified E2 sequence induced higher virus-neutralizing antibody titres and increased cytokine production after only three immunizations compared with four for the unmodified plasmid. In addition, the immune potential of the E2 antigen from genotypes I (NADL) and II (890) was evaluated when co-expressed in a single plasmid under the control of independent promoters. The plasmids expressed both type I E2 and type II E2 proteins or the type 1 E2 protein and its type II translocation E2 version. However, these bivalent plasmids induced a lower neutralizing response compared with their monocistronic counterparts.

Keywords: bovine viral diarrhea virus, pestivirus, DNA vaccine, E2 protein, translocation signal

1. Introduction

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is an economically important bovine pathogen associated with significant worldwide economic losses. BVDV has been classified into type I and type II genotypes, both of which have virulent and less virulent strains. It has been established that the envelope E2 glycoprotein is the major protein antigen involved in the induction of neutralizing antibodies and protection against BVDV infection (Donis et al., 1987; Grigera et al., 2000). At present, commercially available BVDV vaccines do not induce effective cross-protection. Ideally in North America, a BVDV vaccine should protect against both genotypes. Attempts have been made to overcome the drawbacks of the traditional BVDV vaccines by using recombinant E2 protein (Wang et al., 2004), E2-expressed live virus vectors (Elahi et al., 1999a; Elahi et al., 1999b; Baxi et al., 2000; Reddy et al., 1999), or E2 encoded in DNA plasmids (Liang et al., 2005; Nobiron et al., 2003; Nobiron et al., 2001). There is particular interest in DNA vaccines for the induction of a protective response against BVDV since they can induce both antibody and cellular responses, which appear to be necessary for the most effective protection (Donnelly et al., 1997; Robinson et al., 1993; Xiang et al., 1994). Our laboratory has demonstrated partial to complete protection against BVDV after immunization with a plasmid encoding the E2 gene from the NADL strain (genotype I) and homologous challenge of cattle (Harpin et al., 1999). However, current BVDV DNA vaccination strategies need improvement because cross-protection remains very poor and multiple immunizations of high doses of DNA are required to achieve effective protection (Nobiron et al., 2001; Cox et al., 1993; Schrijver et al., 1997; Young et al., 2005).

Several studies have indicated that the C-terminus of the BVDV E2 protein includes 30 hydrophobic amino acids responsible for a transmembrane anchor. Thus, the E2 glycoprotein remains cell-associated in virus-infected cells. This may reduce the efficiency of presentation of the protein to the immune system. To improve the presentation, we constructed a plasmid encoding a translocated form of E2-2. The addition of a short amino acid sequence (called the translocation signal) to the sequence of a protein is a strategy used in the design of DNA vaccines to direct the encoded protein into the cytosol of non-transfected neighbouring cells (Michel et al., 2002; Hung et al., 2001; Zheng et al., 2006;). Intercellular spreading of *de novo* synthesized antigen increases the availability, capture and

presentation of the antigen by professional presenting cells and results in the enhancement of the immunogenicity of DNA vaccines (Oliveira et al., 2001). Such signals have been reported to dramatically improve the seroneutralization titre (Vives et al., 2003; Brooks et al., 2005), the induction of Th1 responses, and the activation of CD8⁺ and IFN- γ production associated with antiviral protection (Oliveira et al., 2001).

A further challenge to vaccine design is that BVD viruses exhibit considerable strain heterogeneity which is expressed as differences in their phenotypes, biotypes (Gillespie et al., 1960), degree of virulence (Liebler-Tenorio et al., 2003) and genotypes (Ridpath et al., 1994; Ridpath et al., 1998; Fulton et al., 2006; Pellerin et al., 1994). Although there is some cross-reactivity between BVDV type 1 and type II strains, BVDV1 vaccine strains confer poor protection against type 2 virus (Ridpath JF., 2005). In an effort to widen the spectrum of protection of our DNA prototype vaccine, plasmids were designed which encoded both the E2 sequence from the NADL strain (genotype I) and the original E2 or the translocated version of E2 gene sequence from the 890 strain (genotype II) The efficiency of these constructions were evaluated in a mouse model.

2. Materials and methods

2.1. E2 gene. The DNA sequences of nucleotides 2414 to 3724 from the E2 genes of genotype I [strain NADL] (E2-1) and the sequence 2418 to 3718 from genotype II [strain 890] (E2-2) were chemically synthesized by GeneArt GmbH (Regensburg, Germany).

2.2. Construction, expression of plasmids and purification. Table I shows schematic diagrams of the pBudCE4.1 backbone vector (GIBCO Invitrogen Corporation, Burlington (ON), Canada) containing different E2 protein expression cassettes. The E2-1 gene was placed under the control of the human elongation factor 1-alpha promoter (EF-1 α) between NotI/KpnI sites to create pBud/E2-1 (5910 bp). The E2-2 gene was inserted under the control of the promoter from the cytomegalovirus (CMV) between HindIII/BamHI, to create pBud/E2-2 (5869 bp). To generate a translocating form of E2-2 protein (Δ E2-2), the hydrophobic residues responsible for the membrane anchor were removed using the PstI site and a synthetic sequence encoding the E^{ms} translocating signal from the NADL virus (Langedijk J., 2002) was inserted into the E2-2 gene sequence to replace the last 193 E2-2 C-terminal nucleotides (3525 to 3718 inclusive). This plasmid was designated as pBud/ Δ E2-2 (5713 bp). For the creation of the dicistronic plasmid, genes were cloned in pBudCE4.1 under independent promoters for independent expression. For the creation of pBud/E2-1/E2-2 (7184 bp), the resulting E2-1 fragment (1332-bp) from NotI and KpnI digestion (1332-bp) was cloned under the control of the EF-1 α promoter into pBud/E2-2 previously digested with NotI and KpnI. To create pBud/E2-1/ Δ E2-2 (7028 bp), the resulting E2-1 fragment was cloned under the EF-1 α promoter into the pBud/ Δ E2-2 vector previously digested with NotI and KpnI. All plasmid sequences were first verified by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis. They were then sequenced to confirm the accuracy of the cloning. The plasmids used for immunization were amplified using the transformation of One Shot TOP10 chemically competent E. coli. The plasmid was isolated and purified using endotoxin-free plasmid Giga kits (QIAGEN, Mississauga (ON), Canada). Plasmids were suspended (final concentration 1mg/mL) in endotoxin-free Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, Oakville (ON), Canada).

2.3. Cells and viruses. The cells and sera used in these experiments were all confirmed to be free of BVDV antigen and antibody by ELISA and immunofluorescence analysis. Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK, American Type Culture Collection (ATCC), Valencia (CA), USA) were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM, GIBCO

Invitrogen Corporation) supplemented with 2.2 g/L of sodium bicarbonate, 1% gentamycin (Sigma-Aldrich) and 10% foetal bovine serum (FBS, Medicorp, Montreal (QC), Canada). African green monkey simian virus 40-transformed kidney cells (COS7, ATCC) were grown in Dulbecco's MEM (DMEM, GIBCO Invitrogen Corporation) supplemented with 10% FBS and 1% gentamycin. Cells were incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. BVDV type I strain NADL (ATCC) and type II strain 890 (ATCC) were propagated in MDBK cells. Viruses were stored at – 80 °C until use.

2.4. Transfection of COS7. To verify the *in vitro* transfection efficiency and the expression of E2-1, E2-2 and ΔE2-2 proteins, COS7 cells were transiently transfected with the corresponding constructs using Lipofectamine™ 2000 Reagent (GIBCO Invitrogen Corporation) as specified by the manufacturer. Briefly, cells were grown to 90% confluence using complete DMEM medium in Labteck II chamber slides (VWR International Ltd., Mississauga (ON), Canada) for immunofluorescence staining or in 6-well tissue culture plates (Fisher Scientific, Montreal (QC), Canada) for Western blot analysis. Before the initiation of transfection, medium was removed from each well, cells were washed twice with PBS and 1 mL of fresh OPTI-MEM (GIBCO Invitrogen Corporation) was added. Cells were immediately treated with a Lipofectamine™ 2000 Reagent-DNA solution and further incubated for 4 h, after which the transfection mixture was replaced with fresh complete DMEM medium for 20 hrs and 44 hrs.

2.5. Immunofluorescence staining. Transient transfection experiments were carried out as described, with 250 µL of Lipofectamine™ 2000 Reagent-DNA transfection solution (2.5 µg of DNA per well). Transfected cells were washed with PBS and fixed in a bath of ice-cold 80% (v/v) acetone and 20% (v/v) H₂O for 20 min. Cells were completely air-dried and rehydrated in PBS, and thereafter the cells were incubated for 30 min at 37 °C with monoclonal E2-1 or E2-2 specific antibody (diluted 1:100 in PBS-Tween 0.05% (PBS-T2)) provided by Dirk Deregt (Canadian Food Inspection Agency, Virology section, Lethbridge Laboratory (Animal Diseases Research Institute), P.O. Box 640, Lethbridge, Alberta T1J 3Z4, Canada) (Deregt et al., 1998). Cells were washed with PBS and 0.3 mL of anti-mouse IgG (H+L)/FITC conjugate (diluted 1:45 in PBS-T2) was added (ICN Biomedicals Inc.). Cells were then incubated for 30 min at 37 °C and washed with PBS-Tween 0.1% (PBS-T1) and with water before analysis with a fluorescence microscope.

2.6. Western blot. Transient transfection experiments were carried out as described using 500 μ L of Lipofectamine™ 2000 Reagent-DNA solution (5 μ g of DNA per well). Cell lysates and supernatants were collected separately after transfection. Supernatants from each well were individually concentrated 20 times using an Amicon Ultra 30 000 filter (Millipore, Nepean (ON), Canada). Cell lysates and supernatants were boiled at 72 °C in SDS-PAGE sample buffer in the absence of 2-mercaptoethanol (non-reducing conditions) for 10 min and separated on a 4-12% NuPAGE® Novex Bis-Tris-polyacrylamide gels in the presence of NuPAGE® MES running buffer (all materials for electrophoresis were purchased from Invitrogen, Burlington, Canada). The proteins were then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé (QC), Canada). The membrane was washed in PBS-T1 and incubated for 1 h with PBS-T1 containing 10% blocking solution (Roche Diagnostics GmbH). Subsequently, the membrane was incubated with anti-BVDV polyclonal bovine serum (from Dr Elazhary, University of Montreal) for 1 h at room temperature (RT). The membrane was washed twice in PBS-T1 and incubated with rabbit anti-bovine IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (HRP, ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa (CA), USA) at a dilution of 1:1000 for 1 h at RT. The bound antibodies were visualized on a Kodak Image Station 440 CF (Mandel Scientific Company Inc., Guelph (ON), Canada) using chemiluminescence blotting substrate (Roche Diagnostics GmbH).

2.7. Immunization of mice. Procedures involving animals were approved by the University of Sherbrooke's committee on the ethical use of animals in research and adhered to the Canadian Council on Animal Care guidelines. Female BALB/c (H-2^d) mice aged 6 to 8 weeks (Charles River Laboratories, Wilmington (MA), USA) were used for immunization experiments. Twenty-five mice were randomly allocated to five groups of five mice each. Mice were inoculated intramuscularly (i.m.) three times at 2 week intervals and a fourth inoculation was performed 14 weeks after the third inoculation (or 20 weeks following the first one). Equimolar amounts (25.2 pmol) of the E2 gene diluted in a total of 100 μ L of sterile endotoxin-free PBS were injected. In total, 25.2 pmol of the E2 gene was present in 100 μ g of plasmid pBud/E2-2, 95 μ g of pBud/ Δ E2-2, 119 μ g of plasmid pBud/E2-1/E2-2, and 116 μ g of pBud/E2-1/ Δ E2-2. The control group was injected with 100 μ g of pBudCE4.1. Mice received 50 μ L of DNA solution into each anterior tibialis muscle. Blood samples were individually collected from the saphen vein one week before the first

inoculation (pre-immune serum) and one week after each DNA inoculation. Finally, mice were euthanized 1 week after the fourth immunization to recover the spleen for analysis.

2.8. Detection of antibody responses.

2.8.1 Virus neutralization assay. Virus neutralization (VN) assays were conducted with heat-inactivated, individually collected sera (30 min at 56 °C). One hundred TCID₅₀ of BVD virus (890) was pre-incubated with two-fold dilutions of serum (starting at 1:8) at 37 °C for 1 h. The mixture (100 µL) was then added to duplicate wells of 96-well microtitre plates containing 80–90% confluent MDBK cells for 1 h at 37 °C, and then 100 µL of MEM containing 2% FBS was added to each well. Plates were incubated at 37 °C for 4 days. The VN titre was measured using an immunoperoxidase assay. Briefly, all washing steps were performed with PBS-Tween 0.05% (PBS-T2). Cell monolayers were washed, fixed for 10 min with cold acetone solution (20%, v/v), dried at 30 °C for 3 h and frozen at -20 °C for 24 h. The freezing step was followed by a PBS hydration, after which cells were incubated for 15 min at 30 °C with 50 µL of polyvalent anti-BVDV serum diluted in PBS-T2 (1:50). Plates were washed three times, and dried at RT. For the detection of bound BVDV-specific antibodies, 50 µL of rabbit anti-bovine IgG (H+L)-HRP conjugate diluted 1 with:200 in 0.5 M NaCl and 0.5% Tween buffer (pH 7.4) was added to each well and incubated for 15 min at 30 °C. Plates were washed three times. At this time 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma-Aldrich) and hydrogen peroxide in acetate buffer (pH 5) were added. After 10 min incubation, the plates were washed and examined. Results are expressed as the reciprocal of the serum dilution at which complete VN occurred.

2.8.2. Detection of E2-specific IgG antibodies: Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). For detection of E2-specific IgG antibodies, purified recombinant E2 genotype I protein was added at 100 µL per well (2.4 µg/mL) in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) in Enhanced Binding, 96-well plates (VWR International Ltd) and incubated overnight at 4 °C. Plates were then blocked with 200 µL of 0.5% casein/PBS-T2 solution for 3 days at 4 °C. Thereafter, 100 µL of the inactivated mouse sera (1:200) was added, plates were incubated for 1 h at RT and then washed three times, followed by addition of 100 µL of goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate diluted 1:10 000 (Bio-Rad, Hercules (CA), USA) and by incubation for 1 h at RT. “Sure Blue TMB” Tetramethylbenzidine microwell peroxidase substrate (TMB 1-component, KPL, Gaithersburg (MD), USA) was added to

develop the colour. TMB stop solution was added as recommended by the manufacturer. The optical density (OD) was read at 450 nm using a Spectra Max 340 PC plate reader (Molecular Device, Sunnyvale (CA), USA). Sera were considered positive when the OD₄₅₀ for each sample, after the subtraction of the background, was higher than the mean OD₄₅₀ value obtained from the control group plus two times the standard deviation.

2.8.3. E2 specific IgG1 and IgG2a antibody measurements. Murine IgG1 and IgG2a E2 antigen-specific antibody concentrations were measured using commercial mouse IgG1 and IgG2a ELISA quantification kits in accordance with the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories Inc, Texas, USA). Maxi Sorp 96-well plates (VWR International Ltd) were coated with 100 µL of affinity purified goat anti-mouse IgG1 or IgG2a at a final concentration of 10 µg/mL diluted in 0.05 M sodium bicarbonate (pH 9.6) and incubated for 24 h at 4 °C. For serum analysis, plates were incubated with 2.4 µg/mL of E2-1 protein. After washing, plates were then incubated with blocking buffer (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0) for 1 h at RT. Purified reference mouse serum was diluted in sample diluent (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0) at varying concentrations to generate the standard curve (7.8 to 1000 ng/mL). Different dilutions of mouse serum samples (ranging from 1:200 to 1:600 to ensure that one value would fall within the range of the standard curve) were added and incubated for 1 h at RT. Goat anti-mouse IgG1 and IgG2a horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies diluted 1:75 000 and 1:5000, respectively, were added and incubated for 1 h at RT. Antibody detection was completed with the addition of TMB substrate followed by the addition of "stop" solution. The absorbance of each well was measured at 450 nm using a Spectra Max 340 PC plate reader. Specific IgG isotype concentration (ng/mL) was determined using the standard curve.

2.9. Preparation and stimulation of mice splenocytes. Mice were euthanized 1 week following the final DNA injection. Spleens were aseptically collected, and individual cell suspensions were prepared by extraction between two sterile microscope slides. RPMI medium (GIBCO Invitrogen Corporation) containing the cell extract was centrifuged at 200 ×g for 10 min and the cells were washed in PBS. Red blood cells were lysed using Tris-buffered NH₄Cl buffer for 1 min 30 sec at RT. After centrifugation, lysis buffer was completely removed and splenocytes were rinsed and resuspended in complete RPMI 1640 culture medium containing 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1mM sodium

pyruvate, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 30 μ M indomethacin (GIBCO Invitrogen Corporation) and 50 μ g/mL gentamycin. For detection of the production of specific cytokines and the measurement of splenocyte proliferation, cells were seeded in 96-well microtitre flat-bottom plates at 2.0×10^5 cells/well and 1.0×10^6 cells/well, respectively. Splenocytes were incubated for 72 h at 37 °C with 5% CO₂ in triplicate either in the presence of medium only (negative control), 2.5 μ g/mL of concanavaline A (ConA) (positive control), or 890 BVDV virus at final dilutions of 1:10, 1:20 and 1:80. The titres of the original strain 890 viruses were $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL. Results for the 1:20 dilution are reported here.

2.9.1. Antigen-specific cytokine induction. The concentrations of IFN- γ and IL-2, two key regulators of Th1 differentiation, and IL-4, a key regulator of Th2 differentiation, were measured in the supernatants of splenocytes restimulated *in vitro*. Supernatants were individually harvested, quick frozen and conserved at -80 °C until analysis. Cytokine concentration (pg/mL) was measured using the Quantikine Mouse Immunoassay kit according to the manufacturer's instructions (R&D System Inc., MN, USA).

2.9.2. Antigen-specific cell proliferation response. After *in vitro* specific stimulation, the chromogen 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenylpyrazolium bromide (MTT, Roche Diagnostics GmbH) was added to each well at a final concentration of 0.5 mg/mL and plates were incubated for 4 h at 37 °C. The plates were centrifuged, the supernatant was gently removed and the purple insoluble salt formed by metabolically active cells was completely dissolved with 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). The OD was measured at 562 nm using a Spectra Max 340 PC plate reader. The stimulation index (SI) was calculated using the following formula: SI = mean OD of mitogen or antigen stimulated proliferation/mean OD of non-stimulated proliferation.

2.10. Statistical analysis. To compare the median values of the different groups, the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by post-hoc pair-wise comparisons and SAS version 9.2 (Cary, N.C.) were used. The level of significance was set at 0.05.

3. Results

3.1. *In vitro* E2 expression. Firstly, the expression and localization of the full-length or translocating E2-2 proteins were analysed by electrophoresis followed by Western blotting after *in vitro* transient transfection of COS7 cells with pBud/E2-2 or pBud/ Δ E2-2. As shown in Fig. 1, E2-2 protein remained mainly associated with the cell whereas deletion of the C-terminal transmembrane anchor and addition of the translocation signal sequence of the BVDV E^{ms} protein resulted in an efficient secretion of the protein into the culture medium. At 48 h post-transfection, ~90% of the Δ E2-2 protein was found in the supernatant compared with ~30% for cells transfected with the original E2-2 sequence. Since electrophoresis was performed in non-reducing conditions, it appears that the disulfide-linked glycosylated homodimeric form (~120 kDa) and the monomeric glycosylated form (~60 kDa) of E2-2 were observed in both cell lysate and supernatant. Secondly, expression of plasmids encoding the original E2 sequence of strain NADL (genotype I; E2-1) and the E2 sequence of strain 890 (genotype II; E2-2) under independent promoters using the expression vector pBudCE4.1 (pBud/E2-1/E2-2) were analysed by electrophoresis followed by Western blotting after *in vitro* transient transfection of COS7 cells. Immunofluorescence analysis of *in vitro* transfected COS7 cells with the E2-1/E2-2 plasmid demonstrated that the transfection efficiency (25% of cells were positive for E2-2 and 29% for E2-1) and the expression levels of E2-1 and E2-2 were nearly equivalent (data not shown).

3.2. The impact of the cellular localization of E2-2 antigen on the immune response induced in mice. The impact of the translocation capacity of Δ E2-2 on humoral and cellular immune responses was analysed by comparison of the immune responses following i.m. immunization with pBud/ Δ E2-2 or with pBud/E2-2 using pBudCE4.1 as control.

3.2.1. Serological parameters. Significantly higher E2-specific IgG antibodies titres (Fig. 2.) and IgG2a isotype antibodies titres (data not shown) were observed in mice inoculated with pBud/ Δ E2-2 compared with those inoculated with pBud/E2-2 ($p=0.004$ and $p=0.009$, respectively). Table II shows the VN titres of the 890 strain using sera from mice immunized with pBud/ Δ E2-2, pBud/E2-2 or the pBudCE4.1 control. Higher neutralizing antibody titres were reported in sera of mice inoculated with the pBud/ Δ E2-2. Moreover, the results clearly showed that the rate of production of neutralizing antibodies was

accelerated with the use of pBud/ Δ E2-2. Measurable VN antibodies were detectable after the third inoculation rather than after the fourth inoculation as observed with the plasmid encoding the original sequence of E2-2. The plasmid encoding the translocated form of E2 appears to be superior in inducing antibody responses in mice compared with the plasmid encoding the full-length E2 protein.

3.2.2. Cellular immune responses. To evaluate E2-2-specific cellular immune responses, cytokine production (IL-2, IFN- γ and IL-4) and proliferative responses of *in vitro* splenocytes restimulated by the strain 890 virus were measured. Fig. 3 shows IL-2 cytokine production by mice injected with pBud/ Δ E2-2, pBud/E2-2 and pBudCE4.1 (as control). Mice inoculated with pBud/ Δ E2-2 demonstrated significantly higher levels of IL-2 production than the pBud/E2-2 inoculated mice ($p=0.009$). IL-4 production was very low in both groups. High inter-animal variability of IFN- γ production masked any significant differences between the pBud/ Δ E2-2 and pBud/E2-2 groups (data not shown). Significantly higher spleen cell proliferative responses were observed in mice inoculated with Δ E2-2 plasmid compared with those inoculated with E2-2 plasmid (data not shown).

3.3. Immunological impact of the DNA vector encoding BVDV genotype I and II E2 proteins in mice.

3.3.1. Serological parameters. Both plasmids (pBud/E2-1/ Δ E2-2, pBud/E2-1/E2-2) induced detectable specific IgG antibodies after the third immunization but there were no significant differences between the two groups (data not shown). This initial result indicated that the translocating property of Δ E2-2 did not improve the IgG antibody response when encoding within a two-gene expression construct. The comparison of the IgG induction by the E2-1/E2-2 constructs with their E2-2 monogenic plasmids homologues indicated that E2-2 or Δ E2-2 in monogenic constructs induced significantly higher IgG responses ($p=0.004$).

Table II shows the neutralization titres induced by strain 890 virus in mice injected with the pBud/E2-1/ Δ E2-2, pBud/E2-1/E2-2, pBud/E2-2, pBud/ Δ E2-2 or pBudCE4.1 following the third and fourth plasmid injections. Analysis of the VN titres indicated that both dicistronic constructs induced measurable VN titres after the fourth immunization whether or not they

contained the translocating or full-length E2-2 version of E2. The presence of Δ E2-2 in the dicistronic plasmid had no effect on the induction of 890-specific neutralization antibodies. VN 890-specific neutralization antibody titres induced by the Δ E2-2 dicistronic plasmid were not significantly different from those induced by the full-length E2-2 dicistronic construct. This differs from the effect of Δ E2-2 on VN antibodies compared with full-length E2-2 monocistronic constructs and indicated that the expression of Δ E2-2 by a dicistronic construct reduced its immune potency. Secondly, when comparing the immune response induced by the E2-1/E2-2 constructs to that induced by the monocistronic plasmid, the expression of Δ E2-2 within a dicistronic construct seemed to delay the appearance of measurable VN titres from the third to the fourth inoculation.

3.3.2. Cellular immune responses. Both groups of mice inoculated with the dicistronic plasmids produced IFN- γ and IL-2 and demonstrated antigen-specific proliferative responses, although there were no significant differences between the groups. The replacement of E2-2 by Δ E2-2 in the dicistronic plasmid had no significant impact on proliferative responses and cytokine production (data not shown). Moreover, IFN- γ induction by the Δ E2-2 contained in the dicistronic plasmid was significantly lower compared with the E2-2 dicistronic construct ($p=0.005$) (data not shown). This result is in contrast to the increase in IFN- γ production induced by immunization with the Δ E2-2 monocistronic construct compared with the E2-2 monocistronic plasmid. As was found for the antibody results, both dicistronic constructs induced lower cellular immune responses compared with their monocistronic plasmids homologues when used as DNA vaccines in mice.

4. Discussion

In a previous study of BVDV DNA vaccines, our laboratory demonstrated that intramuscular injection of plasmids encoding the E2 protein from a genotype I strain (NADL) induced both humoral and cellular immune responses which provided partial protection in cattle against homologous challenge infection (Harpin et al., 1999). This DNA immunization study also revealed that a relatively large quantity of DNA was necessary (3 mg) to induce protection in cattle and that the use of an E2 sequence from a genotype I strain was not sufficient to induce effective cross-protection against genotype II strains. This highlights the significant problem associated with the development of an efficient vaccine against BVDV, which is the pronounced antigenic variability of the glycoprotein E2, the principal antigen responsible for immunity against the two major genotypes (I and II). Given the appearance of the severe acute form of genotype II BVDV in North America and its increasing prevalence, there is an urgent need to find an inexpensive but effective BVDV vaccine that can protect against both BVDV genotypes.

The present study describes strategies designed to improve the immune effectiveness of the DNA vaccine previously developed in our laboratory, with a focus on reducing the total amount of DNA and the number of inoculations necessary to protect cattle against BVDV. The first strategy targeted the anchoring of E2 which binds the protein to the viral envelope and makes the antigen less available for immune presentation. The hydrophobic amino acids present in the C-terminus of E2 are responsible for the transmembrane anchor (Liang et al., 2005) and were deleted. The translocation signal of the E^{ms} BVDV gene was added. To our knowledge, this is the first time that the use of E^{ms} translocation signal has been reported in the design of a DNA vaccine. We presumed that the intercellular trafficking property of the E^{ms} translocating signal would increase antigen capture and presentation, thus improving the distribution to neighbouring cells. The results demonstrated that, as expected, the truncation of E2 and the addition of E^{ms} sequence caused the E2 homodimer and heterodimer to be found in the cell cytosol and cell culture supernatant. Modifications to the E2 sequence did not affect the dimerization and glycosylation of the E2 proteins. This observation is important since the original viral E2 proteins contain intramolecular and

intermolecular disulfide bonds crucial for the folding and stability of the E2 glycoprotein in its native forms (Rumenapf et al., 1993; Branza-Nichita et al., 2002).

These changes were associated with a higher immune response to the E2 protein of the Δ E2-2 plasmid compared with that from the full-length gene. Importantly, there was a much earlier response to the modified protein than to the full length gene. If these results are carried over to the bovine model, they will result in a considerable improvement in the efficiency of the vaccine.

However, to produce an effective BVDV vaccine able to protect against prevalent strains of BVDV I and II genotypes, a combination of antigens represents a better vaccine strategy. As cross-protection induced by a BVDV I vaccine induces poor protection against BVDV II strains, BVDV E2 sequences from the NADL (genotype I) and the 890 strains (genotype II) were chemically synthesized and cloned into a single plasmid (pBudCE4.1) under the independent control of the human EF-1 alpha promoter and the viral CMV promoter, respectively. The present study is only the second report of the use of a prevalent BVDV type II strain (890) encoding E2 antigen in the development of a DNA vaccine (Nobiron et al., 2001). The results of the immunization showed that both the Δ E2-2 gene and the full-length E2-2 gene cloned into plasmids that also expressed E2-1 did not induce as strong an E2-2 specific response as their monocistronic counterparts. This lower immune response induced by dicistronic plasmids may be explained by lower gene expression of the E2-2 protein or perhaps by a transcriptional competition between the two E2 antigens cloned under different promoters within the same plasmid in the same cell. Similarly, there could have been competition in the development of specific immune responses against two antigens delivered simultaneously to the same microenvironment. Moreover, there may have been an immune incompatibility between the two E2 antigens encoded in the dicistronic constructs as suggested by Braun et al. who effectively demonstrated the existence of immune incompatibility between plasmids in mixtures compared with the immune responses to the individual plasmid (Braun et al., 1998). The co-administration of plasmids encoding Bovine Herpes Virus-1 gD, parainfluenzavirus-3 HN and influenza virus HA indicated interference of the gD plasmid with both HN and HA plasmids, whereas there was no interference between HN and HA plasmids.

In conclusion, this study demonstrated that deletion of the sequence responsible for the transmembrane anchor of BVDV E2 glycoprotein and addition of a BVDV E^{ms} translocation signal induced stronger immune responses in mice compared with the original full-length E2 sequence. The Δ E2-2 monocistronic construct also elicited earlier virus-neutralizing and cellular immune responses compared with the original plasmid encoding the full-length E2 protein. The results also suggest that the BVDV E^{ms} translocation signal could be used as an alternative to TAT or VP22 sequences for enhancing the immunogenicity of DNA vaccines. Finally, the use of constructs encoding E2 proteins from both BVDV genotypes needs further study since they were not as efficient immunogens as their monocistronic counterparts.

Acknowledgements. We thank Dr Phuong Lan Pham and Hans-Erik Beausoleil, for providing the recombinant E2-1 protein at the Laboratoire de Biotechnologies Vétérinaires et Alimentaires (LBVA),; Caroline Bergeron from the University of Sherbrooke for her technical assistance during mouse DNA injection and sera collection; and Guy Beauchamp from the University of Montreal for all statistical analyses. This work was supported by Valorisation Recherche Québec (VRQ) (Gouvernement du Québec, project number: 2201-141).

References

- Baxi, M. K.; Deregt, D.; Robertson, J.; Babiuk, L. A.; Schlapp, T.; Tikoo, S. K., Recombinant bovine adenovirus type 3 expressing bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2 induces an immune response in cotton rats. *Virology* 2000, 278, (1), 234-243.
- Branza-Nichita, N.; Lazar, C.; Durantel, D.; Dwek, R. A.; Zitzmann, N., Role of disulfide bond formation in the folding and assembly of the envelope glycoproteins of a pestivirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 296, (2), 470-476.
- Braun R, B. L., van Drunen Little-van den H Compatibility of plasmids expressing different antigens in a single DNA vaccine formulation. *J.Gen Virol* 1998, 79, 2965-2970.
- Brooks, H.; Lebleu, B.; Vives, E., Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005, 57, (4), 559-577.
- Cox, G. J. M.; Zamb, T. J.; Babiuk, L. A., Bovine Herpesvirus-1 - Immune-Responses in Mice and Cattle Injected with Plasmid DNA. *Journal of Virology* 1993, 67, (9), 5664-5667.
- Deregt, D.; Bolin, S. R.; van den Hurk, J.; Ridpath, J. F.; Gilbert, S. A., Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus Research* 1998, 53, (1), 81-90.
- Donnelly, J. J.; Ulmer, J. B.; Shiver, J. W.; Liu, M. A., DNA vaccines. *Annual Review of Immunology* 1997, 15, 617-648.
- Donis, R. O.; Dubovi, E. J., Molecular Specificity of the Antibody-Responses of Cattle Naturally and Experimentally Infected with Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Biotypes. *American Journal of Veterinary Research* 1987, 48, (11), 1549-1554.

Elahi, S. M.; Shen, S. H.; Talbot, B. G.; Massie, B.; Harpin, S.; Elazhary, Y., Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* 1999, 261, (1), 1-7.

Elahi, S. M.; Shen, S. H.; Talbot, B. G.; Massie, B.; Harpin, S.; Elazhary, Y., Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of bovine viral diarrhoea virus induce humoral and cellular immune responses. *Fems Microbiology Letters* 1999, 177, (1), 159-166.

Fulton, R. W.; Hessman, B.; Johnson, B. J.; Ridpath, J. F.; Saliki, J. T.; Burge, L. J.; Sjeklocha, D.; Confer, A. W.; Funk, R. A., Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 2006, 228, (4), 578-584

Gillespie, J., Baker, JA, McEntee, K, A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 1960 50, 73-79.

Grigera, P. R.; Marzocca, M. P.; Capozzo, A. V. E.; Buonocore, L.; Donis, R. O.; Rose, J. K., Presence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice. *Virus Research* 2000, 69, (1), 3-15.

Harpin, S.; Hurley, D. J.; Mbikay, M.; Talbot, B.; Elazhary, Y., Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *Journal of General Virology* 1999, 80, 3137-3144.

Hung, C. F.; He, L. M.; Juang, J.; Lin, T. J.; Ling, M.; Wu, T. C., Improving DNA vaccine potency by linking Marck's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *Journal of Virology* 2002, 76, (6), 2676-2682.

Hung, C. F.; Cheng, W. F.; Chai, C. Y.; Hsu, K. F.; He, L. M.; Ling, M.; Wu, T. C., Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *Journal of Immunology* 2001, 166, (9), 5733-5740.

Langedijk, J., Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem* 2002, 277, 5308-14.

Liang, R.; van den Hurk, J. V.; Zheng, C. F.; Yu, H.; Pontarollo, R. A.; Babiuk, L. A.; Littel-van den Hurk, S. V., Immunization with plasmid DNA encoding a truncated, secreted form of the bovine viral diarrhea virus E2 protein elicits strong humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 2005, 23, (45), 5252-5262.

Liebler-Tenorio, E. M.; Ridpath, J. F.; Nei, J. D., Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 2003, 31, (2), 119-122.

Michel, N.; Osen, W.; Gissmann, L.; Schumacher, T. N. M.; Zentgraf, H.; Muller, M., Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* 2002, 294, (1), 47-59.

Nobiron, I.; Thompson, I.; Brownlie, J.; Collins, M. E., DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine* 2003, 21, (17-18), 2082-2092.

Nobiron, I.; Thompson, I.; Brownlie, J.; Collins, M. E., Cytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine* 2001, 19, (30), 4226-4235.

Oliveira, S. C.; Harms, J. S.; Afonso, R. R.; Splitter, G. A., A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion. *Human Gene Therapy* 2001, 12, (10), 1353-1359.

Pellerin, C.; Vandenhurk, J.; Lecomte, J.; Tijssen, P., Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus-Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virology* 1994, 203, (2), 260-268.

Reddy, J. R.; Kwang, J.; Varthakavi, V.; Lechtenberg, K. F.; Minocha, H. C., Semiliki forest virus vector carrying the bovine viral diarrhea virus NS3 (p80) cDNA induced immune responses in mice and expressed BVDV protein in mammalian cells. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 1999, 22, (4), 231-246.

Ridpath, J. F.; Bolin, S. R.; Dubovi, E. J., Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology* 1994, 205, (1), 66-74.

Ridpath, J. F.; Bolin, S. R., Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 1998, 12, (2), 101-106.

Ridpath, J., Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med.* 2005 72, 17-30.

Robinson, H. L.; Fynan, E. F.; Webster, R. G., Use of Direct DNA Inoculations to Elicit Protective Immune-Responses. *Journal of Cellular Biochemistry* 1993, 85-85.

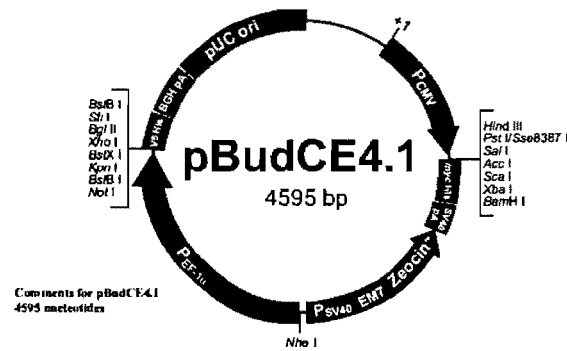
Rumenapf, T.; Unger, G.; Strauss, J. H.; Thiel, H. J., Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *Journal of Virology* 1993, 67, (6), 3288-3294.

Schrijver, R. S.; Langedijk, J. P. M.; Keil, G. M.; Middel, W. G. J.; MarisVeldhuis, M.; VanOirschot, J. T.; Rijsewijk, F. A. M., Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine* 1997, 15, (17-18), 1908-1916.

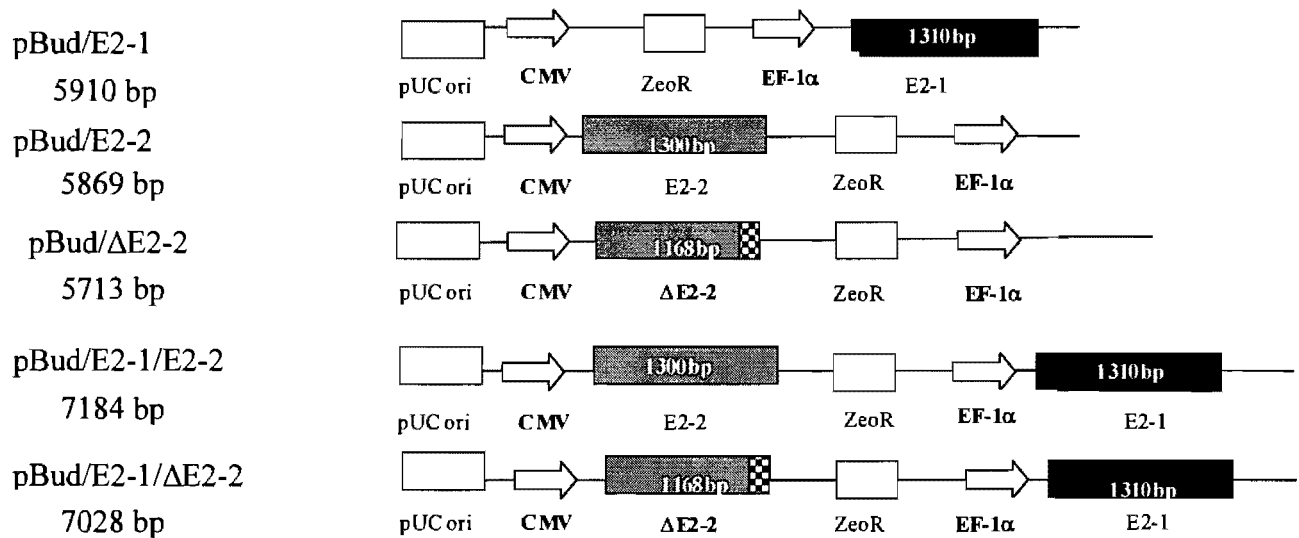
Vives, E.; Richard, J. P.; Rispal, C.; Lebleu, B., TAT peptide internalization: Seeking the mechanism of entry. *Current Protein & Peptide Science* 2003, 4, (2), 125-132.

Table I. pBudCE4.1 backbone vector (a), representation of the different E2 protein expression cassettes (b), and construction of the Δ E2-2 gene sequence (c).

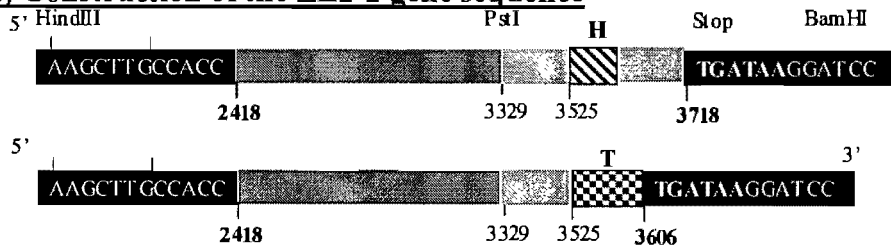
(a) pBudCE4.1 backbone vector



(b) Representation of the different E2 protein expression cassettes



(c) Construction of the Δ E2-2 gene sequence



H: Hydrophobic zone responsible of the membrane anchor and T: E^{ms} translocating signal

Table II: Virus-neutralizing antibodies to BVDV/890 strain in DNA-vaccinated mice as detected in serum collected after the third and fourth inoculation.

Injected plasmid	Mice number	VN titre [‡] 890 strain	
		Sera collected following the third inoculation.	Sera collected following the fourth inoculation.
pBud/E2-2	15	*	> 64
	16	*	8
	17	*	> 64
	18	*	> 64
	19	*	*
pBud/ΔE2-2	20	32	> 64
	21	8	> 64
	22	8	32
	23	8	> 64
	24	8	> 64
pBud/E2-1/E2-2	30	*	8
	31	*	8
	32	*	> 64
	33	8	16
	34	*	*
pBud/E2-1/ΔE2-2	36	8	8
	37	*	8
	38	*	32
	39	*	> 64
	40	*	> 64
pBudCE4.1	1-5	*	*

[‡] Virus neutralization titre was expressed as the reciprocal of the highest dilution that completely inhibited virus production in the two test-well culture.

* VN titre less than 8.

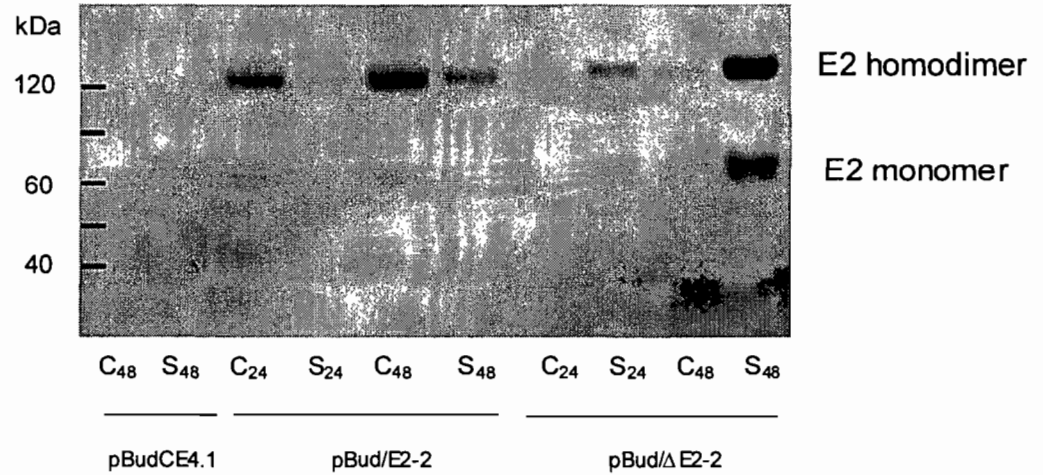


Fig. 1. *In vitro* expression of BVDV E2-2 protein following transient transfection of COS7 cells. Cells were transfected with pBud/E2-2; pBud/ Δ E2-2 or with pBudCE4.1 as a control. Cell lysates (C) and the corresponding supernatants (S) were collected after 24h (C₂₄ and S₂₄) or 48h (C₄₈ and S₄₈). Electrophoresis was performed in non-reducing conditions. Proteins were separated using 10% polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membrane. Western blots were performed with polyvalent bovine anti-BVDV. Molecular weight markers are illustrated to the left.

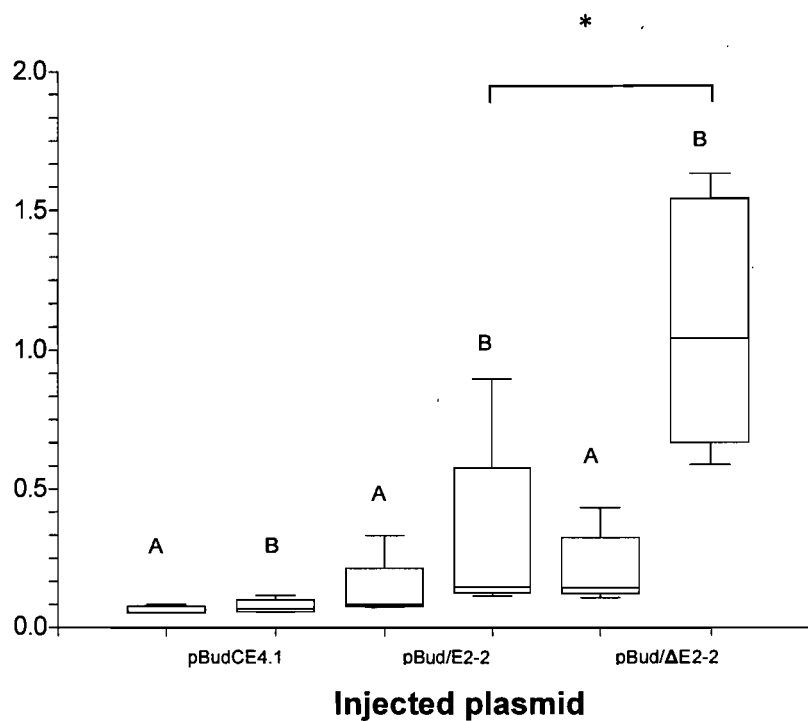


Fig. 2. Impact of cellular localization of E2 encoded-antigen on the antibody responses in mice. Mice were inoculated i.m. with pBud/E2-2 or pBud/ΔE2-2, or pBudCE4.1 (control). The box plot shows specific IgG antibody titres of individual sera collected one week following the third (A) and fourth (B) immunization. The bottom of the box represents the first quartile and the top of the box the third quartile. Whiskers extend 1.5 times the interquartile range above and below the 75th and 25th percentiles. Results are given as OD₄₅₀ of sera diluted 1:200. Asterix (*) represents statistically significant differences. In the box plot, the middle line represents the median.

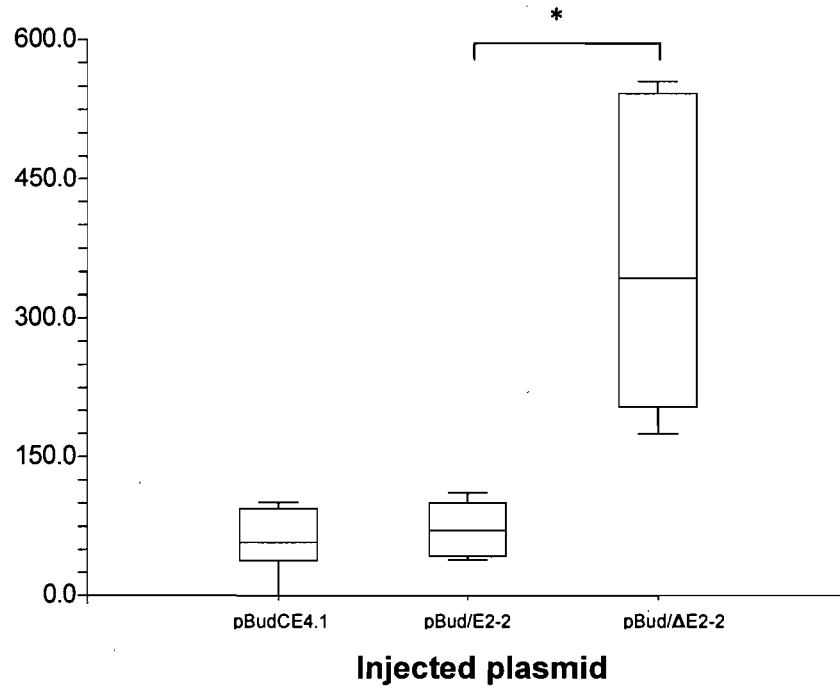


Fig. 3. Effect of cellular localization of the E2 antigen on IL-2 induction. Mice were injected i.m. with pBud/E2-2 or with pBud/ΔE2-2 or with pBudCE4.1 (control). Box plots show specific IL-2 cytokine production following *in vitro* restimulation of murine splenocytes with live BVDV strain 890. The bottom of the box represents the first quartile and the top of the box the third quartile. Whiskers extend 1.5 times the interquartile range above and below the 75th and 25th percentiles. Cytokine production was determined using a commercial ELISA kit and is reported as pg/mL. Asterix (*) represents statistically significant differences.

V. DISCUSSION GÉNÉRALE

En Amérique du Nord, les souches du BVDV sont divisées en deux génotypes (I et II). Les souches du génotype I causent de la diarrhée, de la fièvre, une pneumonie, une leucopénie ainsi que des lésions au niveau des muqueuses alors que les souches du génotype II causent une infection aiguë caractérisée par une forte fièvre, une diarrhée, une leucopénie, une thrombocytopénie et même la mort des nouveaux-nés et des animaux adultes. Les vaccins commerciaux contre le BVDV sont majoritairement élaborés à partir de souches du génotype I et ne confèrent pas une protection efficace des animaux contre une éventuelle infection par une souche du génotype II. L'importante variabilité antigénique au niveau de la protéine E2 [ayant un rôle crucial dans l'induction des anticorps neutralisants^{44, 47, 49} et la protection contre le "challenge" chez le bovin^{45, 53, 54}] entre les génotypes explique la protection croisée incomplète des vaccins actuelles. Il y a un besoin de développer un vaccin capable de protéger simultanément et complètement l'animal contre les souches des deux génotypes de BVDV. Les vaccins à base d'ADN sont très étudiés pour la mise au point d'un vaccin efficace contre le BVDV. Industriellement, il s'agit d'un type de vaccin attirant pour sa facilité de production, de standardisation et d'entreposage.

L'équipe du Dr. Elhazary a été la première à démontrer l'induction d'une protection immunitaire contre le BVDV chez le bovin suite à l'inoculation d'un vecteur d'expression eucaryote codant pour la protéine E2 de la souche NADL (génotype I)²³. Un "challenge" avec une souche homologue a démontré : (1) l'induction d'une protection immunitaire modérée et partielle principalement contre les souches du génotype I et (2) qu'une quantité importante d'ADN (3 mg/veau) est nécessaire pour induire la protection⁴⁵. Par la suite, bien que plusieurs autres candidats de vaccins à ADN contre le BVDV aient été rapportés, aucun d'entre eux n'a démontré l'induction d'une protection complète chez le bovin. Mon projet de recherche présente des stratégies pour améliorer l'efficacité du prototype de vaccin à ADN contre le BVDV développé dans le laboratoire du Dr Elhazary²³.

Les deux objectifs généraux de mon projet de recherche étaient: (1) d'augmenter le potentiel immunologique du prototype de vaccin à ADN contre le BVDV et (2) de créer un vecteur multivalent pour générer une protection croisée contre des souches hétérologues de

BVDV et élargir le spectre de protection du vaccin aux deux génotypes. Le premier objectif général se divisait en deux objectifs spécifiques : (a) Développer et caractériser des molécules de transport pour assurer la livraison de l'ADN vaccinal et améliorer la biodisponibilité de l'ADN vaccinal, (b) apporter des modifications géniques à la séquence E2 native pour optimiser l'expression du gène et la présentation de la protéine résultante au système immunitaire.

Molécules de transport. Un important problème relié à l'utilisation des vaccins à ADN *in vivo* est que la quantité totale d'ADN disponible pour l'expression de l'antigène est fortement diminuée par la rapide dégradation de l'ADN suite à son injection par les désoxyribonucléases présentes dans le milieu extracellulaire et par les nombreux obstacles rencontrés avant d'atteindre le noyau où il sera exprimé. Pour contrer ce problème, plusieurs études présentent des molécules naturelles, synthétiques, d'origine virale et non virale pour le transport et la protection de l'ADN. Les molécules cationiques ont l'avantage d'être facilement synthétisables, modulables, biodégradables, peu coûteuses et non immunogènes. De plus, elles sont intéressantes car elles permettent la formation spontanée de complexes résultant d'interactions électrostatiques entre leurs charges positives et l'ADN plasmidique chargé négativement. Généralement, l'efficacité des molécules de transport cationiques est due au fait qu'elles : (1) condensent l'ADN en nanoparticules d'une taille inférieure à 200 nm favorisant l'internalisation des complexes dans les cellules par endocytose ³⁹³⁻³⁹⁵, (2) forment des complexes avec une charge nette de surface fortement positive qui assure la stabilité des particules en solution ainsi que des interactions électrostatiques avec la membrane cellulaire et (3) forment des complexes avec une morphologie de type toroïdal favorisant une livraison nucléaire maximale de l'ADN plasmidique ^{223, 353, 405}. Durant mon projet de recherche, 3 familles de molécules de transport synthétiques cationiques différentes : les poly(amidoamine)s (PAMAMs), les bola(amphiphile)s et les poly(amphiphile)s de type méthacrylate (PAMs) ont été caractérisées.

Les caractéristiques physico-chimiques des complexes formés ont été déterminées. Par la suite, leur cytotoxicité et leur efficacité de transfection ont été évaluées *in vitro*. Le plasmide rapporteur (pBudCE4.1/LacZ/CAT) a été utilisé pour les tests de complexation et

les tests *in vitro* puisqu'il possède : (i) le même squelette (promoteur, séquence de polyadénylation, éléments d'origine bactérienne), (ii) une taille similaire au candidat vaccinal ainsi que (iii) des gènes dont l'expression *in vitro* est facilement quantifiable à l'aide de troupes ELISA commerciales.

Les travaux sur les poly(amidoamine)s (PAMAMs) ont consisté à évaluer l'impact de l'architecture du polymère [(i) densité de charge, (ii) localisation des charges (sur les chaînes latérales et squelette)] sur les caractéristiques physico-chimiques (efficacité de condensation, taille des complexes, morphologie et charge nette de surface (potentiel ζ)) et les propriétés biologiques (efficacité de transfection et cytotoxicité *in vitro*) des complexes formés. Il a été démontré que :

1. la présence de charges sur le squelette a un impact sur la condensation de l'ADN et la morphologie des complexes formés. Une forte densité de charges positives (70% du squelette) obtenue par une quaternisation élevée du squelette du polymère permet la formation de complexes sphériques définis d'une taille de 50-100 nm. L'organisation et l'arrangement spatial des charges sur le polymère pourrait permettre des interactions favorables avec les groupements phosphates de l'ADN ⁵³⁷,
2. l'architecture du polymère influence fortement l'efficacité de transfection des complexes. Le taux maximum de transfection est obtenu avec des complexes formés avec un polymère présentant une forte densité de charge sur le squelette (70%),
3. qu'il existe des corrélations entre certaines caractéristiques physico-chimiques des complexes et leur efficacité de transfection. Les complexes PAMAMs/ADN les plus efficaces ont une taille inférieure à 200 nm, un potentiel ζ fortement positif et une morphologie toroïdale,
4. comparativement au test de référence *in vitro* des polymères cationiques [la PEI branchée], les PAMAMs étudiés se sont avérés 2000 x moins efficaces dans les conditions testées en plus d'être très cytotoxiques. Plusieurs éléments peuvent expliquer la faible efficacité de transfection de cette famille de polymères. Les PAMAMs testés ne

possédaient pas de caractéristiques intrinsèques (éponge à protons, peptide de fusion, segment endosomolytique) permettant aux complexes endocytés et emprisonnés dans l'endosome de s'en libérer. De plus, la complexation a été effectuée dans une solution saline contenant 150 mM de chlorure de sodium. Une complexation à cette force ionique déstabilise les complexes en solution et favorise leur agrégation en des molécules de tailles importantes que la cellule est incapable d'endocyter. Finalement, la faible efficacité de transfection des PAMAMs peut s'expliquer par leur faible masse moléculaire (<15 kDa). Des études ont clairement démontré que les polymères doivent avoir une masse moléculaire entre 15-25 kDa pour assurer une efficacité de transfection maximale^{302, 538}.

À cause de la faible efficacité de transfection et de la forte cytotoxicité de cette famille de polymères, nous n'avons pas envisagé l'utilisation *in vivo* de cette famille de molécules de transport et avons plutôt décidé d'orienter nos recherches vers d'autres molécules de transport.

Les bola(amphiphile)s bicaténaires asymétriques ont été la seconde famille de molécules de transport étudiée dans mon projet de recherche. Les bola(amphiphile)s représentent des molécules de transport intéressantes d'un point de vue structural, puisqu'elles sont composées d'une tête hydrophile cationique pour la complexation de l'ADN, d'un segment hydrophobe central hemifluoré permettant la formation de systèmes membranaires favorables à la complexation de l'ADN et d'une tête hydrophile neutre (le β -galactose ou la lactobionolactone) assurant la stabilité des complexes en solution. Les travaux effectués sur la série de bola(amphiphile)s ont principalement consisté à déterminer l'impact de la nature chimique de la tête hydrophile cationique (lysine ou histidine) ainsi que la nature du segment central hydrophobe (monofluoré ou bifluoré) sur les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés biologiques *in vitro* des complexes formés. Il a été démontré que :

1. la nature chimique de la tête cationique influence largement le processus de condensation de l'ADN. Les bola(amphiphile)s avec une tête lysine permettent une condensation supérieure de l'ADN, telle que démontrée dans le cas de la célèbre PLL³⁵⁸.

- La différence entre les deux têtes cationiques est que, dans le cas de l'histidine, la charge positive est délocalisée sur tout le cycle aromatique et devient alors moins efficace pour interagir avec les charges négatives de l'ADN lors du processus de complexation,
2. le niveau de perfluoration du bola(amphiphile) influence la condensation de l'ADN. Les bola(amphiphile)s monofluorés [particulièrement celui avec une tête lysine (Bola C)] ont une forte affinité de liaison avec l'ADN permettant la formation de nanoparticules stables en solution, comparativement aux bola(amphiphile)s bifluorés. Une perfluoration élevée confère aux bola(amphiphile) bifluorés un comportement extrêmement hydrophobe en solution limitant sa dispersion et entraînant une organisation défavorable aux interactions électrostatiques avec l'ADN,
 3. *in vitro*, l'expression du gène rapporteur est observée que pour les bola(amphiphile)s monofluorés (Bola C et Bola F). Les bolaplexes Bola C/ADN permettent un niveau optimum de transfection et sont très peu cytotoxiques. Leur efficacité est seulement 25 fois inférieure à celle du test de référence des standards de transfection *in vitro* (la PEI branchée). Le bola C a la particularité de permettre la formation de complexes fortement positifs favorisant les interactions électrostatiques avec la membrane cellulaire, avec un diamètre inférieur à 100 nm assurant une internalisation efficace des complexes³⁹³⁻³⁹⁵, avec une structure hautement définie et compacte protégeant l'ADN de la dégradation et assurant la livraison au noyau^{223, 353, 405},
 4. Par contre, des essais de transfusions effectués en présence de sérum indiquent une très forte diminution de l'efficacité de transfection des complexes Bola C/ADN. La présence de molécules cationiques et anioniques dans le sérum semble affecter la stabilité des bolaplexes et ainsi diminuer leurs résistances vis-à-vis les DNAses présentes dans le sérum.
 5. la fonctionnalisation du Bola C avec un segment PolyEthylene Glycol (PEG) [ayant comme propriété de minimiser le phénomène d'agrégation, d'augmenter l'efficacité de transfection et de masquer le surplus de charges cationiques des complexes^{418, 419}], ou avec un peptide TAT [dont la capacité d'augmenter l'internalisation cellulaire et le

ciblage nucléaire^{285, 286}] n'a pas donné les résultats escomptés. Les résultats préliminaires indiquent que la présence de bola(amphiphile)s fonctionnalisés affecte l'organisation du Bola C en solution, diminue sa capacité de complexer l'ADN et ne permet pas l'induction de son efficacité de transfection. Par contre, l'évaluation de co-formulations supplémentaires serait nécessaire avant de conclure à propos de l'impact de la fonctionnalisation Bola C,

Suite à ces deux derniers résultats, nous avons décidé de ne pas utiliser immédiatement *in vivo* les bolaplexes les plus performants déterminés *in vitro* afin d'effectuer des études supplémentaires pour augmenter la stabilité des complexes en présence de sérum.

Les dernières molécules de transport étudiées furent des poly(amphiphile)s de type méthacrylate (PAMs). Les travaux ont consisté à évaluer l'impact de l'architecture du polymère [longueur du bras espaceur des segments aliphatiques (8, 12 et 16 unités méthylènes)] ainsi que de la nature du contre-ion (brome (Br⁻) ou octyl sulfonate (CH₃(CH₂)₇SO₃⁻) sur les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés biologiques *in vitro* des complexes formés. Il a été démontré que :

1. l'architecture du polymère influence le processus de condensation de l'ADN. Les polymères avec un bras espaceur court (8 ou 12 unités méthylènes) et un contre-ion Br⁻ permettent une excellente condensation de l'ADN plasmidique et la formation de nanocomplexes avec une morphologie définie. Des interactions hydrophobes entre l'ADN plasmidique et les segments des bras espaceurs d'une longueur précise de 8 ou 12 unités méthylènes des PAMs pourraient expliquer leur efficacité à condenser l'ADN. Au niveau du contre-ion, la faible taille et la faible hydrophobicité du contre-ion Br⁻ doit créer un faible encombrement stérique des charges positives sur le polymère facilitant le processus de condensation de l'ADN, comparativement aux polymères possédant le contre-ion octyl sulfonate,
2. l'architecture (longueur du bras espaceur et de la nature chimique du contre-ion) du polymère influence l'efficacité de transfection. 12 unités méthylènes par motif et un contre ion Br⁻ permettent un niveau de transfection maximal. L'influence de la longueur

du bras espaceur au niveau de l'efficacité de transfection des PAMs rejoint des études de transfection avec certains types de polyméthacrylates rapportés dans la littérature⁵³⁹,

3. l'efficacité de transfection *in vitro* des complexes C12Br- (12 unités méthylènes comme longueur du bras espaceur et contre-ion bromure) est similaire à celle du test de référence des standards de transfection *in vitro* (PEI branchée),
4. les complexes se sont avérés peu cytotoxiques *in vitro*,
5. des corrélations inhabituelles ont été observées au niveau des propriétés physico-chimiques et biologiques des complexes PAMs/ADN. Pour obtenir une forte expression du gène rapporteur, la présence de fragments endosomolytiques [assurant la libération des complexes emprisonnés dans l'endosome suite à leur internalisation par endocytose] et la formation de complexes fortement chargés positivement ne sont pas pour cette famille de polymères des caractéristiques essentielles à la transfection. L'internalisation cellulaire de tels types de complexes serait réalisée par un mécanisme de fusion membranaire impliquant des interactions entre les chaînes aliphatiques du polymère et la membrane cellulaire plutôt que par un mécanisme d'endocytose absorbante impliquant des interactions électrostatiques entre les charges positives des complexes et la membrane cellulaire chargée négativement. Le mécanisme de fusion membranaire implique l'internalisation des complexes directement dans le cytoplasme cellulaire sans leur acheminement dans la voie endosomale classique.

Dans l'optique de l'utilisation *in vivo* des PAMs caractérisés et testés *in vitro*, les complexes PAMs/ADN semblent être très intéressants puisqu'*in vitro* ils démontrent une efficacité de transfection élevée et une faible cytotoxicité. Par contre, pour estimer leur capacité de transfection *in vivo* des essais supplémentaires de transfection *in vitro* en présence de sérum doivent être effectués. Étant donné la fin devancée de mon projet de recherche, l'expérience *in vivo* chez la souris avait déjà été débutée au moment de la démonstration de l'efficacité élevée des complexes PAMs/ADN, ce qui explique pourquoi ces molécules n'ont pas été évaluées *in vivo* durant mon projet.

Modifications géniques. Parallèlement au travail effectué sur les molécules de transport pour améliorer la livraison de l'ADN vaccinal, des modifications géniques ont été apportées à la séquence E2-2 pour maximiser son expression et sa présentation au système immunitaire.

Premièrement, il y a eu optimisation des codons à l'espèce bovine. La comparaison entre les fréquences d'utilisation des codons chez le virus et le bovin pour la protéine E2 indiquait une différence considérable dans la fréquence d'utilisation des codons pouvant nuire à l'expression de E2 chez le bovin²⁶⁻²⁷. La synthèse chimique des gènes a permis de réaliser l'optimisation des codons de toutes les séquences E2 utilisées dans ce projet de recherche.

Deuxièmement, une courte séquence propice à l'ancrage membranaire en C-terminal de la séquence codante native a été retirée et remplacée par un signal de translocation conférant à la protéine E2 le pouvoir de sortir de la cellule, de se retrouver dans l'espace extracellulaire et de pénétrer à l'intérieur des cellules avoisinantes. La mobilité intercellulaire de la nouvelle protéine E2 (Δ E2-2) devrait accroître ses chances d'être capturée et présentée par le système immunitaire. Alors que plusieurs études rapportent l'utilisation *in vivo* et *in vitro* du peptide TAT du VIH, de l'hélice-alpha de l'homéodomaine d'Antennapedia de la drosophile et du peptide VP22 du virus de l'herpès simplex pour leur capacité de translocation des protéines^{28, 29, 30, 31, 32}, la séquence de translocation de la protéine E^{ms} des pestivirus a été choisie pour améliorer l'efficacité de notre vaccin à ADN³³. A notre connaissance, il s'agit de la première étude rapportant l'utilisation de cette séquence dans l'élaboration d'un vaccin à ADN. Le plasmide codant la séquence E2-2 optimisée (pBud/E2-2) et le plasmide codant la séquence E2-2 optimisée avec la séquence de translocation Erns (pBud/ Δ E2-2) ont été construits. Des techniques de transfection transitoires *in vitro*, suivies d'un Western blot ont démontré que la protéine Δ E2-2 se retrouve majoritairement dans le surnageant cellulaire comparativement à la protéine native retrouvée principalement dans le culot cellulaire. Les modifications apportées à E2-2 ne semblent pas affecter les processus originaux d'expression, de dimérisation et de glycosylation. Le monomère ainsi que l'homodimère glycosylés ont été retrouvés pour la forme translocante de E2-2. Ce résultat suggère que les liens disulfures intra- et inter- moléculaires cruciaux pour le repliement et la stabilité de la protéine ont été

préservés. Il faut souligner que les techniques utilisées dans la présente étude n'ont toutefois pas permis de démontrer formellement le phénomène de translocation de $\Delta E2-2$. Des expériences supplémentaires pourraient être effectuées pour déterminer si $\Delta E2-2$ a acquis la capacité de "voyager" d'une cellule à l'autre.

Pour évaluer le pouvoir immunologique de pBud/E2-2 et de pBud/ $\Delta E2-2$, une vaccination expérimentale a eu lieu chez la souris. Les résultats indiquent que les modifications apportées à la séquence de E2-2 ont un effet bénéfique au niveau de l'induction de la réponse immunitaire. Au niveau de la réponse humorale, l'inoculation du plasmide pBud/ $\Delta E2-2$ permet, comparativement à celle de pBud/E2-2, la production d'IgG1. La production d'IgG1 reflétant l'induction d'une réponse de type Th2 peut s'expliquer par la présence extracellulaire de la protéine $\Delta E2$. De plus, l'utilisation de pBud/ $\Delta E2-2$ accélère l'apparition des anticorps neutralisants dans le sérum des animaux inoculés. Des titres d'anticorps neutralisants sont mesurables dès la troisième inoculation, comparativement à la quatrième avec l'utilisation de pBud/E2-2. L'expression d'une protéine translocante permettrait une induction précoce de la protection immunitaire et laisse à penser qu'une quantité moindre d'ADN serait nécessaire pour induire une réponse immunitaire humorale similaire à celle induite par la protéine originale. Au niveau de la réponse cellulaire, les résultats indiquent que pBud/ $\Delta E2-2$ induit une forte réponse de type Th1 comparativement à pBud/E2-2. L'induction d'une forte réponse cellulaire par pBud/ $\Delta E2-2$, illustrée par une production élevée d'INF- γ , peut s'expliquer par le pouvoir de dispersion de la protéine suite à son expression à l'intérieur d'un grand nombre de cellules voisines, favorisant ainsi sa présentation sur les CMH I des cellules du système immunitaire et l'activation particulière des cellules Th1.

Nous sommes conscients qu'une des limites du modèle murin utilisé est que les conclusions auxquelles il permet d'aboutir ne sont valides que pour le modèle considéré et que toute extrapolation chez le bovin ne pourra se faire qu'avec précaution. Les essais chez la souris permettent d'évaluer seulement les paramètres immunologiques induits suite à l'inoculation. L'absence de l'existence d'un modèle murin d'infection par le BVDV ne permet pas d'évaluer la protection face à un "challenge".

Vecteur multivalent. Pour contrer la forte diversité antigénique des souches du BVDV et ainsi générer un vaccin avec un spectre de protection plus large contre des souches hétérologues de BVDV susceptibles d'être rencontrées chez les bovins, nous avons créé un vaccin multivalent en combinant des séquences de deux antigènes E2 provenant de souches représentatives des deux génotypes prédominants en Amérique du Nord. La séquence E2 de la souche NADL (génotype I) et celle de la souche 890 (génotype II) le (originale (E2-2) ou modifiée (Δ E2-2)) ont été optimisée et synthétisées chimiquement et clonées dans le plasmide pBudCE4.1 sous le contrôle du promoteur humain EF-1 α et du promoteur viral CMV, respectivement. L'utilisation d'un seul vecteur pour l'expression des deux antigènes a été privilégiée au lieu d'une combinaison de deux plasmides pour éviter les interférences et la compétition au niveau de l'entrée des plasmides dans la cellule ainsi que la possibilité d'interférences au niveau du développement de la réponse immunitaire. Des techniques de transfection transitoires *in vitro*, suivies d'un Western blot ont démontré que le niveau d'expression des deux gènes est sensiblement équivalent par les deux vecteurs (pBud/E2-1/E2-2 et pBud/E2-1/ Δ E2-2).

Une vaccination expérimentale a eu lieu chez la souris pour premièrement vérifier si la présence d'un second gène affectait l'efficacité immunologique de Δ E2-2, précédemment démontrée avec pBudE2-2 et pBud Δ E2-2 et pour deuxièmement, déterminer si l'expression de E2-2 ou Δ E2-2 par un plasmide contenant un second gène (pBud/E2-1/E2-2 et pBud/E2-1/ Δ E2-2) affectait l'intensité des réponses immunitaires E2-2 spécifiques respectives, comparativement à leurs expressions par pBud/E2-2 ou pBud/ Δ E2-2. L'inoculation de pBud/E2-1/E2-2 ou de pBud/E2-1/ Δ E2-2 permet l'induction d'une réponse humorale et cellulaire E2-2 spécifique. Par contre, la réponse immunitaire E2-2 spécifique induite par pBud/E2-1/ Δ E2-2 n'est pas significativement supérieure à celle induite par pBud/E2-1/E2-2. De plus, les résultats indiquent que l'intensité de la réponse immunitaire E2-2 spécifique induite par l'inoculation d'un vecteur contenant deux gènes est dans les deux cas inférieure à celle induite par leurs homologues ne contenant que le gène E2-2. Plusieurs paramètres pourraient l'expliquer: (1) une expression *in vivo* inférieure de l'antigène E2-2, (2) une compétition au niveau de la transcription des gènes à cause de la présence de deux gènes dans le même plasmide et la même cellule, (3) une différence au niveau de l'efficacité de présentation de l'antigène E2-2 par les cellules du système immunitaire, (4) une

compétition au niveau de la présentation des antigènes au système immunitaire ou, (5) une compétition au niveau du développement d'une réponse immunitaire simultanée pour ces deux antigènes dans un même microenvironnement. Très peu d'études rapportent la combinaison d'antigènes E2 provenant de différents géotypes dans l'élaboration d'un vaccin à ADN, il est possible qu'une incompatibilité immunitaire existe entre les deux antigènes que nous avons choisis en comparaison avec la réponse immunitaire induite par les plasmides individuellement.

VI. CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon projet de recherche rapporte les stratégies (molécules de transport, modifications géniques, création d'un vecteur multivalent et adjonction de molécules immunostimulantes) envisagées pour optimiser un prototype de vaccin à ADN contre le BVDV développé dans le laboratoire du Dr. Elhazary.

(1) La caractérisation et l'évaluation de leur efficacité de transfection *in vitro* de molécules de transport cationiques a permis de faire une sélection des molécules les plus efficaces et les moins toxiques avant leur utilisation *in vivo*. Parmi les molécules de transport étudiées, les poly(amphiphile)s de type polyméthacrylates (PAMs) se sont avérés le système de livraison le plus efficace et le moins cytotoxique *in vitro*. Les complexes PAMs/ADN ont une efficacité de transfection similaire à celle du test de référence de transfection *in vitro* (la PEI branchée), en plus d'être peu cytotoxiques. Suite à ces résultats *in vitro*, il serait très intéressant d'examiner le potentiel des complexes PAMs/ADN *in vivo*. Dans l'optique de leur utilisation *in vivo*, des essais de transfection en présence de sérum permettront d'ajuster les ratios de transfection pour une stabilité maximale des complexes et estimer leur capacité de transfection *in vivo*.

(2) La délétion d'une séquence hydrophobe codant pour l'ancrage transmembranaire de la glycoprotéine E2 et l'addition d'un signal de translocation de la protéine E^{tns} du BVDV (Δ E2-2) permet l'expression d'une protéine E2-2 sécrétée dans l'environnement extracellulaire, comparativement à la séquence originale (E2-2) permettant l'expression d'une protéine liée à la membrane. Chez la souris, l'utilisation du vecteur d'expression eucaryote codant pour Δ E2-2 démontre une induction significative de la réponse immunitaire humorale et cellulaire, comparativement au vecteur codant pour E2-2. Δ E2-2 accélère la cinétique d'apparition des anticorps neutralisants et permet une induction significative de la réponse immunitaire cellulaire Th1. Le pouvoir immunologique et protecteur du vecteur pBud/ Δ E2-2 sera très intéressant à évaluer chez le bovin.

(3) Un vecteur d'expression eucaryote permettant l'expression indépendante de la protéine E2 d'une souche du génotype I (E2-1) et de la protéine E2 d'une souche du génotype II (E2-2 ou Δ E2-2) a été créée pour contrer la forte variabilité antigénique du BVDV et générer une protection croisée contre des souches hétérologues de BVDV. Les résultats ont démontré que l'expression de E2-2 ou Δ E2-2 par un plasmide contenant un second gène (pBud/E2-1/E2-2 et pBud/E2-1/ Δ E2-2) affecte l'intensité des réponses immunitaires E2-2 spécifiques, comparativement à leurs expressions par pBud/E2-2 ou pBud/ Δ E2-2. De plus, l'expression Δ E2-2 par un plasmide contenant un second gène affecte le potentiel immunologique de la protéine translocante comparativement à son expression dans un vecteur monocistronique.

Nous sommes confiants que suite aux quelques études supplémentaires mentionnées, l'inoculation du vecteur pBud Δ E2-2 (dont les codons ont été optimisés pour l'espèce bovine) complexés avec la molécule de transport C12Br-, les résultats immunologiques obtenus chez le bovin ne pourront qu'être supérieurs à ceux déterminés chez la souris.

BIBLIOGRAPHIE

1. Olafson, P., Mccallum, AD, Fox, FH, An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian* **1946**, 36, 205-13.
2. Underdahl, N., Grace OD, Hoerlein, AB Cultivation in tissue-culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1957**, 94, 795-7.
3. Hove H., M. A., Surveillance of cattle herds for bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-infection using data on reproduction and calf mortality. *Arch. Virol. Suppl.* **1991**, 3, 157-64.
4. Horzinek, M. C., Pestiviruses -Taxonomic Perspectives. *Archives of Virology* **1991**, 1-5.
5. Paton, D. J.; Simpson, V.; Done, S. H., Infection of Pigs and Cattle with Bovine Viral Diarrhea Virus on a Farm in England. *Veterinary Record* **1992**, 131, 185-188.
6. Ridpath, J. F.; Bolin, S. R.; Dubovi, E. J., Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology* **1994**, 205, 66-74.
7. Ridpath, J. F.; Bolin, S. R., Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes* **1998**, 12, 101-106.
8. Fulton, R. W.; Hessman, B.; Johnson, B. J.; Ridpath, J. F.; Saliki, J. T.; Burge, L. J.; Sjeklocha, D.; Confer, A. W.; Funk, R. A., Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* **2006**, 228, 578-584.
9. Pellerin, C.; Vandenhurk, J.; Lecomte, J.; Tijssen, P., Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus-Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virology* **1994**, 203, 260-268.
10. Ridpath, J., Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med.* **2005** 72, 17-30.
11. Ridpath, J. F.; Bolin, S. R., The Genomic Sequence of a Virulent Bovine Viral Diarrhea Virus (Bvdv) from the Type-2 Genotype - Detection of a Large Genomic Insertion in a Noncytopathic Bvdv. *Virology* **1995**, 212, 39-46.

12. Tijssen, P.; Pellerin, C.; Lecomte, J.; vandenHurk, J., Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology* **1996**, 217, 356-361.
13. Bolin, S. R.; Littledike, E. T.; Ridpath, J. F., Serologic Detection and Practical Consequences of Antigenic Diversity among Bovine Viral Diarrhea Viruses in a Vaccinated Herd. *American Journal of Veterinary Research* **1991**, 52, 1033-1037.
14. Gillespie J.H., B. J. A., McEntee K., A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* **1960** 50, 73-79.
15. Carman, S.; van Dreumel, T.; Ridpath, J.; Hazlett, M.; Alves, D.; Dubovi, E.; Tremblay, R.; Bolin, S.; Godkin, A.; Anderson, N., Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **1998**, 10, 27-35.
16. Peterhans, E.; Jungi, T. W.; Schweizer, M., BVDV and innate immunity. *Biologicals* **2003**, 31, 107-111.
17. Schweizer, M.; Peterhans, E., Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *Journal of Virology* **2001**, 75, 4692-4698.
18. Hamers, C.; Dehan, P.; Couvreur, B.; Letellier, C.; Kerkhofs, P.; Pastoret, P. P., Diversity among bovine pestiviruses. *Veterinary Journal* **2001**, 161, 112-122.
19. Elbers, K.; Tautz, N.; Becher, P.; Stoll, D.; Rumenapf, T.; Thiel, H. J., Processing in the pestivirus E2-NS2 region: Identification of proteins p7 and E2p7. *Journal of Virology* **1996**, 70, 4131-4135.
20. Weiland, E.; Stark, R.; Haas, B.; Rumenapf, T.; Meyers, G.; Thiel, H. J., Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of a Disulfide-Linked Heterodimer. *Journal of Virology* **1990**, 64, 3563-3569.
21. Liang, R.; van den Hurk, J. V.; Zheng, C. F.; Yu, H.; Pontarollo, R. A.; Babiuk, L. A.; Littel-van den Hurk, S. V., Immunization with plasmid DNA encoding a truncated, secreted form of the bovine viral diarrhea virus E2 protein elicits strong humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **2005**, 23, 5252-5262.
22. Rumenapf, T.; Unger, G.; Strauss, J. H.; Thiel, H. J., Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *Journal of Virology* **1993**, 67, 3288-3294.

23. Wiskerchen, M.; Collett, M. S., Pestivirus Gene-Expression - Protein P80 of Bovine Viral Diarrhea Virus Is a Proteinase Involved in Polyprotein Processing. *Virology* **1991**, 184, 341-350.
24. Warrener, P.; Collett, M. S., Pestivirus Ns3 (P80) Protein Possesses Rna Helicase Activity. *Journal of Virology* **1995**, 69, 1720-1726.
25. Brusckhe, C. J. M.; Weerdmeester, K.; Van Oirschot, J. T.; Van Rijn, P. A., Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Veterinary Microbiology* **1998**, 64, 23-32.
26. Braakman, I.; van Anken, E., Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic* **2000**, 1, 533-539.
27. Hulst, M. M.; Moormann, R. J. M., Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E-rns and E2 of classical swine fever virus: E-rns and E2 interact with different receptors. *Journal of General Virology* **1997**, 78, 2779-2787.
28. Liang D., S. I. F., Ansari I.H., LGil. H.V.G., Vassilev V., Donis R.O., The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J. Gen. Virol.* **2003**, 84, 1269-1274.
29. Iqbal, M.; Flick-Smith, H.; McCauley, J. W., Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E-rns with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology* **2000**, 81, 451-459.
30. Schelp, C.; Greiserwilke, I.; Wolf, G.; Beer, M.; Moennig, V.; Liess, B., Identification of Cell-Membrane Proteins Linked to Susceptibility to Bovine Viral Diarrhea Virus-Infection. *Archives of Virology* **1995**, 140, 1997-2009.
31. Xue W., M. H. C., Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol.* **1993** 74, 73-9.
32. Wang Z, N. Y., Wang P, Ding M, Deng H., Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology* **2004** 330, 332-41.
33. Lecot, S.; Belouzard, S.; Dubuisson, J.; Rouille, Y., Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **2005**, 79, 10826-10829.
34. Agnello, V.; Abel, G.; Elfahal, M.; Knight, G. B.; Zhang, Q. X., Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1999**, *96*, 12766-12771.

35. Maurer, K.; Krey, T.; Moennig, V.; Thiel, H. R.; Rumenapf, T., CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 1792-1799.
36. Xue W, O. D., Abdelmagid OY, Rider M, Blecha F, Minocha HC., Anti-idiotypic antibodies mimic bovine viral diarrhea virus antigen. *Vet Microbiol.* **1991** *29*, 201-12.
37. Krey, T.; Himmelreich, A.; Heimann, M.; Menge, C.; Thiel, H. J.; Maurer, K.; Rumenapf, T., Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 3912-3922.
38. Gray, E. W.; Nettleton, P. F., The Ultrastructure of Cell-Cultures Infected with Border Disease and Bovine Virus Diarrhea Viruses. *Journal of General Virology* **1987**, *68*, 2339-2346.
39. Brownlie, J.; Clarke, M. C.; Howard, C. J., Experimental-Infection of Cattle in Early-Pregnancy with a Cytopathic Strain of Bovine Virus Diarrhea Virus. *Research in Veterinary Science* **1989**, *46*, 307-311.
40. Bolin, S. R.; McClurkin, A. W.; Cutlip, R. C.; Coria, M. F., Severe Clinical-Disease Induced in Cattle Persistently Infected with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus by Superinfection with Cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus. *American Journal of Veterinary Research* **1985**, *46*, 573-576.
41. Brownlie, J., The Pathways for Bovine Virus Diarrhea Virus Biotypes in the Pathogenesis of Disease. *Archives of Virology* **1991**, 79-96.
42. Archambault, D.; Beliveau, C.; Couture, Y.; Carman, S., Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Research* **2000**, *31*, 215-227.
43. Howard CJ, C. M., Brownlie J, Sopp P. , Effect of in vivo depletion of BoT4+ and BoT8+ lymphocytes with monoclonal antibodies on infection with bovine viral diarrhoea virus in calves. *Immunology Supp.* **1989**, *4* 154.
44. Howard, C. J.; Clarke, M. C.; Brownlie, J., Protection against Respiratory-Infection with Bovine Virus Diarrhea Virus by Passively Acquired Antibody. *Veterinary Microbiology* **1989**, *19*, 195-203.

45. Harpin, S.; Hurley, D. J.; Mbikay, M.; Talbot, B.; Elazhary, Y., Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *Journal of General Virology* **1999**, *80*, 3137-3144.
46. Malmquist, W. A., Bovine diarrhoea-mucosal disease :etiology pathogenesis and applied immunity. . *J. Am.vet. med.Ass.* **1968** *152* 763-768.
47. Donis, R. O.; Dubovi, E. J., Molecular Specificity of the Antibody-Responses of Cattle Naturally and Experimentally Infected with Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Biotypes. *American Journal of Veterinary Research* **1987**, *48*, 1549-1554.
48. Reddy, J. R.; Xue, W.; Rivera, S.; Minocha, H. C., Antigenic Differences between a Field Isolate and Vaccine Strains of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Clinical Microbiology* **1995**, *33*, 2159-2161.
49. Grigera, P. R.; Marzocca, M. P.; Capozzo, A. V. E.; Buonocore, L.; Donis, R. O.; Rose, J. K., Presence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice. *Virus Research* **2000**, *69*, 3-15.
50. Deregt, D.; van Rijn, P. A.; Wiens, T. Y.; van den Hurk, J., Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Research* **1998**, *57*, 171-181.
51. Paton, D. J.; Lowings, J. P.; Barrett, A. D. T., Epitope Mapping of the Gp53 Envelope Protein of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Virology* **1992**, *190*, 763-772.
52. Deregt, D.; Bolin, S. R.; van den Hurk, J.; Ridpath, J. F.; Gilbert, S. A., Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhoea virus with neutralization escape mutants. *Virus Research* **1998**, *53*, 81-90.
53. Brusckhe C.J., M. R. J., van Oirschot J.T., van Rijn P.A, A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*. **1997**, *15*, 1940-5.
54. Nobiron, I.; Thompson, I.; Brownlie, J.; Collins, M. E., DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine* **2003**, *21*, 2082-2092.
55. Elahi, S. M.; Shen, S. H.; Talbot, B. G.; Massie, B.; Harpin, S.; Elazhary, Y., Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of

- bovine viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* **1999**, 261, 1-7.
56. Donis, R. O.; Corapi, W.; Dubovi, E. J., Neutralizing Monoclonal-Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56k to 58k Glycoprotein. *Journal of General Virology* **1988**, 69, 77-86.
 57. Donis R.O., D. E. J., Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* **1987**, 158, 168-73.
 58. Bolin, S. R., Immunogens of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Veterinary Microbiology* **1993**, 37, 263-271.
 59. Young, N. J.; Thomas, C. J.; Thompson, I.; Collins, M. E.; Brownlie, J., Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. *Preventive Veterinary Medicine* **2005**, 72, 115-120.
 60. Bitsch, V.; Ronsholt, L., Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus-Infection without Vaccines. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* **1995**, 11, 627-&.
 61. Bitsch, V.; Hansen, K. E. L.; Ronsholt, L., Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Veterinary Microbiology* **2000**, 77, 137-143.
 62. Sandvik, T., Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* **2004**, 20, 151-+.
 63. Smith, D. R.; Grotelueschen, D. M., Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* **2004**, 20, 131-+.
 64. van Oirschot JT, B. C., van Rijn PA., Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol.* **1999** 64, 169-83.
 65. Brusckhe, C. J. M.; van Oirschot, J. T.; van Rijn, P. A., An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine* **1999**, 17, 1983-1991.

66. Moennig, V.; Eicken, K.; Flebbe, U.; Frey, H. R.; Grummer, B.; Haas, L.; Greiser-Wilke, I.; Liess, B., Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine* **2005**, *72*, 109-114.
67. Howard, C., Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech*. **1990**, *9*, 95-103.
68. Potgieter, L., Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. **1995**, *11*, 501-20.
69. Beer, M.; Wolf, G.; Pichler, J.; Wolfmeyer, A.; Kaaden, O. R., Cytotoxic T-lymphocyte responses in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* **1997**, *58*, 9-22.
70. Howard, C. J.; Clarke, M. C.; Sopp, P.; Brownlie, J., Immunity to Bovine Virus Diarrhoea Virus in Calves - the Role of Different T-Cell Subpopulations Analyzed by Specific Depletion In vivo with Monoclonal-Antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **1992**, *32*, 303-314.
71. Rowland-Jones, S. L.; Dong, T.; Fowke, K. R.; Kimani, J.; Krausa, P.; Newell, H.; Blanchard, T.; Ariyoshi, K.; Oyugi, J.; Ngugi, E.; Bwayo, J.; MacDonald, K. S.; McMichael, A. J.; Plummer, F. A., Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *Journal of Clinical Investigation* **1998**, *102*, 1758-1765.
72. Stamatatos, L.; Davis, D., New insights into protective humoral responses and HIV vaccines. *Aids* **2001**, *15*, S105-S115.
73. Wee EG, P. S., McMichael AJ, Hanke TA,, DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques. *J Gen Virol*. **2002**, *83*, 75-80.
74. Talaat, A. M.; Lyons, R.; Johnston, S. A., A combination vaccine confers full protection against co-infections with influenza, herpes simplex and respiratory syncytial viruses. *Vaccine* **2001**, *20*, 538-544.
75. Chow, Y. H.; Huang, W. L.; Chi, W. K.; Chu, Y. D.; Tao, M. H., Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *Journal of Virology* **1997**, *71*, 169-178.

76. Cho, J. H.; Lee, S. W.; Sung, Y. C., Enhanced cellular immunity to hepatitis C virus nonstructural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in intramuscular DNA immunization. *Vaccine* **1999**, *17*, 1136-1144.
77. Oligino, T. J.; Yao, Q. P.; Ghivizzani, S. C.; Robbins, P., Vector systems for gene transfer to joints. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2000**, (379), S17-S30.
78. Pinto, A., Ertl, HC, Genetically modified adenoviruses as recombinant vaccines. *Current Topics in Virology* **2002**, *2*, 70-84.
79. Sullivan, N. J.; Sanchez, A.; Rollin, P. E.; Yang, Z. Y.; Nabel, G. J., Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **2000**, *408*, 605-609.
80. Shiver, J. W.; Fu, T. M.; Chen, L.; Casimiro, D. R.; Davies, M. E.; Evans, R. K.; Zhang, Z. Q.; Simon, A. J.; Trigona, W. L.; Dubey, S. A.; Huang, L. Y.; Harris, V. A.; Long, R. S.; Liang, X. P.; Handt, L.; Schleif, W. A.; Zhu, L.; Freed, D. C.; Persaud, N. V.; Guan, L.; Punt, K. S.; Tang, A.; Chen, M. C.; Wilson, K. A.; Collins, K. B.; Heidecker, G. J.; Fernandez, V. R.; Perry, H. C.; Joyce, J. G.; Grimm, K. M.; Cook, J. C.; Keller, P. M.; Kresock, D. S.; Mach, H.; Troutman, R. D.; Isopi, L. A.; Williams, D. M.; Xu, Z.; Bohannon, K. E.; Volkin, D. B.; Montefiori, D. C.; Miura, A.; Krivulka, G. R.; Lifton, M. A.; Kuroda, M. J.; Schmitz, J. E.; Letvin, N. L.; Caulfield, M. J.; Bett, A. J.; Youil, R.; Kaslow, D. C.; Emini, E. A., Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **2002**, *415*, 331-335.
81. Smith, A. E., Viral Vectors in Gene-Therapy. *Annual Review of Microbiology* **1995**, *49*, 807-838.
82. Acsadi, G.; Jiao, S.; Jani, A.; Duke, D.; Williams, P.; Chong, W.; Wolff, J. A., Direct Gene-Transfer and Expression into Rat-Heart Invivo. *New Biologist* **1991**, *3*, 71-81.
83. Acsadi, G.; Jiao, S.; Jani, A.; Duke, D.; Williams, P.; Wang, C.; Wolff, J. A., Direct Gene-Transfer and Expression in Cardiac and Skeletal-Muscle. *Pediatric Research* **1991**, *29*, A126-A126.
84. Hengge, U. R.; Walker, P. S.; Vogel, J. C., Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *Journal of Clinical Investigation* **1996**, *97*, (12), 2911-2916.

85. Sikes, M. L.; Omalley, B. W.; Finegold, M. J.; Ledley, F. D., In-Vivo Gene-Transfer into Rabbit Thyroid Follicular Cells by Direct DNA Injection. *Human Gene Therapy* **1994**, *5*, 837-844.
86. Kamiya, H.; Tsuchiya, H.; Yamazaki, J.; Harashima, H., Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *52*, 153-164.
87. Tang, D. C.; Devit, M.; Johnston, S. A., Genetic Immunization Is a Simple Method for Eliciting an Immune-Response. *Nature* **1992**, *356*, 152-154.
88. Montgomery, D. L.; Shiver, J. W.; Leander, K. R.; Perry, H. C.; Friedman, A.; Martinez, D.; Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Liu, M. A., Heterologous and Homologous Protection against Influenza-a by DNA Vaccination - Optimization of DNA Vectors. *DNA and Cell Biology* **1993**, *12*, 777-783.
89. MacGregor, R. R.; Boyer, J. D.; Ugen, K. E.; Lacy, K. E.; Gluckman, S. J.; Bagarazzi, M. L.; Chattergoon, M. A.; Baine, Y.; Higgins, T. J.; Ciccarelli, R. B.; Coney, L. R.; Ginsberg, R. S.; Weiner, D. B., First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: Safety and host response. *Journal of Infectious Diseases* **1998**, *178*, 92-100.
90. Ugen, K. E.; Nyland, S. B.; Boyer, J. D.; Vidal, C.; Lera, L.; Rasheid, S.; Chattergoon, M.; Bagarazzi, M. L.; Ciccarelli, R.; Higgins, T.; Baine, Y.; Ginsberg, R.; Macgregor, R. R.; Weiner, D. B., DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* **1998**, *16*, 1818-1821.
91. Littel-van den Hurk, S. V.; Gerdts, V.; Loehr, B. I.; Pontarollo, R.; Rankin, R.; Uwiera, R.; Babiuk, L. A., Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *43*, 13-28.
92. Powell, K., DNA vaccines - back in the saddle against *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 799-801.
93. Ulmer, J. B.; Deck, R. R.; Dewitt, C. M.; Friedman, A.; Donnelly, J. J.; Liu, M. A., Protective Immunity by Intramuscular Injection of Low-Doses of Influenza-Virus DNA Vaccines. *Vaccine* **1994**, *12*, 1541-1544.

94. Chang, D. C.; Reese, T. S., Changes in Membrane-Structure Induced by Electroporation as Revealed by Rapid-Freezing Electron-Microscopy. *Biophysical Journal* **1990**, *58*, 1-12.
95. Aihara, H.; Miyazaki, J., Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature Biotechnology* **1998**, *16*, 867-870.
96. Mathiesen, I., Electroporabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Therapy* **1999**, *6*, 508-514.
97. Titomirov, A. V.; Sukharev, S.; Kistanova, E., In vivo Electroporation and Stable Transformation of Skin Cells of Newborn Mice by Plasmid DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1991**, *1088*, 131-134.
98. Dean, D. A.; Machado-Aranda, D.; Blair-Parks, K.; Yeldandi, A. V.; Young, J. L., Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Therapy* **2003**, *10*, 1608-1615.
99. Blair-Parks, K.; Weston, B. C.; Dean, D. A., High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *Journal of Gene Medicine* **2002**, *4*, 92-100.
100. Jaichandran, S.; Yap, S. T. B.; Khoo, A. B. M.; Ho, L. P.; Tien, S. L.; Kon, O. L., In vivo liver electroporation: Optimization and demonstration of therapeutic efficacy. *Human Gene Therapy* **2006**, *17*, 362-375.
101. Zaharoff, D. A.; Barr, R. C.; Li, C. Y.; Yuan, F., Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Therapy* **2002**, *9*, 1286-1290.
102. Babiuk, S.; Baca-Estrada, M. E.; Foldvari, M.; Storms, M.; Rabussay, D.; Widera, G.; Babiuk, L. A., Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals. *Vaccine* **2002**, *20*, 3399-3408.
103. Widera, G.; Austin, M.; Rabussay, D.; Goldbeck, C.; Barnett, S. W.; Chen, M. C.; Leung, L.; Otten, G. R.; Thudium, K.; Selby, M. J.; Ulmer, J. B., Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *Journal of Immunology* **2000**, *164*, 4635-4640.
104. Zucchelli, S.; Capone, S.; Fattori, E.; Folgori, A.; Di Marco, A.; Casimiro, D.; Simon, A. J.; Laufer, R.; La Monica, N.; Cortese, R.; Nicosia, A., Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *Journal of Virology* **2000**, *74*, 11598-11607.

105. Mir, L. M.; Bureau, M. F.; Gehl, J.; Rangara, R.; Rouy, D.; Caillaud, J. M.; Delaere, P.; Branellec, D.; Schwartz, B.; Scherman, D., High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 4262-4267.
106. Mir, L. M.; Bureau, M. F.; Rangara, R.; Schwartz, B. T.; Scherman, D., Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **1998**, 321, 893-899.
107. Yang, N. S.; Burkholder, J.; Roberts, B.; Martinell, B.; McCabe, D., Invivo and Invitro Gene-Transfer to Mammalian Somatic-Cells by Particle Bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, 9568-9572.
108. Johnston, S. A.; Tang, D. C., Gene Gun Transfection of Animal-Cells and Genetic Immunization. In *Methods in Cell Biology*, 1994; 353-365.
109. Degano, P.; Sarphie, D. F.; Bangham, C. R. M., Intradermal DNA immunization of mice against influenza A virus using the novel PowderJect (R) system. *Vaccine* **1998**, 16, 394-398.
110. Pertmer, T. M.; Eisenbraun, M. D.; McCabe, D.; Prayaga, S. K.; Fuller, D. F.; Haynes, J. R., Gene Gun-Based Nucleic-Acid Immunization - Elicitation of Humoral and Cytotoxic T-Lymphocyte Responses Following Epidermal Delivery of Nanogram Quantities of DNA. *Vaccine* **1995**, 13, 1427-1430.
111. Raz, E.; Carson, D. A.; Parker, S. E.; Parr, T. B.; Abai, A. M.; Aichinger, G.; Gromkowski, S. H.; Singh, M.; Lew, D.; Yanakauckas, M. A.; Baird, S. M.; Rhodes, G. H., Intradermal Gene Immunization - the Possible Role of DNA Uptake in the Induction of Cellular-Immunity to Viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 9519-9523.
112. Haynes, J. R.; Fuller, D. H.; Eisenbraun, M. D.; Ford, M. J.; Pertmer, T. M., Accell(R) Particle-Mediated DNA Immunization Elicits Humoral, Cytotoxic, and Protective Immune-Responses. *Aids Research and Human Retroviruses* **1994**, 10, S43-S45.
113. Fuller, D. H.; Haynes, J. R., A Qualitative Progression in Hiv Type-1 Glycoprotein-120-Specific Cytotoxic Cellular and Humoral Immune-Responses in Mice Receiving

- a DNA-Based Glycoprotein-120 Vaccine. *Aids Research and Human Retroviruses* **1994**, 10, 1433-1441.
114. Prayaga, S. K.; Ford, M. J.; Haynes, J. R., Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization. *Vaccine* **1997**, 15, 1349-1352.
115. Feltquate, D. M.; Heaney, S.; Webster, R. G.; Robinson, H. L., Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *Journal of Immunology* **1997**, 158, 2278-2284.
116. Weiss, R.; Scheiblhofer, S.; Freund, J.; Ferreira, F.; Livey, I.; Thalhamer, J., Gene gun bombardment with gold particles displays a particular Th2-promoting signal that over-rules the Th1-inducing effect of immunostimulatory CpG motifs in DNA vaccines. *Vaccine* **2002**, 20, 3148-3154.
117. Barry, M. A.; Johnston, S. A., Biological features of genetic immunization. *Vaccine* **1997**, 15, 788-791.
118. Fynan, E. F.; Webster, R. G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C.; Robinson, H. L., DNA Vaccines - Protective Immunizations by Parenteral, Mucosal, and Gene-Gun Inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 11478-11482.
119. Braun, R. P.; Babiuk, L. A.; Loehr, B. I.; Littel-van den Hurk, S. V., Particle-mediated DNA immunization of cattle confers long-lasting immunity against bovine herpesvirus-1. *Virology* **1999**, 265, 46-56.
120. Loehr, B. I.; Willson, P.; Babiuk, L. A.; Littel-van den Hurk, S. V., Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle. *Journal of Virology* **2000**, 74, 6077-6086.
121. Lodmell, D. L.; Parnell, M. J.; Bailey, J. R.; Ewalt, L. C.; Hanlon, C. A., Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* **2002**, 20, 2221-2228.
122. Littel-van den Hurk, S. V.; Babiuk, S. L.; Babiuk, L. A., Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunological Reviews* **2004**, 199, 113-125.

123. Akbari, O.; Panjwani, N.; Garcia, S.; Tascon, R.; Lowrie, D.; Stockinger, B., DNA vaccination: Transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, 189, 169-177.
124. Wang, R. B.; Doolan, D. L.; Le, T. P.; Hedstrom, R. C.; Coonan, K. M.; Charoenvit, Y. P.; Jones, T. R.; Hobart, P.; Margalit, M.; Ng, J.; Weiss, W. R.; Sedegah, M.; de Taisne, C.; Norman, J. A.; Hoffman, S. L., Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **1998**, 282, 476-480.
125. Klinman, D. M.; Yi, A. K.; Beaucage, S. L.; Conover, J.; Krieg, A. M., CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, 2879-2883.
126. Yamamoto, S.; Yamamoto, T.; Kataoka, T.; Kuramoto, E.; Yano, O.; Tokunaga, T., Unique Palindromic Sequences in Synthetic Oligonucleotides Are Required to Induce Inf and Augment Inf-Mediated Natural-Killer Activity. *Journal of Immunology* **1992**, 148, 4072-4076.
127. Martin-Orozco, E.; Kobayashi, H.; Van Uden, J.; Nguyen, M. D.; Kornbluth, R. S.; Raz, E., Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *International Immunology* **1999**, 11, 1111-1118.
128. Krieg, A. M., The role of CpG motifs in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **2000**, 12, 35-43.
129. Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Hartmann, G., Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA. *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, 84, 113-120.
130. Wagner, H., Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. In *Advances in Immunology*, 1999; 73, 329-368.
131. Ballas, Z. K.; Rasmussen, W. L.; Krieg, A. M., Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *Journal of Immunology* **1996**, 157, 1840-1845.
132. Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Schorr, J.; Davis, H. L., The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends in Microbiology* **1998**, 6, 23-27.
133. Jakob, T.; Walker, P. S.; Krieg, A. M.; von Stebut, E.; Udey, M. C.; Vogel, J. C., Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous

- dendritic cells and induce IL-12 production: Implications for the augmentation of Th1 responses. *International Archives of Allergy and Immunology* **1999**, 118, 457-461.
134. Sato, Y.; Roman, M.; Tighe, H.; Lee, D.; Corr, M.; Nguyen, M. D.; Silverman, G. J.; Lotz, M.; Carson, D. A.; Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **1996**, 273, 352-354.
135. Mutwiri, G.; Pontarollo, R.; Babiuk, S.; Griebel, P.; Littel-van den Hurk, S. V.; Mena, A.; Tsang, C.; Alcon, V.; Nichani, A.; Ioannou, X.; Gomis, S.; Townsend, H.; Hecker, R.; Potter, A.; Babiuk, L. A., Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2003**, 91, 89-103.
136. Letunic, I.; Goodstadt, L.; Dickens, N. J.; Doerks, T.; Schultz, J.; Mott, R.; Ciccarelli, F.; Copley, R. R.; Ponting, C. P.; Bork, P., Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, (242-244).
137. Rutz, M.; Metzger, J.; Gellert, T.; Luppa, P.; Lipford, G. B.; Wagner, H.; Bauer, S., Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* **2004**, 34, 2541-2550.
138. Moldoveanu, Z.; Love-Homan, L.; Huang, W. Q.; Krieg, A. M., CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* **1998**, 16, 1216-1224.
139. Yi, A. K.; Chang, M.; Peckham, D. W.; Krieg, A. M.; Ashman, R. F., CpG oligodeoxynucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *Journal of Immunology* **1998**, 160, 5898-5906.
140. Roman, M.; MartinOrozco, E.; Goodman, S.; Nguyen, M. D.; Sato, Y.; Ronaghy, A.; Kornbluth, R. S.; Richman, D. D.; Carson, D. A.; Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature Medicine* **1997**, 3, 849-854.
141. Weiner, G. J.; Liu, H. M.; Wooldridge, J. E.; Dahle, C. E.; Krieg, A. M., Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 10833-10837.

142. Millan, C. L. B.; Weeratna, R.; Krieg, A. M.; Siegrist, C. A.; Davis, H. L., CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 15553-15558.
143. Yi, A. K.; Krieg, A. M., Cutting edge: Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *Journal of Immunology* **1998**, *161*, 4493-4497.
144. Jakob, T.; Walker, P. S.; Krieg, A. M.; Udey, M. C.; Vogel, J. C., Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: A role for dendritic cells in the augmentation of th1 responses by immunostimulatory DNA. *Journal of Immunology* **1998**, *161*, 3042-3049.
145. Rankin, R.; Pontarollo, R.; Ioannou, X.; Krieg, A. M.; Hecker, R.; Babiuk, L. A.; van Drunen, S.; van den Hurk, L. V., CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **2001**, *11*, 333-340.
146. Hartmann, G.; Weeratna, R. D.; Ballas, Z. K.; Payette, P.; Blackwell, S.; Suparto, I.; Rasmussen, W. L.; Waldschmidt, M.; Sajuthi, D.; Purcell, R. H.; Davis, H. L.; Krieg, A. M., Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* **2000**, *164*, 1617-1624.
147. Davis, H. L.; Suparto, I.; Weeratna, R.; Jumintarto; Iskandriati, D.; Chamzah, S.; Ma'ruf, A.; Nente, C.; Pawitri, D.; Krieg, A. M.; Heriyanto; Smits, W.; Sajuthi, D., CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* **2000**, *18*, 1920-1924.
148. Zhang, Y.; Shoda, L. K. M.; Brayton, K. A.; Estes, D. M.; Palmer, G. H.; Brown, W. C., Induction of interleukin-6 and interleukin-12 in bovine B lymphocytes, monocytes, and macrophages by a CpG oligodeoxynucleotide (ODN 2059) containing the GTCGTT motif. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2001**, *21*, 871-881.
149. Werling, D.; Hope, J. C.; Howard, C. J.; Jungi, T. W., Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* **2004**, *111*, 41-52.

150. Sparwasser, T.; Miethke, T.; Lipford, G.; Erdmann, A.; Hacker, H.; Heeg, K.; Wagner, H., Macrophages sense pathogens via DNA motifs: Induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *European Journal of Immunology* **1997**, *27*, 1671-1679.
151. Sin, J. I.; Bagarazzi, M.; Pachuk, C.; Weiner, D. B., DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA and Cell Biology* **1999**, *18*, 771-779.
152. Fan, H. R.; Lin, Q.; Morrissey, G. R.; Khavari, P. A., Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 870-872.
153. Boyle, J. S.; Silva, A.; Brady, J. L.; Lew, A. M., DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 14626-14631.
154. Corr, M.; Lee, D. J.; Carson, D. A.; Tighe, H., Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *Journal of Experimental Medicine* **1996**, *184*, 1555-1560.
155. Doe, B.; Selby, M.; Barnett, S.; Baenziger, J.; Walker, C. M., Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 8578-8583.
156. Iwasaki, A.; Torres, C. A. T.; Ohashi, P. S.; Robinson, H. L.; Barber, B. H., The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *Journal of Immunology* **1997**, *159*, 11-14.
157. Ridge, J. P.; Di Rosa, F.; Matzinger, P., A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4(+) T-helper and a T-killer cell. *Nature* **1998**, *393*, 474-478.
158. Bennett, S. R. M.; Carbone, F. R.; Karamalis, F.; Flavell, R. A.; Miller, J.; Heath, W. R., Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **1998**, *393*, 478-480.

159. Banchereau, J.; Steinman, R. M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, 392, 245-252.
160. Casares, S.; Inaba, K.; Brumeanu, T. D.; Steinman, R. M.; Bona, C. A., Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *Journal of Experimental Medicine* **1997**, 186, 1481-1486.
161. Condon, C.; Watkins, S. C.; Celluzzi, C. M.; Thompson, K.; Falo, L. D., DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* **1996**, 2, 1122-1128.
162. Porgador, A.; Irvine, K. R.; Iwasaki, A.; Barber, B. H.; Restifo, N. P.; Germain, R. N., Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8(+)T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, 188, 1075-1082.
163. Takashima, A.; Morita, A., Dendritic cells in genetic immunization. *Journal of Leukocyte Biology* **1999**, 66, 350-356.
164. Ulmer, J. B.; Deck, R. R.; Dewitt, C. M.; Donnelly, J. J.; Liu, M. A., Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: Antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* **1996**, 89, 59-67.
165. Fu, T. M.; Ulmer, J. B.; Caulfield, M. J.; Deck, R. R.; Friedman, A.; Wang, S.; Liu, X.; Donnelly, J. J.; Liu, M. A., Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: Requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Molecular Medicine* **1997**, 3, 362-371.
166. Albert, M. L.; Sauter, B.; Bhardwaj, N., Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* **1998**, 392, 86-89.
167. Albert, M. L.; Frieda, S.; Pearce, A.; Francisco, L. M.; Sauter, B.; Roy, P.; Silverstein, R. L.; Bhardwaj, N., Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha(v)beta(5) and CD36, and cross-present antigens to CTLs. *Journal of Leukocyte Biology* **1998**, 48-48.
168. Albert, M. L.; Bhardwaj, N., Immature DCs phagocytose apoptotic cells and cross-present antigen on MHC I. *Arthritis and Rheumatism* **1998**, 41, (9), S244-S244.

169. Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L., Direct Gene-Transfer into Mouse Muscle *In Vivo*. *Science* **1990**, *247*, 1465-1468.
170. Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Rhodes, G. H.; Felgner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Deck, R. R.; Dewitt, C. M.; Friedman, A.; Hawe, L. A.; Leander, K. R.; Martinez, D.; Perry, H. C.; Shiver, J. W.; Montgomery, D. L.; Liu, M. A., Heterologous Protection against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science* **1993**, *259*, 1745-1749.
171. Manthorpe, M.; Cornefertjensen, F.; Hartikka, J.; Felgner, J.; Rundell, A.; Margalith, M.; Dwarki, V., Gene-Therapy by Intramuscular Injection of Plasmid DNA - Studies on Firefly Luciferase Gene-Expression in Mice. *Human Gene Therapy* **1993**, *4*, 419-431.
172. Wolff, J. A.; Dowty, M. E.; Jiao, S. S.; Repetto, G.; Berg, R. K.; Ludtke, J. J.; Williams, P.; Slautterback, D. B., Expression of Naked Plasmids by Cultured Myotubes and Entry of Plasmids into T-Tubules and Caveolae of Mammalian Skeletal-Muscle. *Journal of Cell Science* **1992**, *103*, 1249-&.
173. Dowty, M. E.; Williams, P.; Zhang, G. F.; Hagstrom, J. E.; Wolff, J. A., Plasmid DNA Entry into Postmitotic Nuclei of Primary Rat Myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, (10), 4572-4576.
174. Pardoll, D. M.; Beckerleg, A. M., Exposing the Immunology of Naked DNA Vaccines. *Immunity* **1995**, *3*, 165-169.
175. Torres, C. A. T.; Iwasaki, A.; Barber, B. H.; Robinson, H. L., Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *Journal of Immunology* **1997**, *158*, 4529-4532.
176. Agadjanyan, M. G.; Kim, J. J.; Trivedi, N.; Wilson, D. M.; Monzavi-Karbassi, B.; Morrison, L. D.; Nottingham, L. K.; Dentchev, T.; Tsai, A.; Dang, K. S.; Chalian, A. A.; Maldonado, M. A.; Williams, W. V.; Weiner, D. B., CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses *in vivo*. *Journal of Immunology* **1999**, *162*, 3417-3427.
177. Iwasaki, A.; Stiernholm, B. J. N.; Chan, A. K.; Berinstein, N. L.; Barber, B. H., Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding

- costimulatory molecules and cytokines. *Journal of Immunology* **1997**, 158, 4591-4601.
178. Klinman, D. M.; Sechler, J. M. G.; Conover, J.; Gu, M. L.; Rosenberg, A. S., Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *Journal of Immunology* **1998**, 160, 2388-2392.
179. Heath, W. R.; Belz, G. T.; Behrens, G. M. N.; Smith, C. M.; Forehan, S. P.; Parish, I. A.; Davey, G. M.; Wilson, N. S.; Carbone, F. R.; Villadangos, J. A., Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* **2004**, 199, 9-26.
180. Pertmer, T. M.; Roberts, T. R.; Haynes, J. R., Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *Journal of Virology* **1996**, 70, 6119-6125.
181. Boyle, J. S.; Koniaras, C.; Lew, A. M., Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *International Immunology* **1997**, 9, 1897-1906.
182. Zarozinski, C. C.; Fynan, E. F.; Selin, L. K.; Robinson, H. L.; Welsh, R. M., Protective Ctl-Dependent Immunity and Enhanced Immunopathology in Mice Immunized by Particle Bombardment with DNA Encoding an Internal Virion Protein. *Journal of Immunology* **1995**, 154, 4010-4017.
183. Yokoyama, M.; Zhang, J.; Whitton, J. L., DNA Immunization Confers Protection against Lethal Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Infection. *Journal of Virology* **1995**, 69, (4), 2684-2688.
184. Martins, L. P.; Lau, L. L.; Asano, M. S.; Ahmed, R., DNA Vaccination against Persistent Viral-Infection. *Journal of Virology* **1995**, 69, 2574-2582.
185. Banchereau, J.; Bazan, F.; Blanchard, D.; Briere, F.; Galizzi, J. P.; Vankooten, C.; Liu, Y. J.; Rousset, F.; Saeland, S., The Cd40 Antigen and Its Ligand. *Annual Review of Immunology* **1994**, 12, 881-922.
186. Boyle, C. M.; Morin, M.; Webster, R. G.; Robinson, H. L., Role of different lymphoid tissues in the initiation and maintenance of DNA-raised antibody responses to the influenza virus H1 glycoprotein. *Journal of Virology* **1996**, 70, 9074-9078.

187. Deck, R. R.; DeWitt, C. M.; Donnelly, J. J.; Liu, M. A.; Ulmer, J. B., Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* **1997**, *15*, 71-78.
188. Gurunathan, S.; Prussin, C.; Sacks, D. L.; Seder, R. A., Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine* **1998**, *4*, 1409-1415.
189. Sun, S. Q.; Zhang, X. H.; Tough, D. F.; Sprent, J., Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CgG DNA. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, *188*, 2335-2342.
190. Tough, D. F.; Borrow, P.; Sprent, J., Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* **1996**, *272*, 1947-1950.
191. Chattergoon, M. A.; Saulino, V.; Shames, J. P.; Stein, J.; Montaner, L. J.; Weiner, D. B., Co-immunization with plasmid IL-12 generates a strong T-cell memory response in mice. *Vaccine* **2004**, *22*, 1744-1750.
192. Wolff, J. A.; Ludtke, J.; Acsadi, G.; Jani, A., Very Long-Term Persistence of Plasmid DNA and Foreign Gene-Expression in Mouse Muscle. *Clinical Research* **1992**, *40*, A339-A339.
193. Nichols, W. W.; Ledwith, B. J.; Manam, S. V.; Troilo, P. J., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. In *DNA Vaccines*, 1995; 772, 30-39.
194. Wang, Z.; Troilo, P. J.; Wang, X.; Griffiths, T. G.; Pacchione, S. J.; Barnum, A. B.; Harper, L. B.; Pauley, C. J.; Niu, Z.; Denisova, L.; Follmer, T. T.; Rizzuto, G.; Ciliberto, G.; Fattori, E.; Monica, N. L.; Manam, S.; Ledwith, B. J., Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Therapy* **2004**, *11*, 711-721.
195. Donnelly, J. J.; Ulmer, J. B.; Shiver, J. W.; Liu, M. A., DNA vaccines. *Annual Review of Immunology* **1997**, *15*, 617-648.
196. Prince, A. M.; Whalen, R.; Brotman, B., Successful nucleic acid based immunization of newborn chimpanzees against hepatitis B virus. *Vaccine* **1997**, *15*, 916-919.
197. Gilkeson, G. S.; Pritchard, A. J.; Pisetsky, D. S., Specificity of Anti-DNA Antibodies Induced in Normal Mice by Immunization with Bacterial-DNA. *Clinical Immunology and Immunopathology* **1991**, *59*, 288-300.

198. Jiao, S. S.; Williams, P.; Berg, R. K.; Hodgeman, B. A.; Liu, L. J.; Repetto, G.; Wolff, J. A., Direct Gene-Transfer into Nonhuman Primate Myofibers In Vivo. *Human Gene Therapy* **1992**, *3*, 121-33.
199. Katsumi, A.; Emi, N.; Abe, A.; Hasegawa, Y.; Ito, M.; Saito, H., Humoral and Cellular-Immunity to an Encoded Protein-Induced by Direct DNA Injection. *Human Gene Therapy* **1994**, *5*, 1335-1339.
200. Le, T. P.; Coonan, K. M.; Hedstrom, R. C.; Charoenvit, Y.; Sedegah, M.; Epstein, J. E.; Kumar, S.; Wang, R. B.; Doolan, D. L.; Maguire, J. D.; Parker, S. E.; Hobart, P.; Norman, J.; Hoffman, S. L., Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* **2000**, *18*, 1893-1901.
201. Kawabata, K.; Takakura, Y.; Hashida, M., The Fate of Plasmid DNA after Intravenous-Injection in Mice - Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic-Uptake. *Pharmaceutical Research* **1995**, *12*, 825-830.
202. Lew, D.; Parker, S. E.; Latimer, T.; Abai, A. M.; Kuwahararundell, A.; Doh, S. G.; Yang, Z. Y.; Laface, D.; Gromkowski, S. H.; Nabel, G. J.; Manthorpe, M.; Norman, J., Cancer Gene-Therapy Using Plasmid DNA - Pharmacokinetic Study of DNA Following Injection in Mice. *Human Gene Therapy* **1995**, *6*, 553-564.
203. Nishikawa, M.; Huang, L., Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer. *Human Gene Therapy* **2001**, *12*, 861-870.
204. Budker, V.; Budker, T.; Zhang, G. F.; Subbotin, V.; Loomis, A.; Wolff, J. A., Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *Journal of Gene Medicine* **2000**, *2*, 76-88.
205. McNeil, P. L.; Vogel, S. S.; Miyake, K.; Terasaki, M., Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 1891-1902.
206. Sandre, O.; Moreaux, L.; Brochard-Wyart, F., Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 10591-10596.
207. Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S., Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 1625-1629.

208. de Gennes, P. G., Passive entry of a DNA molecule into a small pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 7262-7264.
209. Mukherjee, S.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R., Endocytosis. *Physiological Reviews* **1997**, 77, 759-803.
210. Hagstrom, J. E.; Rybakova, I. N.; Staeva, T.; Wolff, J. A.; Ervasti, J. M., Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle. *Biochemical and Molecular Medicine* **1996**, 58, 113-121.
211. Levy, M. Y.; Barron, L. G.; Meyer, K. B.; Szoka, F. C., Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: Evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Therapy* **1996**, 3, 201-211.
212. Brodsky, F. M.; Chen, C. Y.; Knuehl, C.; Towler, M. C.; Wakeham, D. E., Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2001**, 17, 517-568.
213. Takei, K.; Haucke, V., Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends in Cell Biology* **2001**, 11, 385-391.
214. Yakubov, L. A.; Deeva, E. A.; Zarytova, V. F.; Ivanova, E. M.; Ryte, A. S.; Yurchenko, L. V.; Vlassov, V. V., Mechanism of Oligonucleotide Uptake by Cells - Involvement of Specific Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, 86, 6454-6458.
215. Goodarzi, G.; Watabe, M.; Watabe, K., Binding of Oligonucleotides to Cell-Membranes at Acidic Ph. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, 181, 1343-1351.
216. Bennett, R. M.; Gabor, G. T.; Merritt, M. M., DNA-Binding to Human-Leukocytes - Evidence for a Receptor-Mediated Association, Internalization, and Degradation of DNA. *Journal of Clinical Investigation* **1985**, 76, 2182-2190.
217. Gasparro, F. P.; Dallamico, R.; Omalley, M.; Heald, P. W.; Edelson, R. L., Cell-Membrane DNA - a New Target for Psoralen Photoadduct Formation. *Photochemistry and Photobiology* **1990**, 52, 315-321.
218. Anderson, R. G. W., The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67, 199-225.

219. Gottlieb, T. A.; Ivanov, I. E.; Adesnik, M.; Sabatini, D. D., Actin Microfilaments Play a Critical Role in Endocytosis at the Apical but Not the Basolateral Surface of Polarized Epithelial-Cells. *Journal of Cell Biology* **1993**, 120, 695-710.
220. Ghitescu, L.; Bendayan, M., Transendothelial Transport of Serum-Albumin - a Quantitative Immunocytochemical Study. *Journal of Cell Biology* **1992**, 117, 745-755.
221. West, M. A.; Prescott, A. R.; Eskelinen, E. L.; Ridley, A. J.; Watts, C., Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Current Biology* **2000**, 10, 839-848.
222. Basner-Tschakarjan, E.; Mirmohammadsadegh, A.; Maschke, J.; Hengge, U. R., Uptake and trafficking of naked plasmid DNA in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **2002**, 119, 249-249.
223. Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J. P.; Escande, D., Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, 7507-7511.
224. Mirzayans, R.; Aubin, R. A.; Paterson, M. C., Differential Expression and Stability of Foreign Genes Introduced into Human Fibroblasts by Nuclear Versus Cytoplasmic Microinjection. *Mutation Research* **1992**, 281, 115-122.
225. Lechardeur, D.; Sohn, K. J.; Haardt, M.; Joshi, P. B.; Monck, M.; Graham, R. W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodovich, H.; Lukacs, G. L., Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Therapy* **1999**, 6, 482-497.
226. Ludtke, J. J.; Sebestyen, M. G.; Wolff, J. A., The effect of cell division on the cellular dynamics of microinjected DNA and dextran. *Molecular Therapy* **2002**, 5, 579-588.
227. Kao, H. P.; Abney, J. R.; Verkman, A. S., Determinants of the Translational Mobility of a Small Solute in Cell Cytoplasm. *Journal of Cell Biology* **1993**, 120, 175-184.
228. Luby-Phelps, K., Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: Volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. In *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, 2000, 92; 189-221.
229. Fushimi, K.; Verkman, A. S., Low Viscosity in the Aqueous Domain of Cell Cytoplasm Measured by Picosecond Polarization Microfluorimetry. *Journal of Cell Biology* **1991**, 112, 719-725.

230. Lubyphelps, K.; Mujumdar, S.; Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Galbraith, W.; Waggoner, A. S., A Novel Fluorescence Ratiometric Method Confirms the Low Solvent Viscosity of the Cytoplasm. *Biophysical Journal* **1993**, *65*, 236-242.
231. Seksek, O.; Biwersi, J.; Verkman, A. S., Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *Journal of Cell Biology* **1997**, *138*, 131-142.
232. Leonetti, J. P.; Mechti, N.; Degols, G.; Gagnor, C.; Lebleu, B., Intracellular-Distribution of Microinjected Antisense Oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 2702-2706.
233. Yarmola, E.; Sokoloff, H.; Chrambach, A., The relative contributions of dispersion and diffusion to band spreading (resolution) in gel electrophoresis. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1416-1419.
234. Fishman, D. M.; Patterson, G. D., Light scattering studies of supercoiled and nicked DNA. *Biopolymers* **1996**, *38*, 535-552.
235. Darquet, A. M.; Rangara, R.; Kreiss, P.; Schwartz, B.; Naimi, S.; Delaere, P.; Crouzet, J.; Scherman, D., Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Therapy* **1999**, *6*, 209-218.
236. Feldherr, C. M.; Akin, D., The Permeability of the Nuclear-Envelope in Dividing and Nondividing Cell-Cultures. *Journal of Cell Biology* **1990**, *111*, 1-8.
237. Dworetzky, S. I.; Lanford, R. E.; Feldherr, C. M., The Effects of Variations in the Number and Sequence of Targeting Signals on Nuclear Uptake. *Journal of Cell Biology* **1988**, *107*, 1279-1287.
238. Harel, A.; Forbes, D. J., Welcome to the nucleus: CAN I take your coat *Nature Cell Biology* **2001**, *3*, E267-E269.
239. Kuersten, S.; Ohno, M.; Mattaj, I. W., Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends in Cell Biology* **2001**, *11*, 497-503.
240. Talcott, B.; Moore, M. S., Getting across the nuclear pore complex. *Trends in Cell Biology* **1999**, *9*, 312-318.
241. Melchior, F.; Gerace, L., Mechanisms of Nuclear-Protein Import. *Current Opinion in Cell Biology* **1995**, *7*, 310-318.
242. Conti, E.; Izaurralde, E., Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Current Opinion in Cell Biology* **2001**, *13*, 310-319.

243. Tseng, W. C.; Haselton, F. R.; Giorgio, T. D., Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1999**, 1445, 53-64.
244. Ludtke, J. J.; Sebestyen, M. G.; Wolff, J. A., The effect of cell division on the cellular dynamics of microinjected DNA and dextran (vol 5, pg 579, 2002). *Molecular Therapy* **2002**, 6, 134-134.
245. Salman, H.; Zbaida, D.; Rabin, Y.; Chatenay, D.; Elbaum, M., Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 7247-7252.
246. Brisson, M.; Huang, L., Liposomes: Conquering the nuclear barrier. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **1999**, 1, 140-146.
247. Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P., Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 91-96.
248. Wilson, G. L.; Dean, B. S.; Wang, G.; Dean, D. A., Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 22025-22032.
249. Sebestyen, M. G.; Ludtke, J. J.; Bassik, M. C.; Zhang, G. F.; Budker, V.; Lukhtanov, E. A.; Hagstrom, J. E.; Wolff, J. A., DNA vector chemistry: The covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nature Biotechnology* **1998**, 16, 80-85.
250. Akey, C. W.; Radermacher, M., Architecture of the Xenopus Nuclear-Pore Complex Revealed by 3-Dimensional Cryoelectron Microscopy. *Journal of Cell Biology* **1993**, 122, 1-19.
251. Chastain, M.; Simon, A. J.; Soper, K. A.; Holder, D. J.; Montgomery, D. L.; Sagar, S. L.; Casimiro, D. R.; Middaugh, C. R., Antigen levels and antibody titers after DNA vaccination. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, 90, 474-484.
252. Ertl, P. F.; Thomsen, L. L., Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Methods* **2003**, 31, 199-206.
253. Chapman, B. S.; Thayer, R. M.; Vincent, K. A.; Haigwood, N. L., Effect of Intron-a from Human Cytomegalovirus (Towne) Immediate-Early Gene on Heterologous Expression in Mammalian-Cells. *Nucleic Acids Research* **1991**, 19, 3979-3986.

254. Wynshawboris, A.; Short, J. M.; Loose, D. S.; Hanson, R. W., Characterization of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Gtp) Promoter-Regulatory Region .1. Multiple Hormone Regulatory Elements and the Effects of Enhancers. *Journal of Biological Chemistry* **1986**, 261, 9714-9720.
255. Silva, M. C.; Wong, D. W. S.; Batt, C. A., Cloning and Partial Nucleotide-Sequence of the Genomic Bovine Beta-Lactoglobulin Gene. *Nucleic Acids Research* **1990**, 18, 3051-3051.
256. Wolf, J. B.; David, V. A.; Deutch, A. H., Identification of a Distal Regulatory Element in the 5' Flanking Region of the Bovine Prolactin Gene. *Nucleic Acids Research* **1990**, 18, 4905-4912.
257. Cheng, L.; Ziegelhoffer, P. R.; Yang, N. S., Invivo Promoter Activity and Transgene Expression in Mammalian Somatic Tissues Evaluated by Using Particle Bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 4455-4459.
258. Norman, J. A.; Hobart, P.; Manthorpe, M.; Felgner, P.; Wheeler, C., Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine* **1997**, 15, 801-803.
259. Oran, A. E.; Robinson, H. L., DNA vaccines, combining form of antigen and method of delivery to raise a spectrum of IFN-gamma and IL-4-producing CD4(+) and CD8(+) T cells. *Journal of Immunology* **2003**, 171, 1999-2005.
260. Xiang, Z. Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W. H.; Cheng, J.; Ertl, H. C. J., Vaccination with a Plasmid Vector Carrying the Rabies Virus Glycoprotein Gene Induces Protective Immunity against Rabies Virus. *Virology* **1994**, 199, 132-140.
261. Lee, A. H.; Suh, Y. S.; Sung, J. H.; Yang, S. H.; Sung, Y. C., Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Molecules and Cells* **1997**, 7, 495-501.
262. Darnell, J. E.; Kerr, I. M.; Stark, G. R., Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* **1994**, 264, 1415-1421.
263. Weeratna, R. D.; Wu, T.; Efler, S. M.; Zhang, L.; Davis, H. L., Designing gene therapy vectors: avoiding immune responses by using tissue-specific promoters. *Gene Therapy* **2001**, 8, 1872-1878.

264. Nishimura, Y.; Kamei, A.; Uno-Furuta, S.; Tamaki, S.; Kim, G.; Adachi, Y.; Kuribayashi, K.; Matsuura, Y.; Miyamura, T.; Yasutomi, Y., A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-alpha promoter elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). *Vaccine* **1999**, *18*, 675-680.
265. Bojak, A.; Hammer, D.; Wolf, H.; Wagner, R., Muscle specific versus ubiquitous expression of Gag based HIV-1 DNA vaccines: a comparative analysis. *Vaccine* **2002**, *20*, 1975-1979.
266. Bojak, A.; Wild, J.; Wolf, H.; Wagner, R., Efficiency of a myogenic DNA vaccine is strictly dependent upon cellular localization of HIV-1Pr55(gag). *Vaccine* **2002**, *20*, 1980-1984.
267. Jathoul, A. P.; Holley, J. L.; Garmory, H. S., Efficacy of DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters. *Vaccine* **2004**, *22*, 3942-3946.
268. Dubensky, T. W.; Driver, D. A.; Polo, J. M.; Belli, B. A.; Latham, E. M.; Ibanez, C. E.; Chada, S.; Brumm, D.; Banks, T. A.; Mento, S. J.; Jolly, D. J.; Chang, S. M. W., Sindbis virus DNA-based expression vectors: Utility for in vitro and in vivo gene transfer. *Journal of Virology* **1996**, *70*, 508-519.
269. Gaucher, D.; Chadee, K., Construction and immunogenicity of a codon-optimized *Entamoeba histolytica* Gal-lectin-based DNA vaccine. *Vaccine* **2002**, *20*, 3244-3253.
270. Narum, D. L.; Kumar, S.; Rogers, W. O.; Fuhrmann, S. R.; Liang, H.; Oakley, M.; Taye, A.; Sim, B. K. L.; Hoffman, S. L., Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infection and Immunity* **2001**, *69*, 7250-7253.
271. Andre, S.; Seed, B.; Eberle, J.; Schraut, W.; Bultmann, A.; Haas, J., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology* **1998**, *72*, 1497-1503.
272. Vinner, L.; Nielsen, H. V.; Bryder, K.; Corbet, S.; Nielsen, C.; Fomsgaard, A., Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine* **1999**, *17*, 2166-2175.

273. Cheung, Y. K.; Cheng, S. C. S.; Sin, F. W. Y.; Xie, Y., Plasmid encoding papillomavirus type 16 (HPV 16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. *Vaccine* **2004**, *23*, 629-638.
274. Frelin, L.; Ahlen, G.; Alheim, M.; Weiland, O.; Barnfield, C.; Liljestrom, P.; Sallberg, M., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Therapy* **2004**, *11*, 522-533.
275. Ramakrishna, L.; Anand, K. K.; Mohankumar, K. M.; Ranga, U., Codon optimization of the Tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 9174-9189.
276. Ko, H. J.; Ko, S. Y.; Kim, Y. J.; Lee, E. G.; Cho, S. N.; Kang, C. R., Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Mycobacterial antigen Ag85B. *Infection and Immunity* **2005**, *73*, 5666-5674.
277. Nakamura, Y.; Gojobori, T.; Ikemura, T., Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 292-292.
278. Weiss, R.; Durnberger, J.; Mostbock, S.; Scheiblhofer, S.; Hartl, A.; Breitenbach, M.; Strasser, P.; Dorner, F.; Livey, I.; Crowe, B.; Thalhamer, J., Improvement of the immune response against plasmid DNA encoding OspC of *Borrelia* by an ER-targeting leader sequence. *Vaccine* **1999**, *18*, 815-824.
279. Hasan, U. A.; Harper, D. R.; Wren, B. W.; Morrow, W. J. W., Immunization with a DNA vaccine expressing a truncated form of varicella zoster virus glycoprotein E. *Vaccine* **2002**, *20*, 1308-1315.
280. Hasan, U. A.; Harper, D. R.; Argent, S.; Layton, G.; Wren, B. W.; Morrow, W. J. W., Immunization with a DNA expression vector encoding the varicella zoster virus glycoprotein E (gE) gene via intramuscular and subcutaneous routes. *Vaccine* **2000**, *18*, 1506-1514.
281. Ashok, M. S.; Rangarajan, P. N., Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model. *Vaccine* **2002**, *20*, 1563-1570.

282. Geissler, M.; Bruss, V.; Michalak, S.; Hockenjos, B.; Ortmann, D.; Offensperger, W. B.; Wands, J. R.; Blum, H. E., Intracellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces interleukin-2 augmentation after genetic immunizations. *Journal of Virology* **1999**, *73*, 4284-4292.
283. Rodriguez, F.; Zhang, J.; Whitton, J. L., DNA immunization: Ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *Journal of Virology* **1997**, *71*, 8497-8503.
284. Townsend, A.; Bastin, J.; Gould, K.; Brownlee, G.; Andrew, M.; Coupar, B.; Boyle, D.; Chan, S.; Smith, G., Defective Presentation to Class-I-Restricted Cyto-Toxic Lymphocytes-T in Vaccinia-Infected Cells Is Overcome by Enhanced Degradation of Antigen. *Journal of Experimental Medicine* **1988**, *168*, 1211-1224.
285. Green, M.; Loewenstein, P. M., Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179-1188.
286. Frankel, A. D.; Pabo, C. O., Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189-1193.
287. Elliott, G.; Ohare, P., Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **1997**, *88*, 223-233.
288. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A., The 3rd Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological-Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 10444-10450.
289. Langedijk, J., Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 5308-14.
290. Fischer, P. M.; Krausz, E.; Lane, D. P., Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 825-841.
291. Fawell, S.; Seery, J.; Daikh, Y.; Moore, C.; Chen, L. L.; Pepinsky, B.; Barsoum, J., Tat-Mediated Delivery of Heterologous Proteins into Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 664-668.
292. Bolton, S. J.; Jones, D. N. C.; Darker, J. G.; Eggleston, D. S.; Hunter, A. J.; Walsh, F. S., Cellular uptake and spread of the cell-permeable peptide penetratin in adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* **2000**, *12*, 2847-2855.

293. SchutzeRedelmeier, M. P.; Gournier, H.; GarciaPons, F.; Moussa, M.; Joliot, A. H.; Volovitch, M.; Prochiantz, A.; Lemonnier, F. A., Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Immunology* **1996**, *157*, 650-655.
294. May, M. J.; D'Acquisto, F.; Madge, L. A.; Glockner, J.; Pober, J. S.; Ghosh, S., Selective inhibition of NF-kappa B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I kappa B kinase complex. *Science* **2000**, *289*, 1550-1554.
295. Pooga, M.; Soomets, U.; Hallbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J. X.; Xu, X. J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hokfelt, T.; Bartfai, A.; Langel, U., Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nature Biotechnology* **1998**, *16*, 857-861.
296. Michel, N.; Osen, W.; Gissmann, L.; Schumacher, T. N. M.; Zentgraf, H.; Muller, M., Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* **2002**, *294*, 47-59.
297. Zheng, C. F.; Brownlie, R.; Huang, D. Y.; Babiuk, L. A.; Littel-van den Hurk, S. V. D., Intercellular trafficking of the major tegument protein VP22 of bovine herpesvirus-1 and its application to improve a DNA vaccine. *Archives of Virology* **2006**, *151*, 985-993.
298. Hung, C. F.; Cheng, W. F.; Chai, C. Y.; Hsu, K. F.; He, L. M.; Ling, M.; Wu, T. C., Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *Journal of Immunology* **2001**, *166*, 5733-5740.
299. Oliveira, S. C.; Harms, J. S.; Afonso, R. R.; Splitter, G. A., A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion. *Human Gene Therapy* **2001**, *12*, 1353-1359.
300. Hung, C. F.; He, L. M.; Juang, J.; Lin, T. J.; Ling, M.; Wu, T. C., Improving DNA vaccine potency by linking Marck's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *Journal of Virology* **2002**, *76*, 2676-2682.
301. Gautam, A.; Densmore, C. L.; Golunski, E.; Xu, B.; Waldrep, J. C., Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Molecular Therapy* **2001**, *3*, 551-556.

302. Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 7297-7301.
303. Singh, M.; Briones, M.; Ott, G.; O'Hagan, D., Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 811-816.
304. Trubetsky, V. S.; Loomis, A.; Hagstrom, J. E.; Budker, V. G.; Wolff, J. A., Layer-by-layer deposition of oppositely charged polyelectrolytes on the surface of condensed DNA particles. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 3090-3095.
305. Mumper, R. J.; Rolland, A. P., Plasmid delivery to muscle: Recent advances in polymer delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *30*, 151-172.
306. Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y., Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2002**, *223*, U438-U438.
307. Mumper, R. J.; Duguid, J. G.; Anwer, K.; Barron, M. K.; Nitta, H.; Rolland, A. P., Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharmaceutical Research* **1996**, *13*, 701-709.
308. Lemieux, P.; Guerin, N.; Paradis, G.; Proulx, R.; Chistyakova, L.; Kabanov, A.; Alakhov, V., A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* **2000**, *7*, 986-991.
309. Astafieva, I.; Maksimova, I.; Lukanidin, E.; Alakhov, V.; Kabanov, A., Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with pluronic P85 block copolymer. *Febs Letters* **1996**, *389*, 278-280.
310. Cho, C. W.; Cho, Y. S.; Kang, B. T.; Hwang, J. S.; Park, S. N.; Yoon, D. Y., Improvement of gene transfer to cervical cancer cell lines using non-viral agents. *Cancer Letters* **2001**, *162*, 75-85.
311. Cho, C. W.; Cho, Y. S.; Lee, H. K.; Yeom, Y. I.; Park, S. N.; Yoon, D. Y., Improvement of receptor-mediated gene delivery to HepG2 cells using an amphiphilic gelling agent. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2000**, *32*, 21-26.
312. Mumper, R. J.; Wang, J. J.; Klakamp, S. L.; Nitta, H.; Anwer, K.; Tagliaferri, F.; Rolland, A. P., Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced

- plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release* **1998**, *52*, 191-203.
313. Alakhov, V.; Klinski, E.; Lemieux, P.; Pietrzynski, G.; Kabanov, A., Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2001**, *1*, 583-602.
314. Liu, F.; Huang, L., Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, *78*, 259-266.
315. Felgner, P. L.; Ringold, G. M., Cationic Liposome-Mediated Transfection. *Nature* **1989**, *337*, 387-388.
316. Sakurai, F.; Nishioka, T.; Saito, H.; Baba, T.; Okuda, A.; Matsumoto, O.; Taga, T.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; Hashida, M., Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Therapy* **2001**, *8*, 677-686.
317. Gershon, H.; Ghirlando, R.; Guttman, S. B.; Minsky, A., Mode of Formation and Structural Features of DNA Cationic Liposome Complexes Used for Transfection. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7143-7151.
318. Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L., New Structures in Complex-Formation between DNA and Cationic Liposomes Visualized by Freeze-Fracture Electron-Microscopy. *Febs Letters* **1994**, *356*, 361-366.
319. Gustafsson, J.; Arvidson, G.; Karlsson, G.; Almgren, M., Complexes between Cationic Liposomes and DNA Visualized by Cryo-Tem. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1995**, *1235*, 305-312.
320. LabatMoleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E.; Behr, J. P., An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 1010-1017.
321. Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R.; Monaco, L., Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 3095-3101.
322. Zelphati, O.; Wang, Y.; Kitada, S.; Reed, J. C.; Felgner, P. L.; Corbeil, J., Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35103-35110.

323. Pinnaduwege, P.; Schmitt, L.; Huang, L., Use of a Quaternary Ammonium Detergent in Liposome Mediated DNA Transfection of Mouse L-Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1989**, *985*, 33-37.
324. Smith, J. G.; Walzem, R. L.; German, J. B., Liposomes as Agents of DNA Transfer. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1993**, *1154*, 327-340.
325. ElOuahabi, A.; Thiry, M.; Pector, V.; Fuks, R.; Ruyschaert, J. M.; Vandenbranden, M., The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *Febs Letters* **1997**, *414*, 187-192.
326. Zelphati, O.; Szoka, F. C., Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharmaceutical Research* **1996**, *13*, 1367-1372.
327. Lamaze, C.; Schmid, S. L., The Emergence of Clathrin-Independent Pinocytic Pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **1995**, *7*, 573-580.
328. Coonrod, A.; Li, F. Q.; Horwitz, M., On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Therapy* **1997**, *4*, 1313-1321.
329. Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J., Cellular and Molecular Barriers to Gene-Transfer by a Cationic Lipid. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 18997-19007.
330. Pouton, C. W.; Lucas, P.; Thomas, B. J.; Uduehi, A. N.; Milroy, D. A.; Moss, S. H., Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *Journal of Controlled Release* **1998**, *53*, 289-299.
331. Audouy, S.; Hoekstra, D., Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo. *Molecular Membrane Biology* **2001**, *18*, 129-143.
332. Liu, F.; Qi, H.; Huang, L.; Liu, D., Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Therapy* **1997**, *4*, 517-523.
333. Song, Y. K.; Liu, F.; Chu, S. Y.; Liu, D. X., Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Human Gene Therapy* **1997**, *8*, 1585-1594.
334. Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; Debs, R., Systemic Gene-Expression after Intravenous DNA Delivery into Adult Mice. *Science* **1993**, *261*, 209-211.

335. Templeton, N. S.; Lasic, D. D.; Frederik, P. M.; Strey, H. H.; Roberts, D. D.; Pavlakis, G. N., Improved DNA: Liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology* **1997**, *15*, 647-652.
336. Nabel, G. J.; Chang, A. E.; Nabel, E. G.; Plautz, G. E.; Ensminger, W.; Fox, B. A.; Felgner, P.; Shu, S. Y.; Cho, K., Immunotherapy for Cancer by Direct Gene-Transfer into Tumors. *Human Gene Therapy* **1994**, *5*, 57-77.
337. Vogelzang, N. J.; Lestingi, T. M.; Sudakoff, G., Phase-I Study of Immunotherapy of Metastatic Renal-Cell Carcinoma by Direct Gene-Transfer into Metastatic Lesions. *Human Gene Therapy* **1994**, *5*, 1357-1370.
338. Sorscher, E. J.; Logan, J. J.; Frizzell, R. A.; Lyrene, R. K.; Bebok, Z.; Dong, J. Y.; Duvall, M. D.; Felgner, P. L.; Matalon, S.; Walker, L.; Wiatrak, B. J., Gene-Therapy for Cystic-Fibrosis Using Cationic Liposome-Mediated Gene-Transfer - a Phase-I Trial of Safety and Efficacy in the Nasal Airway. *Human Gene Therapy* **1994**, *5*, 1259-1277.
339. Laitinen, M.; Hartikainen, J.; Hiltunen, M. O.; Eranen, J.; Kiviniemi, M.; Narvanen, O.; Makinen, K.; Manninen, H.; Syvanne, M.; Martin, J. F.; Laakso, M.; Yla-Herttuala, S., Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Human Gene Therapy* **2000**, *11*, 263-270.
340. Gregoriadis, G.; Saffie, R.; deSouza, J. B., Liposome-mediated DNA vaccination. *Febs Letters* **1997**, *402*, 107-110.
341. Perrie, Y.; Frederik, P. M.; Gregoriadis, G., Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. *Vaccine* **2001**, *19*, 3301-3310.
342. Freimark, B. D.; Blezinger, H. P.; Florack, V. J.; Nordstrom, J. L.; Long, S. D.; Deshpande, D. S.; Nochumson, S.; Petrak, K. L., Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid: Cationic lipid complexes. *Journal of Immunology* **1998**, *160*, 4580-4586.
343. Audouy, S. A. L.; de Leij, L.; Hoekstra, D.; Molema, G., In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 1599-1605.
344. Tousignant, J. D.; Gates, A. L.; Ingram, L. A.; Johnson, C. L.; Nietupski, J. B.; Cheng, S. H.; Eastman, S. J.; Scheule, R. K., Comprehensive analysis of the acute

- toxicities induced by systemic administration of cationic lipid: Plasmid DNA complexes in mice. *Human Gene Therapy* **2000**, 11, 2493-2513.
345. Ruiz, F. E.; Clancy, J. P.; Perricone, M. A.; Bebok, Z.; Hong, J. S.; Cheng, S. H.; Meeker, D. P.; Young, K. R.; Schoumacher, R. A.; Weatherly, M. R.; Wing, L.; Morris, J. E.; Sindel, L.; Rosenberg, M.; van Ginkel, F. W.; McGhee, J. R.; Kelly, D.; Lyrene, R. K.; Sorscher, E. J., A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Human Gene Therapy* **2001**, 12, 751-761.
346. De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E., Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research* **2000**, 17, 113-126.
347. Karak, N.; Maiti, S., Dendritic polymers: A class of novel material. *Journal of Polymer Materials* **1997**, 14, 105-&.
348. Gonscho, A.; Irie, K.; Susaki, H.; Iwasawa, H.; Okuno, S.; Sugawara, T., Tissue-Targeting Ability of Saccharide-Poly(L-Lysine) Conjugates. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **1994**, 17, 275-282.
349. Corsi, K.; Chellat, F.; Yahia, L.; Fernandes, J. C., Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* **2003**, 24, 1255-1264.
350. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D., Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, 12349-12354.
351. Anderson, D. G.; Akinc, A.; Hossain, N.; Langer, R., Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Molecular Therapy* **2005**, 11, 426-434.
352. Belting, M.; Persson, S.; Fransson, L. A., Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochemical Journal* **1999**, 338, 317-323.
353. Duguid, J. G.; Li, C.; Shi, M.; Logan, M. J.; Alila, H.; Rolland, A.; Tomlinson, E.; Sparrow, J. T.; Smith, L. C., A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophysical Journal* **1998**, 74, 2802-2814.

354. Son, K. K.; Tkach, D.; Patel, D. H., Zeta potential of transfection complexes formed in serum-free medium call predict in vitro gene transfer efficiency of transfection reagent. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2000**, 1468, 11-14.
355. Tang, M. X.; Szoka, F. C., The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy* **1997**, 4, 823-832.
356. Haensler, J.; Szoka, F. C., Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, 4, 372-379.
357. Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A., DNA Complexes with Polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6, 7-20.
358. Bloomfield, V. A., DNA condensation. *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, 6, 334-341.
359. Bloomfield, V. A., Condensation of DNA by Multivalent Cations - Considerations on Mechanism. *Biopolymers* **1991**, 31, 1471-1481.
360. Schellman, J. A., The Flexibility of DNA .2. Spontaneous and Ligand Induced Distortions. *Biophysical Chemistry* **1980**, 11 , 329-337.
361. Schellman, J. A., The Flexibility of DNA .1. Thermal Fluctuations. *Biophysical Chemistry* **1980**, 11, 321-328.
362. Widom, J.; Baldwin, R. L., Cation-Induced Toroidal Condensation of DNA Studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. *Journal of Molecular Biology* **1980**, 144, 431-453.
363. Wilson, R. W.; Bloomfield, V. A., Counter-Ion-Induced Condensation of Deoxyribonucleic-Acid - Light-Scattering Study. *Biochemistry* **1979**, 18, 2192-2196.
364. Arscott, P. G.; Li, A. Z.; Bloomfield, V. A., Condensation of DNA by Trivalent Cations .1. Effects of DNA Length and Topology on the Size and Shape of Condensed Particles. *Biopolymers* **1990**, 30, 619-630.
365. Hud, N. V.; Milanovich, F. P.; Balhorn, R., Evidence of Novel Secondary Structure in DNA-Bound Protamine Is Revealed by Raman-Spectroscopy. *Biochemistry* **1994**, 33, 7528-7535.
366. Park, S. Y.; Harries, D.; Gelbart, W. M., Topological defects and the optimum size of DNA condensates. *Biophysical Journal* **1998**, 75, 714-720.

367. Reich, Z.; Ghirlando, R.; Minsky, A., Secondary Conformational Polymorphism of Nucleic-Acids as a Possible Functional Link between Cellular-Parameters and DNA Packaging Processes. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7828-7836.
368. Kim, W. J.; Ishihara, T.; Akaike, T.; Maruyama, A., Comb-type cationic copolymer expedites DNA strand exchange while stabilizing DNA duplex. *Chemistry-a European Journal* **2001**, *7*, 176-180.
369. Sato, Y. I.; Kobayashi, Y.; Kamiya, T.; Watanabe, H.; Akaike, T.; Yoshikawa, K.; Maruyama, A., The effect of backbone structure on polycation comb-type copolymer/DNA interactions and the molecular assembly of DNA. *Biomaterials* **2005**, *26*, 703-711.
370. Bielinska, A. U.; KukowskaLatallo, J. F.; Baker, J. R., The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1997**, *1353*, 180-190.
371. Wolfert, M. A.; Seymour, L. W., Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 269-273.
372. Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W., Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Human Gene Therapy* **1996**, *7*, 2123-2133.
373. MacLaughlin, F. C.; Mumper, R. J.; Wang, J. J.; Tagliaferri, J. M.; Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Rolland, A. P., Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release* **1998**, *56*, 259-272.
374. Golan, R.; Pietrasanta, L. I.; Hsieh, W.; Hansma, H. G., DNA toroids: Stages in condensation. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14069-14076.
375. Bloomfield, V. A., DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269-282.
376. Hud, N. V.; Vilfan, I. D., Toroidal DNA condensates: Unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 295-318.

377. Marx, K. A.; Ruben, G. C., Studies of DNA Organization in Hydrated Spermidine-Condensed DNA Toruses and Spermidine-DNA Fibers. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **1984**, 1, 1109-1132.
378. Schellman, J. A.; Parthasarathy, N., X-Ray-Diffraction Studies on Cation-Collapsed DNA. *Journal of Molecular Biology* **1984**, 175, 313-329.
379. Hud, N. V.; Downing, K. H.; Balhorn, R., A Constant Radius of Curvature Model for the Organization of DNA in Toroidal Condensates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, 3581-3585.
380. Hud, N. V., Double-Stranded DNA Organization in Bacteriophage Heads - an Alternative Toroid-Based Model. *Biophysical Journal* **1995**, 69, 1355-1362.
381. Hud, N. V.; Downing, K. H., Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: The fine structure of DNA toroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 14925-14930.
382. Bottcher, C.; Endisch, C.; Fuhrhop, J. H.; Catterall, C.; Eaton, M., High-yield preparation of oligomeric C-type DNA toroids and their characterization by cryoelectron microscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 12-17.
383. Plum, G. E.; Arscott, P. G.; Bloomfield, V. A., Condensation of DNA by Trivalent Cations .2. Effects of Cation Structure. *Biopolymers* **1990**, 30, 631-643.
384. Adami, R. C.; Collard, W. T.; Gupta, S. A.; Kwok, K. Y.; Bonadio, J.; Rice, K. G., Stability of peptide condensed plasmid DNA formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 87, 678-683.
385. Vasilevskaya, V. V.; Khokhlov, A. R.; Kidoaki, S.; Yoshikawa, K., Structure of collapsed persistent macromolecule: Toroid vs spherical globule. *Biopolymers* **1997**, 41, 51-60.
386. Manning, G. S., Thermodynamic Stability Theory for DNA Doughnut Shapes Induced by Charge Neutralization. *Biopolymers* **1980**, 19, 37-59.
387. He, S. Q.; Arscott, P. G.; Bloomfield, V. A., Condensation of DNA by multivalent cations: Experiment studies of condensation kinetics. *Biopolymers* **2000**, 53, 329-341.
388. Sakaue, T.; Yoshikawa, K., Folding/unfolding kinetics on a semiflexible polymer chain. *Journal of Chemical Physics* **2002**, 117, 6323-6330.

389. Noguchi, H.; Yoshikawa, K., Folding path in a semiflexible homopolymer chain: A Brownian dynamics simulation. *Journal of Chemical Physics* **2000**, 113, 854-862.
390. Su, T. J.; Theofanidou, E.; Arlt, J.; Dryden, D. T. F.; Crain, J., Single molecule fluorescence imaging and its application to the study of DNA condensation. *Journal of Fluorescence* **2004**, 14, 65-69.
391. Brewer, L. R.; Corzett, M.; Balhorn, R., Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* **1999**, 286, (5437), 120-123.
392. Stevens, M. J., Bundle binding in polyelectrolyte solutions. *Physical Review Letters* **1999**, 82, 101-104.
393. Zhong, Z. Y.; Song, Y.; Engbersen, J. F. J.; Lok, M. C.; Hennink, W. E.; Feijen, J., A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s. *Journal of Controlled Release* **2005**, 109, 317-329.
394. Choi, Y. H.; Liu, F.; Choi, J. S.; Kim, S. W.; Park, J. S., Characterization of a targeted gene carrier, lactose-polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine, and its complex with plasmid DNA. *Human Gene Therapy* **1999**, 10, 2657-2665.
395. Prabha, S.; Zhou, W. Z.; Panyam, J.; Labhasetwar, V., Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 244, 105-115.
396. Wagner, E.; Cotten, M.; Foisner, R.; Birnstiel, M. L., Transferrin Polycation DNA Complexes - the Effect of Polycations on the Structure of the Complex and DNA Delivery to Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, 88, 4255-4259.
397. Ogris, M.; Steinlein, P.; Kursa, M.; Mechtler, K.; Kircheis, R.; Wagner, E., The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy* **1998**, 5, 1425-1433.
398. Okuda, T.; Kidoaki, S.; Ohsaki, M.; Koyama, Y.; Yoshikawa, K.; Niidome, T.; Aoyagi, H., Time-dependent complex formation of dendritic poly(L-lysine) with plasmid DNA and correlation with in vitro transfection efficiencies. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 1270-1273.
399. Ogris, M.; Steinlein, P.; Carotta, S.; Brunner, S.; Wagner, E., DNA/polyethylenimine transfection particles: Influence of ligands, polymer size, and PEGylation on international and gene expression. *Aaps Pharmsci* **2001**, 3, art. no.-21.

400. Grosse, S.; Aron, Y.; Thevenot, G.; Francois, D.; Monsigny, M.; Fajac, I., Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *Journal of Gene Medicine* **2005**, *7*, 1275-1286.
401. Pelkmans, L.; Helenius, A., Endocytosis via caveolae. *Traffic* **2002**, *3*, 311-320.
402. Kircheis, R.; Wightman, L.; Wagner, E., Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *53*, 341-358.
403. Mahato, R. I.; Takakura, Y.; Hashida, M., Nonviral vectors for in vivo gene delivery: Physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1997**, *14*, 133-172.
404. Lubyphelps, K.; Castle, P. E.; Taylor, D. L.; Lanni, F., Hindered Diffusion of Inert Tracer Particles in the Cytoplasm of Mouse 3t3 Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 4910-4913.
405. Nigg, E. A., Nucleocytoplasmic transport: Signals, mechanisms and regulation. *Nature* **1997**, *386*, 779-787.
406. Suh, J.; Dawson, M.; Hanes, J., Real-time multiple-particle tracking: applications to drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, (1), 63-78.
407. Suh, J.; Wirtz, D.; Hanes, J., Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 3878-3882.
408. Page, R. L.; Butler, S. P.; Subramanian, A.; Gwazdauskas, F. C.; Johnson, J. L.; Velander, W. H., Transgenesis in Mice by Cytoplasmic Injection of Polylysine/DNA Mixtures. *Transgenic Research* **1995**, *4*, 353-360.
409. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 5177-5181.
410. Colin, M.; Maurice, M.; Trugnan, G.; Kornprobst, M.; Harbottle, R. P.; Knight, A.; Cooper, R. G.; Miller, A. D.; Capeau, J.; Coutelle, C.; Brahimi-Horn, M. C., Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. *Gene Therapy* **2000**, *7*, 139-152.
411. Fisher, K. D.; Ulbrich, K.; Subr, V.; Ward, C. M.; Mautner, V.; Blakey, D.; Seymour, L. W., A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry

- of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Therapy* **2000**, 7, 1337-1343.
412. Xu, Y. H.; Szoka, F. C., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **1996**, 35, 5616-5623.
413. Hiemenz, P. C., Principles of Colloid and Surface **1986**, Chemistry, 2nd edn. Marcel Dekker: New York.
414. Braunlin, W. H.; Strick, T. J.; Record, M. T., Equilibrium Dialysis Studies of Polyamine Binding to DNA. *Biopolymers* **1982**, 21, 1301-1314.
415. Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E., Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 30, 97-113.
416. Perales, J. C.; Grossmann, G. A.; Molas, M.; Liu, G.; Ferkol, T.; Harpst, J.; Oda, H.; Hanson, R. W., Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 7398-7407.
417. Izumrudov, V. A.; Wahlund, P. O.; Gustavsson, P. E.; Larsson, P. O.; Galaev, I. Y., Factors controlling phase separation in water-salt solutions of DNA and polycations. *Langmuir* **2003**, 19, 4733-4739.
418. Toncheva, V.; Wolfert, M. A.; Dash, P. R.; Oupicky, D.; Ulbrich, K.; Seymour, L. W.; Schacht, E. H., Novel Vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1998**, 1380, 354-368.
419. Katayose, S.; Kataoka, K., Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, 702-707.
420. Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A., Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: Physicochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 30, 49-60.
421. Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V.; Kargov, S. I.; Zezin, A. B.; Kabanov, V. A., Competitive reactions in solutions of DNA-containing polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia* **1996**, 106, 179-192.

422. Arigita, C.; Zuidam, N. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. *Pharmaceutical Research* **1999**, *16*, 1534-1541.
423. Wink, T.; de Beer, J.; Hennink, W. E.; Bult, A.; van Bennekom, W. P., Interaction between plasmid DNA and cationic polymers studied by surface plasmon resonance spectrometry. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 801-805.
424. Marcusson, E. G.; Bhat, B.; Manoharan, M.; Bennett, C. F.; Dean, N. M., Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, 2016-2023.
425. Boussif, O.; Zanta, M. A.; Behr, J. P., Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 1074-1080.
426. Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; Peterson, H.; Bickel, U.; Voigt, K.; Kissel, T., Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *Journal of Controlled Release* **2003**, *89*, 113-125.
427. Yang, J. P.; Huang, L., Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 542-548.
428. Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C.; Wagner, E., Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Human Gene Therapy* **1996**, *7*, 1437-1446.
429. Kircheis, R.; Schuller, S.; Brunner, S.; Ogris, M.; Heider, K. H.; Zauner, W.; Wagner, E., Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *Journal of Gene Medicine* **1999**, *1*, 111-120.
430. Diebold, S. S.; Lehrmann, H.; Kursa, M.; Wagner, E.; Cotten, M.; Zenke, M., Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Human Gene Therapy* **1999**, *10*, 775-786.
431. Kalams, S. A.; Walker, B. D., The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, *188*, 2199-2204.

432. Ramsay, E.; Hadgraft, J.; Birchall, J.; Gumbleton, M., Examination of the biophysical interaction between plasmid DNA and the polycations, polylysine and polyornithine, as a basis for their differential gene transfection in-vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 210, 97-107.
433. Forrest, M. L.; Pack, D. W., On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: Implications for gene delivery vector design. *Molecular Therapy* **2002**, 6, (1), 57-66.
434. Wagner, E.; Curiel, D.; Cotten, M., Delivery of Drugs, Proteins and Genes into Cells Using Transferrin as a Ligand for Receptor-Mediated Endocytosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1994**, 14, 113-135.
435. Cotten, M.; Langlerouault, F.; Kirlappos, H.; Wagner, E.; Mechtler, K.; Zenke, M.; Beug, H.; Birnstiel, M. L., Transferrin Polycation-Mediated Introduction of DNA into Human Leukemic-Cells - Stimulation by Agents That Affect the Survival of Transfected DNA or Modulate Transferrin Receptor Levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, 4033-4037.
436. Ferkol, T.; Perales, J. C.; Eckman, E.; Kaetzel, C. S.; Hanson, R. W.; Davis, P. B., Gene-Transfer into the Airway Epithelium of Animals by Targeting the Polymeric Immunoglobulin Receptor. *Journal of Clinical Investigation* **1995**, 95, (2), 493-502.
437. Ferkol, T.; PellicenaPalle, A.; Eckman, E.; Perales, J. C.; Trzaska, T.; Tosi, M.; Redline, R.; Davis, P. B., Immunologic responses to gene transfer into mice via the polymeric immunoglobulin receptor. *Gene Therapy* **1996**, 3, 669-678.
438. Wu, G. Y.; Wilson, J. M.; Shalaby, F.; Grossman, M.; Shafritz, D. A.; Wu, C. H., Receptor-Mediated Gene Delivery In vivo - Partial Correction of Genetic Analbuminemia in Nagase Rats. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 14338-14342.
439. Wu, C. H.; Wilson, J. M.; Wu, G. Y., Targeting Genes - Delivery and Persistent Expression of a Foreign Gene Driven by Mammalian Regulatory Elements In vivo. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, 16985-16987.
440. Ferkol, T.; Perales, J. C.; Mularo, F.; Hanson, R. W., Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, 101-105.
441. Perales, J. C.; Ferkol, T.; Beegen, H.; Ratnoff, O. D.; Hanson, R. W., Gene-Transfer in-Vivo - Sustained Expression and Regulation of Genes Introduced into the Liver by

- Receptor-Targeted Uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 4086-4090.
442. Wu, G., Wu, CH .; , Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* **1988**, 263, 14621-4.
443. Coll, J. L.; Chollet, P.; Brambilla, E.; Desplanques, D.; Behr, J. P.; Favrot, M., In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Human Gene Therapy* **1999**, 10, 1659-1666.
444. Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y. X.; Elsasser, H. P.; Kissel, T., A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research* **1999**, 16, 1273-1279.
445. Suh, J.; Paik, H. J.; Hwang, B. K., Ionization of Poly(Ethylenimine) and Poly(Allylamine) at Various Phs. *Bioorganic Chemistry* **1994**, 22, 318-327.
446. Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; Demeneix, B. A., A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: Polyethylenimine. *Human Gene Therapy* **1996**, 7, 1947-1954.
447. Godbey, W. T.; Barry, M. A.; Saggau, P.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 51, 321-328.
448. Kichler, A.; Leborgne, C.; Coeytaux, E.; Danos, O., Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *Journal of Gene Medicine* **2001**, 3, 135-144.
449. MeunierDurmort, C.; Grimal, H.; Sachs, L. M.; Demeneix, B. A.; Forest, C., Adenovirus enhancement of polyethylenimine-mediated transfer of regulated genes in differentiated cells. *Gene Therapy* **1997**, 4, 808-814.
450. Baker, A.; Saltik, M.; Lehrmann, H.; Killisch, I.; Mautner, V.; Lamm, G.; Christofori, G.; Cotten, M., Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Therapy* **1997**, 4, 773-782.
451. Guerra-Crespo, M.; Charli, J. L.; Rosales-Garcia, V. H.; Pedraza-Alva, G.; Perez-Martinez, L., Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *Journal of Neuroscience Methods* **2003**, 127, 179-192.

452. Boletta, A.; Benigni, A.; Lutz, J.; Remuzzi, G.; Soria, M. R.; Monaco, L., Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Human Gene Therapy* **1997**, *8*, 1243-1251.
453. Lee, C. H.; Ni, Y. H.; Chen, C. C.; Chou, C. K.; Chang, F. H., Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2003**, *1611*, 55-62.
454. Regnstrom, K.; Ragnarsson, E. G. E.; Fryknas, M.; Koping-Hoggard, M.; Artursson, P., Gene expression profiles in mouse lung tissue after administration of two cationic polymers used for nonviral gene delivery. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 475-482.
455. Densmore, C. L.; Orson, F. M.; Xu, B.; Kinsey, B. M.; Waldrep, J. C.; Hua, P.; Bhogal, B.; Knight, V., Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Molecular Therapy* **2000**, *1*, 180-188.
456. Gharwan, H.; Wightman, L.; Kircheis, R.; Wagner, E.; Zatloukal, K., Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA). *Gene Therapy* **2003**, *10*, 810-817.
457. Rudolph, C.; Ortiz, A.; Schillinger, U.; Jauernig, J.; Plank, C.; Rosenecker, J., Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application. *Journal of Gene Medicine* **2005**, *7*, 59-66.
458. Rudolph, C.; Schillinger, U.; Ortiz, A.; Plank, C.; Golas, M. M.; Sander, B.; Stark, H.; Rosenecker, J., Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Molecular Therapy* **2005**, *12*, 493-501.
459. Chollet, P.; Favrot, M. C.; Hurbin, A.; Coll, J. L., Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *Journal of Gene Medicine* **2002**, *4*, 84-91.
460. Uduehi, A. N.; Stammberger, U.; Kubisa, B.; Gugger, M.; Buehler, T. A.; Schmid, R. A., Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Molecular Therapy* **2001**, *4*, 52-57.
461. Gautam, A.; Densmore, C. L.; Waldrep, J. C., Pulmonary cytokine responses associated with PEI-DNA aerosol gene therapy. *Gene Therapy* **2001**, *8*, 254-257.

462. Richardson, S. C. W.; Patrick, N. G.; Man, Y. K. S.; Ferruti, P.; Duncan, R., Poly(amidoamine)s as potential nonviral vectors: Ability to form interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1023-1028.
463. KukowskaLatallo, J. F.; Bielinska, A. U.; Johnson, J.; Spindler, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 4897-4902.
464. Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C., In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, (6), 703-714.
465. Turunen, M. P.; Hiltunen, M. O.; Ruponen, M.; Virkamaki, L.; Szoka, F. C.; Urtti, A.; Yla-Herttuala, S., Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes. *Gene Therapy* **1999**, *6*, 6-11.
466. Fischer, D.; Li, Y. X.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T., In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121-1131.
467. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A., The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *252*, 263-266.
468. Maruyama-Tabata, H.; Harada, Y.; Matsumura, T.; Satoh, E.; Cui, F.; Iwai, M.; Kita, M.; Hibi, S.; Imanishi, J.; Sawada, T.; Mazda, O., Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Therapy* **2000**, *7*, 53-60.
469. Qin, L. H.; Pahud, D. R.; Ding, Y. Z.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R.; Bromberg, J. S., Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by starburst polyamidoamine dendrimers. *Human Gene Therapy* **1998**, *9*, 553-560.
470. Cooper, J. A. D.; Zitnik, R. J.; Matthay, R. A., Mechanisms of Drug-Induced Pulmonary-Disease. *Annual Review of Medicine* **1988**, *39*, 395-404.
471. Hejazi, R.; Amiji, M., Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2003**, *89*, 151-165.
472. Richardson, S. C. W.; Kolbe, H. J. V.; Duncan, R., Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to

- complex and protect DNA. *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, 178, 231-243.
473. Danielsen, S.; Varum, K. M.; Stokke, B. T., Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: Influence of chitosan molecular parameters. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 928-936.
474. Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A. N.; Davis, S. S., Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 51, 81-96.
475. Erbacher, P.; Zou, S. M.; Bettinger, T.; Steffan, A. M.; Remy, J. S., Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research* **1998**, 15, 1332-1339.
476. Sato, T.; Ishii, T.; Okahata, Y., In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* **2001**, 22, 2075-2080.
477. Mansouri, S.; Lavigne, P.; Corsi, K.; Benderdour, M.; Beaumont, E.; Fernandes, J. C., Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, 1-8.
478. Koping-Hoggard, M.; Mel'nikova, Y. S.; Varum, K. M.; Lindman, B.; Artursson, P., Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *Journal of Gene Medicine* **2003**, 5, 130-141.
479. Xu, W.; Shen, Y.; Jiang, Z. G.; Wang, Y.; Chu, Y. W.; Xiong, S. D., Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection. *Vaccine* **2004**, 22, 3603-3612.
480. Roy, K.; Mao, H. Q.; Huang, S. K.; Leong, K. W., Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* **1999**, 5, 387-391.
481. Guliyeva, U.; Oner, F.; Ozsoy, S.; Hazirolu, R., Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2006**, 62, 17-25.

482. Okamoto, H.; Nishida, S.; Todo, H.; Sakakura, Y.; Iida, K.; Danjo, K., Pulmonary gene delivery by chitosan-pDNA complex powder prepared by a supercritical carbon dioxide process. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *92*, 371-380.
483. Romoren, K.; Thu, B. J.; Evensen, O., Immersion delivery of plasmid DNA II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Journal of Controlled Release* **2002**, *85*, 215-225.
484. Kumar, M.; Behera, A. K.; Lockey, R. F.; Zhang, J.; Bhullar, G.; De La Cruz, C. P.; Chen, L. C.; Leong, K. W.; Huang, S. K.; Mohapatra, S. S., Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. *Human Gene Therapy* **2002**, *13*, 1415-1425.
485. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M., Lipofection - a Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 7413-7417.
486. Behr, J. P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **1997**, *51*, 34-36.
487. Bennis, J. M.; Choi, J. S.; Mahato, R. I.; Park, J. S.; Kim, S. W., pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, *11*, 637-645.
488. Plank, C.; Oberhauser, B.; Mechtler, K.; Koch, C.; Wagner, E., The Influence of Endosome-Disruptive Peptides on Gene-Transfer Using Synthetic Virus-Like Gene-Transfer Systems. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 12918-12924.
489. Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Birnstiel, M. L., Influenza-Virus Hemagglutinin-Ha-2 N-Terminal Fusogenic Peptides Augment Gene-Transfer by Transferrin Polylysine DNA Complexes - toward a Synthetic Virus-Like Gene-Transfer Vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 7934-7938.
490. Lear, J. D.; Degrado, W. F., Membrane-Binding and Conformational Properties of Peptides Representing the Nh2 Terminus of Influenza Ha-2. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 6500-6505.

491. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik, M.; Wagner, E., Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Therapy* **2000**, *7*, (5), 401-407.
492. Dean, D. A., Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Experimental Cell Research* **1997**, *230*, 293-302.
493. Ciolina, C.; Byk, G.; Blanche, F.; Thuillier, V.; Scherman, D.; Wils, P., Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 49-55.
494. Escriou, V.; Carriere, M.; Scherman, D.; Wils, P., NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 295-306.
495. Fritz, J. D.; Herweijer, H.; Zhang, G. F.; Wolff, J. A., Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Human Gene Therapy* **1996**, *7*, 1395-1404.
496. Ludtke, J. J.; Zhang, G. F.; Sebestyen, M. G.; Wolff, J. A., A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *Journal of Cell Science* **1999**, *112*, 2033-2041.
497. Blomberg, P.; Eskandarpour, M.; Xia, S.; Sylven, C.; Islam, K. B., Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *298*, 505-510.
498. Young, J. L.; Benoit, J. N.; Dean, D. A., Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Therapy* **2003**, *10*, 1465-1470.
499. Boulanger, C.; Di Giorgio, C.; Vierling, P., Synthesis of acridine-nuclear localization signal (NLS) conjugates and evaluation of their impact on lipoplex and polyplex-based transfection. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *40*, 1295-1306.
500. Carlisle, R. C.; Bettinger, T.; Ogris, M.; Hale, S.; Mautner, V.; Seymour, L. W., Adenovirus hexon protein enhances nuclear delivery and increases transgene expression of polyethylenimine/plasmid DNA vectors. *Molecular Therapy* **2001**, *4*, 473-483.

501. Eguchi, A.; Furusawa, H.; Yamamoto, A.; Akuta, T.; Hasegawa, M.; Okahata, Y.; Nakanishi, M., Optimization of nuclear localization signal for nuclear transport of DNA-encapsulating particles. *Journal of Controlled Release* **2005**, 104, 507-519.
502. O'Hagan, D. T.; Singh, M.; Ulmer, J. B., Microparticles for the delivery of DNA vaccines. *Immunological Reviews* **2004**, 199, 191-200.
503. Egan, M. A.; Chong, S. Y.; Megati, S.; Montefiori, D. C.; Rose, N. F.; Boyer, J. D.; Sidhu, M. K.; Quiroz, J.; Rosati, M.; Schadeck, E. B.; Pavlakis, G. N.; Weiner, D. B.; Rose, J. K.; Israel, Z. R.; Udem, S. A.; Eldridge, J. H., Priming with plasmid DNAs expressing interleukin-12 and simian immunodeficiency virus gag enhances the immunogenicity and efficacy of an experimental AIDS vaccine based on recombinant vesicular stomatitis virus. *Aids Research and Human Retroviruses* **2005**, 21, 629-643.
504. Kim, J. J.; Maguire, H. C.; Nottingham, L. K.; Morrison, L. D.; Tsai, A.; Sin, J. I.; Chalian, A. A.; Weiner, D. B., Coadministration of IL-12 or IL-10 expression cassettes drives immune responses toward a Th1 phenotype. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **1998**, 18, 537-547.
505. Kim, J. J.; Nottingham, L. K.; Tsai, A.; Lee, D. J.; Maguire, H. C.; Oh, J.; Dentchev, T.; Manson, K. H.; Wyand, M. S.; Agadjanyan, M. G.; Ugen, K. E.; Weiner, D. B., Antigen-specific humoral and cellular immune responses can be modulated in rhesus macaques through the use of IFN-gamma, IL-12, or IL-18 gene adjuvants. *Journal of Medical Primatology* **1999**, 28, 214-223.
506. Kim, J. J.; Yang, J. S.; VanCott, T. C.; Lee, D. J.; Manson, K. H.; Wyand, M. S.; Boyer, J. D.; Ugen, K. E.; Weiner, D. B., Modulation of antigen-specific humoral responses in rhesus macaques by using cytokine cDNAs as DNA vaccine adjuvants. *Journal of Virology* **2000**, 74, 3427-3429.
507. Kim, J. J.; Simbiri, K. A.; Sin, J. I.; Dang, K. S.; Oh, J.; Dentchev, T.; Lee, D.; Nottingham, L. K.; Chalian, A. A.; McCallus, D.; Ciccarelli, R.; Agadjanyan, M. G.; Weiner, D. B., Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **1999**, 19, 77-84.
508. Boyer, J. D.; Kim, J.; Ugen, K.; Cohen, A. D.; Ahn, L.; Schumann, K.; Lacy, K.; Bagarazzi, M. L.; Javadian, A.; Ciccarelli, R. B.; Ginsberg, R. S.; MacGregor, R. R.; Weiner, D. B., HIV-1 DNA vaccines and chemokines. *Vaccine* **1999**, 17, S53-S64.

509. Yoon, H. A.; Aleyas, A. G.; George, J. A.; Park, S. O.; Han, Y. W.; Lee, J. H.; Cho, J. G.; Eo, S. K., Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylactic DNA vaccine against pseudorabies virus through enhanced immune responses. *Microbiology and Immunology* **2006**, *50*, 83-92.
510. Nobiron, I.; Thompson, I.; Brownlie, J.; Collins, M. E., Cytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine* **2001**, *19*, 4226-4235.
511. Hu, J. F.; Cladel, N. M.; Wang, Z. H.; Han, R. C.; Pickel, M. D.; Christensen, N. D., GM-CSF enhances protective immunity to cottontail rabbit papillomavirus E8 genetic vaccination in rabbits. *Vaccine* **2004**, *22*, 1124-1130.
512. Kim, J. J.; Tsai, A.; Nottingham, L. K.; Morrison, L.; Cunning, D. M.; Oh, J.; Lee, D. J.; Dang, K.; Dentchev, T.; Chalian, A. A.; Agadjanyan, M. G.; Weiner, D. B., Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **1999**, *103*, 869-877.
513. Xin, K. Q.; Lu, Y.; Hamajima, K.; Fukushima, J.; Yang, J.; Inamura, K.; Okuda, K., Immunization of RANTES expression plasmid with a DNA vaccine enhances HIV-1-specific immunity. *Clinical Immunology* **1999**, *92*, 90-96.
514. Lu, Y.; Xin, K. Q.; Hamajima, K.; Tsuji, T.; Aoki, I.; Yang, J.; Sasaki, S.; Fukushima, J.; Yoshimura, T.; Toda, S.; Okada, E.; Okuda, K., Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1. *Clinical and Experimental Immunology* **1999**, *115*, 335-341.
515. Chattergoon, M. A.; Kim, J. J.; Yang, J. S.; Robinson, T. M.; Lee, D. J.; Dentchev, T.; Wilson, D. M.; Ayyavoo, V.; Weiner, D. B., Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 974-979.
516. Zhang, A. L.; Jin, H. L.; Zhang, F. C.; Ma, Z. H.; Tu, Y. X.; Ren, Z. H.; Zhang, X. Y.; Zhu, K. C.; Wang, B., Effects of multiple copies of CpG on DNA vaccination. *DNA and Cell Biology* **2005**, *24*, 292-298.
517. Kojima, Y.; Xin, K. Q.; Ooki, T.; Hamajima, K.; Oikawa, T.; Shinoda, K.; Ozaki, T.; Hoshino, Y.; Jounai, N.; Nakazawa, M.; Klinman, D.; Okuda, K., Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine* **2002**, *20*, 2857-2865.

518. Temperton, N. J.; Quenelle, D. C.; Lawson, K. M.; Zuckerman, J. N.; Kern, E. R.; Griffiths, P. D.; Emery, V. C., Enhancement of humoral immune responses to a human cytomegalovirus DNA vaccine: Adjuvant effects of aluminum phosphate and CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Medical Virology* **2003**, *70*, 86-90.
519. Lipford, G. B.; Bendigs, S.; Heeg, K.; Wagner, H., Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* **2000**, *101*, (46-52).
520. Mena, A.; Nichani, A. K.; Popowych, Y.; Ioannou, X. P.; Godson, D. L.; Mutwiri, G. K.; Hecker, R.; Babiuk, L. A.; Griebel, P., Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-oligodeoxynucleotide. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 245-259.
521. Verthelyi, D.; Ishii, K. J.; Gursel, M.; Takeshita, F.; Klinman, D. M., Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *Journal of Immunology* **2001**, *166*, 2372-2377.
522. Hanke, T.; Samuel, R. V.; Blanchard, T. J.; Neumann, V. C.; Allen, T. M.; Boyson, J. E.; Sharpe, S. A.; Cook, N.; Smith, G. L.; Watkins, D. I.; Cranage, M. P.; McMichael, A. J., Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *Journal of Virology* **1999**, *73*, 7524-7532.
523. Giri, M.; Ugen, K. E.; Weiner, D. B., DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clinical Microbiology Reviews* **2004**, *17*, (2), 370-+.
524. Otten, G. R.; Schaefer, M.; Doe, B.; Liu, H.; Srivastava, I.; zur Megede, J.; Kazzaz, J.; Lian, Y.; Singh, M.; Ugozzoli, M.; Montefiori, D.; Lewis, M.; Driver, D. A.; Dubensky, T.; Polo, J. M.; Donnelly, J.; O'Hagan, D. T.; Barnett, S.; Ulmer, J. B., Enhanced potency of plasmid DNA microparticle human immunodeficiency virus vaccines in rhesus macaques by using a priming-boosting regimen with recombinant proteins. *Journal of Virology* **2005**, *79*, 8189-8200.
525. Draper, S. J.; Moore, A. C.; Gilbert, S. C.; Hill, A. V. S., Complete protective immunity against blood-stage malaria induced by heterologous prime-boost vaccination. *Immunology* **2005**, *116*, 25-25.

526. Pal, R.; Wang, S. X.; Kalyanaraman, V. S.; Nair, B. C.; Whitney, S.; Keen, T.; Hocker, L.; Hudacik, L.; Rose, N.; Cristillo, A.; Mboudjeka, I.; Shen, S. Y.; Wu-Chou, T. H.; Montefiori, D.; Mascola, J.; Lu, S.; Markham, P., Polyvalent DNA prime and envelope protein boost HIV-1 vaccine elicits humoral and cellular responses and controls plasma viremia in rhesus macaques following rectal challenge with an R5 SHIV isolate. *Journal of Medical Primatology* **2005**, *34*, 226-236.
527. Demangel, C.; Zhou, J.; Choo, A. B. H.; Shoebridge, G.; Halliday, G. M.; Britton, W. J., Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells. *Molecular Immunology* **2005**, *42*, 979-985.
528. Boyle, J. S.; Brady, J. L.; Lew, A. M., Enhanced response to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* **1998**, *392*, 408-411.
529. Ross, R.; Sudowe, S.; Beisner, J.; Ross, X. L.; Ludwig-Portugall, I.; Steitz, J.; Tuting, T.; Knop, J.; Reske-Kunz, A. B., Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Therapy* **2003**, *10*, 1035-1040.
530. Sasaki, S.; Fukushima, J.; Arai, H.; Kusakabe, K. I.; Hamajima, K.; Ishii, N.; Hirahara, F.; Okuda, K.; Kawamoto, S.; Ruyschaert, J. M.; Vandenbranden, M.; Wahren, B.; Okuda, K., Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *European Journal of Immunology* **1997**, *27*, 3121-3129.
531. Toda, S.; Ishii, N.; Okada, E.; Kusakabe, K. I.; Arai, H.; Hamajima, K.; Gorai, I.; Nishioka, K.; Okuda, K., HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunology* **1997**, *92*, 111-117.
532. Lutsiak, M. E. C.; Robinson, D. R.; Coester, C.; Kwon, G. S.; Samuel, J., Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 1480-1487.
533. Newman, K. D.; Elamanchili, P.; Kwon, G. S.; Samuel, J., Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *60*, 480-486.

534. Denis-Mize, K. S.; Dupuis, M.; MacKichan, M. L.; Singh, M.; Doe, B.; O'Hagan, D.; Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; McDonald, D. M.; Ott, G., Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene Therapy* **2000**, *7*, 2105-2112.
535. O'Hagan, D.; Singh, M.; Ugozzoli, M.; Wild, C.; Barnett, S.; Chen, M. C.; Schaefer, M.; Doe, B.; Otten, G. R.; Ulmer, J. B., Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *Journal of Virology* **2001**, *75*, 9037-9043.
536. Kaur, R.; Rauthan, M.; Vrati, S., Immunogenicity in mice of a cationic microparticle-adsorbed plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein. *Vaccine* **2004**, *22*, 2776-2782.
537. Declercq, R.; van Aerschot, A.; Read, R. J.; Herdewijn, P.; van Meervelt, L., *Journal of the american chemical society* **2002**, *124*, 928-933.
538. Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H., *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 581-587.
539. Kuroda, K.; DeGrado, W. F., Amphiphilic polymethacrylate derivatives as antimicrobial agents. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4128-4129.