



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline :
Sciences du Vivant
Aspects Moléculaires et cellulaires de la Biologie

par Florent Meyer

Application des Multicouches de Polyélectrolytes au Transfert de Gène

Soutenue publiquement le 17 mars 2006

Membres du Jury :

Directeur de thèse :	Mme Joelle Ogier,	Professeur, UFR odontologie Strasbourg
Rapporteur interne :	M Philippe Mesini,	Docteur, ICS Strasbourg
Rapporteur externe :	M Michel Goldberg,	Professeur, UFR odontologie Paris V
Rapporteur externe :	M Antoine Kichler,	Docteur, Genethon UMR 815 Evry
Examineur :	M. Patrick Erbacher,	Docteur, Polyplus transfection Illkirch

A ma famille
Mes parents Marie-Rose et Michel
A Nanou et Patrice

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire de l'unité mixte de recherche INSERM ULP U595, Biomatériaux : processus biophysiques et biologiques aux interfaces. Je tiens à remercier son directeur, Monsieur le Docteur Jean-Claude Voegel, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie également Monsieur le professeur Youssef Haikel, Doyen de l'UFR Odontologie de Strasbourg, de m'avoir soutenu au cours de ces années de thèse.

Je remercie également le Professeur Joëlle Ogier de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir confié ce sujet, de ses conseils et son soutien tout au long de ce travail, en me laissant la liberté nécessaire à un épanouissement scientifique, avec un œil attentif pour canaliser ma fougue et mes dispersions . Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Je suis sensible à l'honneur que me font, Monsieur le professeur Michel Goldberg, Monsieur le Docteur Alain Kichler et Monsieur le Docteur Philippe Mesini de juger mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je les en remercie sincèrement.

Je remercie également Monsieur le Docteur Patrick Erbacher d'accepter de juger ce travail de thèse. Je l'assure de ma profonde gratitude et de ma reconnaissance.

Ce travail a été réalisé au sein d'une équipe de recherche dans laquelle j'ai pu trouver écoute et conseils. Je tiens à en remercier tous les membres :

Monsieur le professeur Pierre Schaaf, Monsieur le Docteur Bernard Senger pour leurs conseils et leur rigueur scientifique. Vous avez toujours su rester accessibles et prêts à partager votre savoir. Ce sont des qualités qu'un étudiant en thèse apprécie particulièrement.

Nadia Jessel pour m'avoir soutenu tout au long de ce travail. Ton dynamisme scientifique est stimulant et communicatif.

Vincent Ball (Monsieur le professeur), tu es le GO du labo toujours prêt à participer aux manip (youpi une manip de FTIR....), ainsi qu'aux joyeux délires. Tu as su éclairer bon nombre d'aspects de la physico-chimie, je t'en suis reconnaissant.

Christine, merci pour ton aide précieuse, surtout en fin de thèse, et ton investissement au cours de ce travail. Je t'en suis sincèrement reconnaissant.

Maria, благодаря, tu es une collègue de bureau attentionnée, tes conseils scientifiques m'ont été profitables (vestmentaires un peu moins). Je serai toujours là pour partager un grand moment de microscopie avec toi.

Sandra (maître Jedi) et Leila (son padawan) et René (maître Yoda), vous formez une fine équipe de biologistes moléculaires, merci d'avoir répondu à toutes mes questions.

Philippe et Dominique, les colocataires du troisième, merci pour m'avoir initié à la microscopie confocale et à l'AFM et pour votre enthousiasme.

Youri, merci pour ton aide, très précieuse, surtout en AFM et pour me rappeler avec ta dérision toute personnelle que finalement on est bien peu de chose. (une bonne fois pour toute, je n'ai jamais fait de jogging !)

A la communauté hétéroclite des thésards : Erell, Laurent, Damien, Grégory, Aurore, François, Bing, Nadia et Juan, compagnons de labeur.

Aux anciens : Eric, Amal, Ludovic, Fouzia (de retour parmi nous), Pascale, Anne-Laure, Christophe, Géraldine, Marion, pour tous les bons moments que nous avons passés.

Christiane, Géraldine, Cosette, Armelle, « les petites mains du labo » toujours prêtes à donner un coup de main (Aieeeee), merci pour toutes vos petites attentions.

M Lesot, Yves, Sabine, Joseph, Eric, Dmitry et M Fluck, merci pour votre sympathie.

Aux enseignants et personnels de la Faculté de Chirurgie Dentaire, aux assistant(e)s du deuxième : Cathy, Caroline, Dominique et Marc, les moments que j'ai passés en salle à côté de vous m'ont apporté beaucoup, tant cliniquement qu'humainement, merci de la gentillesse que vous m'avez témoignée.

A tous les membres de l'Orchestre Universitaire de Strasbourg, pour tous les moments que nous avons partagés. Les répétitions du lundi soir m'ont toujours donné la pêche pour toute ma semaine de travail.

Table des Matières

Remerciements	3
Table des Matières	6
Abbréviations	10
Introduction	12
Chapitre 1 : Revue Bibliographique	15
1. La transfection par vecteur synthétique	16
1.1 Thérapie génique et transfection : définitions	16
1.2 Choix du vecteur	16
1.3 Les vecteurs synthétiques	17
1.3.1 Généralités	17
1.3.2 Trafic intracellulaire des poly/lipoplexes	19
1.3.2.1 Endocytose	19
1.3.2.2 Translocation nucléaire	20
1.3.3 Les lipoplexes : les lipides cationiques	21
1.3.4 Les polyplexes : les polymères cationiques	23
1.3.4.1 Le Chitosane	23
1.3.4.2 La poly(L-lysine)	24
1.3.4.3 Les cyclodextrines	25
1.3.4.4 Les polymères thermosensibles	27
1.3.4.5 Les peptides	28
1.3.4.6 Les poly(amidoamine)	30
1.3.4.7 Le poly(éthylènimine)	32
1.3.4.8 Les polymères dégradables	35
1.3.5 Les vecteurs synthétiques : des outils modulables	37
1.3.5.1 Les barrières à une transfection efficace	37
1.3.5.2 Utilisation du poly(éthylène glycol)	38
1.3.5.3 Modifications permettant la localisation nucléaire	39
1.3.5.4 Augmentation de l'endocytose des complexes et ciblage cellulaire	42
1.3.5.5 Modifications permettant l'échappement des endosomes	42
2. Transfection locale in vivo	43
2.1 Technique de transfection locale par libération du matériel génétique depuis une matrice	44
2.2 La transfection en phase solide	46
3. Films multicouches de polyélectrolytes : interfaces à activité biologique modulable	48
3.1 Films multicouches de polyélectrolytes : principe	48
3.1.1 Principe de dépôt couche par couche	48
3.1.2 Croissance des films multicouches	50
3.1.2.1 Les films à croissance linéaire	50
3.1.2.2 Les films à croissance exponentielle	51
3.1.3 Nature du substrat et technique de dépôt	52
3.2 Comportement des multicouches de polyélectrolyte vis à vis du milieu biologique	54
3.2.1 Adhésion des protéines	54

3.2.2 Adhésion cellulaire	56
3.2.3 Stabilité/dégradabilité des films multicouches de polyélectrolytes dans un milieu biologique	58
3.3 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes	59
3.3.1 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolyte par des peptides ou des protéines	59
3.3.2 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolyte avec de l'ADN	60
3.3.2.1 Utilisation de l'ADN comme polyanion dans la construction de multicouches	60
3.3.2.2 Utilisation des multicouches de polyélectrolytes dans le cadre de la transfection	62

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes **64**

1. Matériel	66
1.1 Polyélectrolytes	66
1.1.1 polyélectrolytes utilisés pour la construction des multicouches	66
1.1.2 Poly(éthylènimine) utilisé comme vecteur de transfection	67
1.1.3 Poly(acide glutamique) couplé	68
1.1.3.1 PGA-Mannose	68
1.1.3.2 PGA-(10%)NDP-MSH	68
1.2 Plasmides	69
1.3 Cellules	71
2. Méthodes	71
2.1 Méthodes de caractérisation des multicouches de polyélectrolyte	71
2.1.1 Spectroscopie par guide d'onde optique	71
2.1.1.1 Principe	71
2.1.1.2 Dispositif expérimental	72
2.1.1.3 Protocole expérimental	73
2.1.1.4 Traitement du signal	74
2.1.2 Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier en mode totalement atténué	74
2.1.3 Microscopie à force atomique	77
2.1.3.1 Principe	77
2.1.3.2 Mode image	78
2.1.3.3 Procédure en mode image	78
2.1.4 Microscopie confocale	79
2.2 Méthodes de caractérisation des complexes	81
2.2.1 "Dynamic light scattering"	81
2.2.1.1 Principe	81
2.2.1.2 Déroulement d'une expérience	83
2.2.2 Mesure de potentiel zeta	83
2.2.2.1 Principe	83
2.2.2.2 Déroulement d'une expérience	85
2.2.3 Electromobilité en gel d'agarose	86
2.3 Construction des multicouches de polyélectrolyte	87
2.3.1 Construction des multicouches : généralités	87
2.3.2 Construction des multicouches fonctionnalisées avec des complexes (PEI/ADN _p)	88
2.3.2.1 Formation des complexes (PEI/ADN _p)	88

2.3.2.2 <i>Fonctionnalisation des multicouches avec des complexes (PEI/ADNp)</i>	88
2.4 Protocoles de transfection	88
2.4.1 Protocole de transfection en solution	88
2.4.2 Protocole de transfection par multicouche	89
2.4.3 Analyse du taux de transfection	89
2.4.3.1 <i>Par cytométrie en flux</i>	89
2.4.3.2 <i>Par fluorimétrie</i>	91
2.4.3.3 <i>Par mesure de l'activité de la luciférase</i>	91
2.5 Mesure de cytotoxicité	91
2.5.1 Mesure de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide	91
2.5.2 Fragmentation de l'ADN	92
2.6 Mesure de l'activité d'endocytose	93
2.6.1 Mesure de l'activité d'endocytose de cellules eucaryotes par dosage de la HRP93	93
2.6.2 Mesure de l'efficacité de transfection en présence d'inhibiteurs de l'endocytose	94
2.7 Dosage de la mélanine intra cellulaire	95

Chapitre 3 : Caractérisation et Pouvoir de transfection d'architectures de type (Polycation/Polyanion)_n(PEI/ADN_p) **97**

1. Etude des complexes de PEI/ADN_p en solution	101
1.1 Formation des complexes	101
1.2 Taille et charge des complexes	102
1.3 Interaction des polyanions avec les complexes en solution	105
2. Caractérisation des complexes (PEI/ADN_p) adsorbés à la surface d'une multicouche	108
2.1 Mise en évidence de l'adsorption des complexes	108
2.1.1 Par OWLS	108
2.1.2 Par FTIR	110
2.1.3 Par microscopie confocale	111
2.2 Stabilité des complexes au cours du temps	113
2.3 Etude de la structure des films par microscopie à force atomique	116
3. Caractéristiques de transfection d'architectures de type (polycation/polyanion)_n(PEI/ADN_p)	119
3.1 Caractérisation des conditions de transfection	119
3.2 Influence du type de multicouche	122
3.3 Capacité de transfection des architectures (polycation/polyanion) _n polyplexes	123
3.3.1 Evaluation du taux de transfection pour différents types cellulaires	123
3.3.2 Optimisation du taux de transfection	125
3.3.2.1 <i>Transfection en présence de polyanions</i>	125
3.3.2.2 <i>Transfection en fonction de nombre de couche de complexe</i>	126
3.3.3 Amélioration des propriétés d'adhésion cellulaire de films multicouche de type (PLL/PGA) _n PLX par utilisation de mannose couplé au PGA	127
4. Cytotoxicité liées aux complexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte	129
4.1 Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide	129
4.2 Mécanismes liés à la cytotoxicité des architectures	130
5. Endocytose des polyplexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte	131

5.1 Influence des multicouches sur l'endocytose	132
5.2 Voies d'endocytose des complexes adsorbés sur une multicouche	133
6. Discussion	135
7. article 1 : “ A general approach for local gene delivery based on polyplex-functionalized polyelectrolyte multilayers”	141
Chapitre 4 : Enfouissement de polyplexes dans des multicouches de polyélectrolytes	161
1. Résumé2	161
2. Article 2 : “Polyplex-embedding in polyelectrolyte multilayers as gene delivery platform	165
Chapitre 5 : Chapitre 5 Bifonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes	170
Introduction	170
1. Propriétés anti-inflammatoires de l'alpha-MSH	171
2. Création de multicouches de polyélectrolytes à activité anti-inflammatoire par enfouissement d'alpha-MSH	173
2.1 Résumé 3	173
2.2 Article 3 : “Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti inflammatory agents”	175
3. Bifonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes	181
3.1 Introduction	181
3.2 Caractérisation de l'architecture	182
3.3 caractérisation de la Bifonctionnalisation	184
3.3.1 <i>Action d'une architecture bifonctionnalisée sur des Mélanocytes</i>	<i>184</i>
3.3.2 <i>Capacité de transfection des architectures bifonctionnalisées sur les mélanocytes</i>	<i>187</i>
3.3.3 <i>Action des architectures bifonctionnalisées sur d'autres types cellulaires</i>	<i>187</i>
3.4 Le NDP MSH favorise la transfection ?	188
3.5 Bifonctionnalisation / compétition	190
3.6 Conclusions	191
Conclusions et Perspectives	192
Références Bibliographiques	197

Abbreviations

Polymères:

ADNp :	ADN plasmidique
CD :	cyclodextrine
CHI:	chitosan
DOGS :	dioctadecylamidogkicylspermine
DOTMA :	(N-[1-(2,3,-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DOTAP :	1,2-diacyl-3-trimethylammonium propane
HA:	hyaluronane de sodium (appelé hyaluronane)
PAA:	acide poly(acrylique)
PAGA :	poly[α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]
PAH:	poly(allylamine hydrochloridrique)
PDADMAC :	poly(diallyldimethylammonium)
PEG:	poly(éthylène glycol)
PEI:	poly(éthylène imine)
PGA:	acide poly(L-glutamique)
PDL :	poly(D-lysine)
PLGA :	poly-(DL-lactic-co-glycolic acid)
PLL:	poly(L-lysine)
PMAM :	Poly(amidoamine)
PSS:	poly(styrène sulfonate)

Protéines et enzymes

ACTH :	Adrenocorticotrophic hormone
BMP :	protéine morphogénique osseuse : “ bone morphogenic protein “
BSA :	“Bovine serum albumine”, albumine sérique bovine
CBP :	CREB-binding protein
CREB :	cAMP response element binding protein
GAGs :	Glycosaminoglycannes
GAM :	“Gene Activated Matrice”
GFP:	protéine fluorescente verte : “ green fluorescence protein”
HRP :	Horse Radish Peroxidase
IFN γ :	Interferon gamma
Il 10 :	Interleukine 10
Inos :	“inducible nitro oxyde synthetase”
LPS :	lipopolysaccharide
MCR :	récepteur aux mélanocortines
MITF :	“Microphthalmia transcription factor”
α -MSH:	α -mélanocortine : “alpha-melanocyte stimulating hormone”
NF κ B :	“Nuclear facteur κ B”
RGD :	Arginine - Glycine – Asparagine
TLR :	“Toll like receptor”
TNF α :	facteur de nécrose de tumeurs : ” tumoral necrose factor “
VCAM-1 :	

Réactifs et solvants utilisés :

ABTS :	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CP :	Chlorpromazine
CytD :	Cytochalasine D
DMA :	5-(N,N-Dimethyl)amiloride
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
EDC :	1-Ethyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide
FITC :	fluorescéine isothiocyanate
Hepes :	acide 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonique
MBC :	Methyl beta cyclodextrine
PBS :	Phosphate buffer salt
PFA :	Paraformaldehyde
PLX :	Polyplexe, complexes de (PEI/ADN)
pNPP :	Para-nitrophenyl phosphate
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
sulfoNHS :	N-hydroxysulfo succinimide
Tris :	tris(hydroxy méthyle) aminométhane
W :	Wortmaninn
XTT :	sodium 3,3'-{1-[(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium}-BISbis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

Milieux de culture :

FCS :	“Fetal Calf Serum”, Sérum de veau foetal
MEM :	“Minimum Essential Medium”, milieu minimum essentiel
DMEM :	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, milieu de Eagle modifié par Dulbecco
RPMI 1640 :	“Roswell Parc Memorial Institute”

Appareils et techniques utilisés :

OWLS:	spectroscopie optique par guide d'onde
CLSM :	microscopie confocale
AFM:	microscopie à force atomique
FTIR-ATR:	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totalement atténuée
DLS :	“Dynamic light scattering”, Granulomètre à diffusion en dynamique de la lumière
RLU :	“Relative Luminescence unit”, unité relative de luminescence
RFU :	“ Relative Fluorescence unit”, unité relative de luminescence fluorescence

Introduction

Les biomatériaux ont d'ores et déjà un fort impact en médecine. Leur utilisation est variée et s'étend à des domaines tels que l'ingénierie tissulaire, la vectorisation de médicaments, la médecine réparatrice et le diagnostic. Depuis leurs premières utilisations en chirurgie dentaire, où des matériaux développés initialement pour des applications non médicales ont été utilisés sans modification, de multiples interrogations sur la biocompatibilité, les caractéristiques mécaniques, la dégradation des matériaux en milieu biologique ont fait émerger la nécessité de contrôler leur design. Les concepts actuellement développés sont le produit de l'étude de l'interaction cellule/matrice extra cellulaire, des voies de signalisation intra cellulaire et de l'étude du développement naturel des systèmes biologiques (Langer et al., 2004). De nombreux polymères sont déjà sur le marché et permettent d'augmenter la sécurité, la pharmacocinétique et la durée de libération de nouveaux médicaments tels que l'interféron ou certaines hormones de croissance (Langer et al., 1998, 2001 et 2003), de manière systémique ou locale. Par exemple, des stents enrobés de rapamycine, pour inhiber la sténose vasculaire, ont reçu des autorisations de mise sur le marché européen et américain (Morice et al., 2002). Les biomatériaux constituent également une avancée dans le cadre de l'ingénierie tissulaire où l'utilisation combinée de biomatériaux structurés et de cellules eucaryotes favorise la régénération tissulaire.

Le remplacement de tissus par des biomatériaux a d'abord fait appel à des composés naturels tels que le collagène ou l'élastine (Heilshorn et al., 2003 ; Lee et al., 2001). Mais les polymères synthétiques revêtent un intérêt grandissant car ils permettent de combiner les informations contenues dans le matériel naturel, tel que des séquences RGD pour l'adhésion cellulaire par exemple, et un caractère multifonctionnel, leur modularité s'appliquant au contrôle de leur masse moléculaire, de leurs caractéristiques de dégradation et de leurs propriétés mécaniques. Ainsi des copolymères de d'acide poly(lactique co-glycolique) (PLGA) et poly(lysine) (PLL) permettent de créer des structures dont la vitesse de dégradation est contrôlable et qui, couplées à des séquences RGD, favorisent l'adhésion cellulaire (Barrera et al., 1993 ; Cook et al., 1997). Au-delà de leur aspect structurel permettant la colonisation cellulaire dans le cadre de la cicatrisation par exemple, ces architectures ont été également développées comme réservoir local de protéines ou de peptides d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la régénération osseuse, des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) ont été incluses dans des architectures composées de collagène ou de PLGA (Cowan et al., 2005 ; Keskin et al., 2005 ; Geige et al., 2003).

L'utilisation de matrices polymériques est une voie permettant une libération prolongée du médicament mais ceci implique une conservation de l'activité des molécules utilisées. Or les protéines et les peptides ne sont pas des molécules stables et peuvent perdre leur activité par différents processus de dénaturation pouvant intervenir dans les matrices. Dans le but d'augmenter la stabilité fonctionnelle des matrices polymériques, l'incorporation d'ADN a été évoquée comme possibilité de conserver une activité à long terme. Les cellules cultivées au sein de ces matrices, après transfection par l'ADN plasmidique présent au sein de l'architecture, produisent les protéines d'intérêt agissant de manière paracrine et autocrine. Cette notion de bioréacteur a été utilisée dans le cadre de l'ingénierie tissulaire sous le terme de " Gene activated matrices" (GAM) (Bonadio J, 2000). L'utilisation de matrices contenant de l'ADN est applicable à de nombreuses situations cliniques, en thérapie génique, dans le cadre de traitements anti-cancéreux (vaccin à ADN), ou de désordre systémique (Levy et al., 1998). Ces techniques permettent de dépasser les barrières systémiques de la transfection et d'engendrer une expression prolongée dans le temps faisant croître leur durée d'action de quelques heures avec des protéines recombinantes à quelques semaines avec de l'ADN (Bonadio et al., 1999).

L'auto assemblage moléculaire est une approche puissante permettant la formation de nouvelles architectures supramoléculaires. Ces architectures sont fréquentes dans la nature. C'est le cas par exemple des ribosomes formés de la coalescence de protéines ribosomiques et d'ARN donnant lieu à une structure fonctionnelle. Ces auto assemblages sont médiés par des interactions faibles et non covalentes telles que des liaisons hydrogène, des liaisons électrostatiques, des interactions hydrophobes et des interactions de Van der Waals (Zhang S., 2003). Les caractéristiques d'auto assemblage de molécules par des interactions faibles ont été utilisées pour former des matrices polymériques. C'est G. Decher (1997) qui appliqua ce concept aux polyélectrolytes afin de former des films minces qu'il nommera multicouches de polyélectrolytes. Cette technique présente un intérêt croissant en raison des possibilités qu'elle offre de construire des assemblages moléculaires multicomposites dont on peut contrôler l'architecture, et surtout en raison de sa simplicité de mise en œuvre. Ces films minces peuvent être construits sur de nombreux supports. Ainsi leurs applications sont multiples et permettent notamment de constituer une interface modulable entre un tissu et un matériau implantable. Dans ce cadre l'incorporation de protéines et de peptides, dans les dernières années, a permis de donner à ces films des fonctions permettant de moduler l'activité des cellules cultivées à leur contact. Mais leurs applications potentielles notamment dans le cadre de l'intégration de prothèse ou d'ingénierie tissulaire nécessitent également une

activité prolongée. Dans cet esprit, l'incorporation d'ADN au sein des ces architectures afin d'engendrer des bio-réacteurs cellulaires est une voie à explorer. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de thèse qui porte sur le développement et la caractérisation de multicouches de polyélectrolytes fonctionnalisées avec de l'ADN plasmidique sous forme de complexes avec du polyéthylèneimine (PEI) linéaire. Ce travail comprend trois phases :

- tout d'abord, la caractérisation des polyplexes adsorbés à la surface de multicouches de polyélectrolytes et des capacités de transfection de ces architectures.

- deuxièmement, l'étude d'enfouissement de ces complexes au sein de multicouches de polyélectrolytes afin de constituer des réservoirs. Cette étude porte sur l'accessibilité des complexes par les cellules cultivées sur ces substrats et également sur la conservation de leur capacité de transfection,

- troisièmement, le développement d'une architecture de multicouches de polyélectrolytes présentant une double fonctionnalité devant permettre d'agir directement sur les cellules cultivées par incorporation de peptides à activité thérapeutique ainsi que sur les cellules à distance par transfection. Ce travail devant mener à la possibilité d'induire différents messages avec la même architecture et d'augmenter les capacités de transfection mais également de combiner de manière versatile l'activité sur les temps courts durant lesquels les peptides agissent essentiellement et les temps longs où la production de protéine par les cellules transfectées perdure.

Ce travail démontre l'utilisation possible des films multicouche de polyélectrolytes comme vecteur solide de transfection. Il a en effet mené à la détermination des caractéristiques permettant d'enfouir des complexes de type (PEI/ADN) dans des films multicouches de polyélectrolytes et démontré le caractère modulable de la technique permettant d'augmenter les capacités de transfection de cette dernière.

Chapitre 1 : Revue Bibliographique :

1	La transfection par vecteur synthétique :	16
1.1	Thérapie génique et transfection : définitions	16
1.2	Choix du vecteur :	16
1.3	Les vecteurs synthétiques :	17
1.3.1	Généralités :	17
1.3.2	Traffic intracellulaire des poly/lipoplexes :	19
1.3.2.1	Endocytose :	19
1.3.2.2	Translocation nucléaire :	20
1.3.3	Les lipoplexes : Les lipides cationiques :	21
1.3.4	Les polyplexes : les polymères cationiques :	23
1.3.4.1	Le chitosane :	23
1.3.4.2	La poly(L-lysine) (PLL) :	24
1.3.4.3	Les cyclodextrines :	25
1.3.4.4	Les polymères thermosensibles :	27
1.3.4.5	Les peptides :	28
1.3.4.6	Les poly(amidoamines) (PAMAM) :	30
1.3.4.7	Le poly(éthylèneimine) (PEI) :	32
1.3.4.8	Les polymères dégradables :	35
1.3.5	Les vecteurs synthétiques : des outils modulables	37
1.3.5.1	Les barrières à une transfection efficace :	37
1.3.5.2	Utilisation de polyéthylène glycole (PEG) :	38
1.3.5.3	Modifications permettant la localisation nucléaire :	39
1.3.5.4	Augmentation de l'endocytose des complexes et ciblage cellulaire :	42
1.3.5.5	Modifications permettant l'échappement des endosomes :	42
2	Transfection locale in vivo :	43
2.1	Technique de transfection locale par libération de matériel génétique depuis une matrice :	44
2.2	La transfection en phase solide :	46
3	Films multicouches de polyélectrolytes : interfaces à activité biologique modulables ...	48
3.1	Films multicouches de polyélectrolytes : Principe	48
3.1.1	Principe de dépôt couche par couche :	48
3.1.2	Croissance des films multicouches :	50
3.1.2.1	Les films à croissance linéaire :	50
3.1.2.2	Les films à croissance exponentielle :	51
3.1.3	Nature du substrat et technique de dépôt :	52
3.2	Comportement des multicouches de polyélectrolytes vis à vis du milieu biologique :	54
3.2.1	Adhésion des protéines	54
3.2.2	Adhésion cellulaire :	56
3.2.3	Stabilité/Dégradabilité des films multicouches de polyelectrolytes dans un milieu biologique :	58
3.3	Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes :	59
3.3.1	Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes par des peptides ou des protéines :	59
3.3.2	Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes avec de l'ADN :	60

3.3.2.1	Utilisation d'ADN comme polyanion dans la construction de multicouches :	60
3.3.2.2	Utilisation des multicouches de polyélectrolytes dans le cadre de la transfection :	62

1 La transfection par vecteur synthétique :

1.1 Thérapie génique et transfection : définitions

Les thérapies géniques ont pour but dans le sens le plus large d'apporter aux cellules somatiques d'un individu l'information génétique nécessaire à la production de protéines thérapeutiques pour corriger ou moduler une fonction cellulaire déficiente ou non contrôlée. La transfection est l'étape de cette thérapie qui consiste à introduire dans la cellule du matériel génétique. La transfection est également un outil important dans le cadre de la recherche fondamentale en biologie. Trois composants s'imposent en thérapie génique :

- Le gène codant pour une protéine thérapeutique
- Un système d'expression du gène qui contrôle l'expression et le fonctionnement au sein de la cellule cible
- Un vecteur de transfection permettant d'apporter le matériel génétique au niveau de la cellule.

1.2 Choix du vecteur :

Les vecteurs de transfection sont nombreux. Leur caractéristiques sont variables. On distingue les vecteurs viraux (Tomanin et al., 2004), utilisant la capacité des virus à cibler certaines cellules, à y introduire leur matériel génétique et à y contrôler la synthèse de leurs protéines ainsi que les vecteurs synthétiques (Cho et al., 2003) qui exploitent les propriétés chimiques de certains polymères vis à vis des cellules eucaryotes, en particulier celles de déstabiliser les membranes. Par ailleurs, des méthodes physiques telles que la sonoporation, l'électroporation et la magnétofection permettent de modifier les caractéristiques

membranaires pour permettre l'introduction d'acides nucléiques dans les cellules (Mehier-Humbert et al., 2005).

Leur choix doit être examiné sous deux aspects :

- d'une part, le vecteur doit permettre le transport du matériel génétique depuis le point d'injection jusqu'aux cellules cibles, sa protection vis à vis des nucléases mais également au cours des passages hépatiques et rénaux, la diffusion au sein du tissu cible et le ciblage des cellules d'intérêt thérapeutique.

- d'autre part, le vecteur doit permettre le passage de la barrière membranaire et permettre une libération de l'ADN dans le cytoplasme. Le vecteur doit également faciliter le passage nucléaire et permettre ainsi l'expression du gène d'intérêt.

Leur choix doit également être dicté par leur biocompatibilité et leur cytotoxicité relative vis à vis de la cellule et de l'organisme entier dans lequel ces méthodes seront utilisées.

1.3 Les vecteurs synthétiques :

1.3.1 Généralités :

La synthèse de vecteurs de transfection doit répondre à une utilisation future *in vivo* et plus particulièrement chez l'homme. Les vecteurs viraux sont de loin les plus efficaces qu'il s'agisse d'utilisations *in vitro* ou *in vivo*. Mais ces vecteurs présentent un certain nombre de désavantages qui rendent leur utilisation chez l'homme discutable en terme de sécurité. Leur utilisation provoque une réaction immunitaire avec activation du complément. De plus la possibilité d'insertion du génome viral existe, pouvant entraîner des mutations. D'autre part, les séquences d'ADN pouvant être insérées dans ce vecteur sont de taille réduite, ce qui peut être limitant. Le développement de vecteurs synthétiques répond à ces limitations. Ils présentent divers avantages: premièrement ils présentent une moindre toxicité et n'entraînent pas l'activation d'une réaction immunitaire. Deuxièmement ils présentent des avantages sur le plan technique puisque la taille du matériel génétique utilisé n'est pas limité, leur production est généralement simple et de faible coût et enfin ces techniques sont en général très reproductibles.

Les vecteurs synthétiques sont en général des polymères cationiques, leur charge étant conférée par des groupements amine, qui leur permettent d'interagir avec les groupements

phosphate de l'ADN par des forces électrostatiques. Ces interactions vont mener à la condensation de l'ADN dans des structures de taille et de charge variables. Les caractéristiques physico-chimiques de ces structures dépendent de la nature du vecteur ainsi que de sa masse moléculaire et de sa proportion par rapport à l'ADN. Les complexes sont généralement préparés avec un excès de polymère ce qui aboutit à une particule de charge positive. La charge de ces complexes permet l'interaction avec les molécules anioniques de la surface cellulaire, notamment les protéoglycanes (Wiethoff et al. 2001), et leur endocytose. La condensation de l'ADN permet la protection de ce dernier vis à vis des nucléases en limitant l'accès de ces dernières à l'ADN. La taille des complexes diminue en général lorsque le ratio vecteur/ADN augmente. Des complexes de taille plus faible seront plus aisément endocytés par les cellules. La stabilité de ces complexes est dictée par la nature du vecteur. En général ceux-ci ont tendance à s'agréger avec le temps ou lorsque leur concentration augmente.

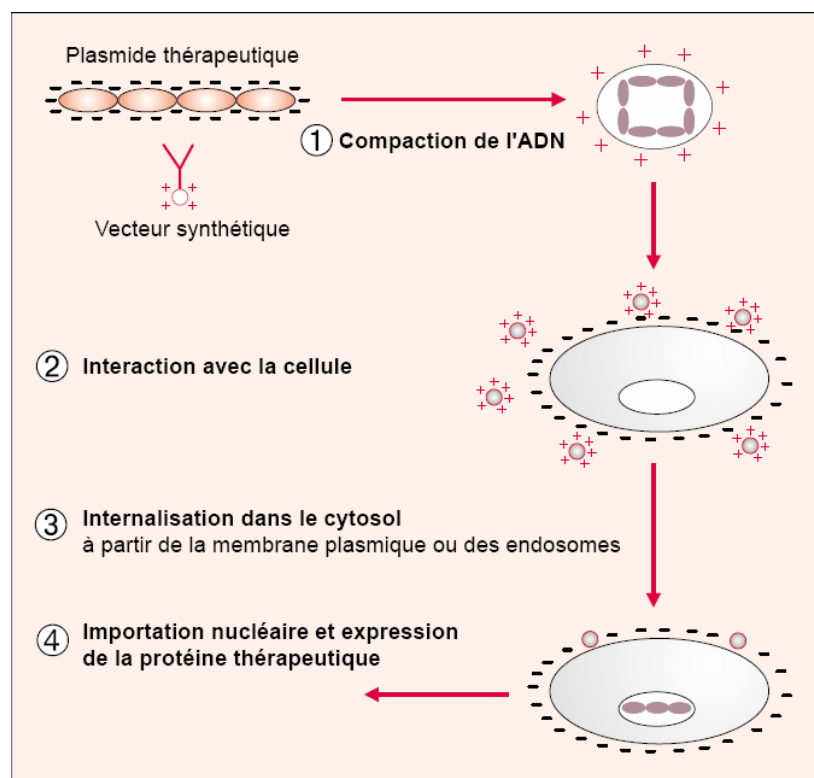


Figure 1-1 : Principe des vecteurs synthétiques. (d'après Kreiss et Scherman, 1999)

1.3.2 Traffic intracellulaire des poly/lipoplexes :

1.3.2.1 Endocytose :

Pour les lipoplexes il existe deux voies d'entrée au sein de la cellule, l'endocytose et la fusion directe des lipides avec les lipides membranaires. La majeure partie des complexes sont en fait internalisés par endocytose comme les polyplexes alors que seules 2 % des cellules sont transfectées par fusion (Zhdanov et al. 2002).

Les complexes sont endocytés suite à leur adsorption aspécifique mais peuvent également être phagocytés. En général l'endosome va être fusionné avec un lysosome pour permettre la dégradation des éléments endocytés. Le vecteur doit au cours de cette phase protéger l'ADN de la dégradation mais également permettre la sortie de ce dernier dans le cytoplasme. Il semble que ce sont les voies métaboliques du vecteur qui déterminent dans quelle mesure l'ADN sera complexé au moment de la fusion au lysosome. Laurent et al. (1999) montrent que l'hydrolyse du vecteur dans les endosomes est un pré-requis au passage dans le lysosome. Mais souvent les vecteurs permettent à l'ADN de ne pas être transloqué dans les lysosomes (Wattiaux et al., 1996). L'inhibition de ce transfert pourrait être liée à la taille du complexe puisque les gros complexes sont pris en charge par phagocytose et que la translocation avec un lysosome demande une maturation du phagosome qui serait inhibée.

La sortie des endosomes est un pré-requis pour permettre la translocation de l'ADN vers le noyau et l'expression du gène d'intérêt. Les vecteurs synthétiques permettent la déstabilisation de la membrane. Ainsi les lipides cationiques sont sensibles au pH et fusionnent avec la membrane à pH acide (Budker V. et al., 1996). Certains peptides amphiphiles interagissent également avec la membrane tout comme certains agents chimiques comme la méthyl- β -cyclodextrine pouvant extraire le cholestérol et déstabiliser la membrane. Enfin certains polymères cationiques comme le PEI engendrent l'éclatement osmotique des endosomes du fait de leur propriété d'éponge à proton. En effet l'entrée massive de protons dans l'endosome par effet tampon du PEI permet également l'entrée de contre-ions. L'entrée massive d'ions Cl^- va entraîner un choc osmotique et la libération du contenu de l'endosome dans le cytoplasme (Kichler et al., 2001 ; Akinc et al., 2005). Cet effet est observé pour les polyamines et dans une moindre mesure pour PLL (Cho et al., 2003).

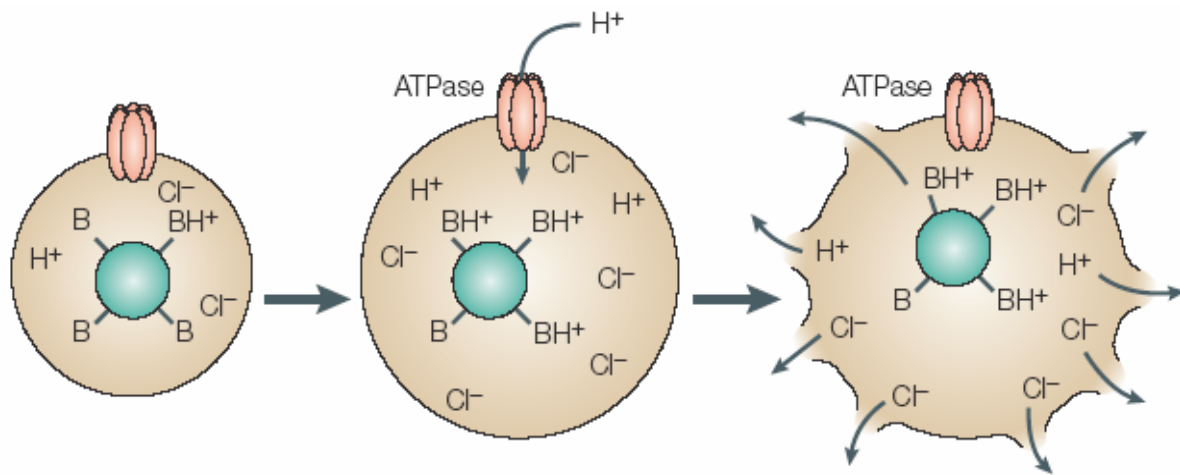


Figure 1-2 : Modélisation de l'échappement des endosomes par effet pompe à proton. (Pack et al., 2005).

1.3.2.2 Translocation nucléaire :

La translocation de l'ADN dans le noyau est l'étape ultime avant la transcription du message génétique transfecté. Pendant longtemps on a pensé que la décomplexation de l'ADN est un pré-requis à cette étape. Mais il semble que la complexation de l'ADN ne soit pas un obstacle à la transcription de ce dernier. Bieber T et al (2002) ont montré par des expériences de transcription in vitro que l'ADN complexé à du PEI de 25 kDa est accessible aux enzymes de transcription. De même des expériences de microinjection nucléaire ont montré que la transfection est efficace avec des polyplexes formés avec PLL ou PEI, les complexes ayant été observés par microscopie confocale dans le noyau. Le passage de la membrane nucléaire est une étape limitante de la transfection pour nombre de vecteurs. Le passage de molécules à travers la membrane nucléaire se fait par les pores nucléaires de deux façons : un passage passif pour les molécules ne dépassant pas 60 kDa et un passage actif pour les molécules plus grosses. Hagstrom et al. montrent, en utilisant un modèle de cellules Hela perméabilisées avec de la digitonine, qu'une molécule d'ADN double brin de 1 kb peut traverser les pores nucléaires alors qu'au-delà de 2 kb, les molécules restent localisées dans le cytoplasme. Les molécules d'ADN utilisées pour la thérapie génique traversent donc difficilement la membrane. Il semble que 10^5 copies de plasmide soient nécessaires dans le milieu extracellulaire pour obtenir quelques copies au sein du noyau. La taille et la complexation constituent des barrières au transport nucléaire. Ceci explique pourquoi de nombreux systèmes de transfection synthétiques sont inefficaces sur des cellules post-mitotiques. C'est la barrière principale pour les systèmes utilisant des lipides cationiques. Pour ce qui concerne

les polymères la situation est moins claire. Brunner et al. (2000) ont montré la dépendance vis à vis du cycle cellulaire de la lipofectamine, du PEI et de la PLL. L'efficacité de transfection est plus importante sur des cellules en phase S/G2 que sur des cellules en phase G1, ceci étant dû au fait que la translocation de l'ADN plasmidique dans le noyau se fait à la faveur de la rupture de la membrane nucléaire au cours de la mitose. Le fait que même après 48h, les cellules transfectées en phase G1 ne présentent pas un taux de transfection similaire aux cellules transfectées en phase S/G2 s'explique par une certaine instabilité de l'ADN dans le cytoplasme due à la présence d'endonucléases. Lechardeur et al. (1999) ont montré que la dégradation d'ADN nu survient en 2h dans le cytoplasme et qu'au bout de 4 heures 25 % de l'ADN encapsulé par des lipides cationiques est détruit. Cependant d'autres études ont montré qu'indépendamment du cycle cellulaire l'injection intracytoplasmique de polyplexes de PLL et PEI est efficace et mène à l'expression du transgène. Il est intéressant de noter que l'efficacité de PEI est plus importante que celle de PLL dans ces conditions, de manière comparable à ce qui est obtenu dans les protocoles classiques.

Dans le cas de la transfection médiée par lipoplexes, 2000 à 10000 plasmides entrent dans la cellule alors que seuls 1 à 10 % sont intranucléaires après 24-36 h. Même si l'ADN est décomplexé dans le cytoplasme et le noyau, il semble peu probable qu'il y reste sous une forme libre puisque de nombreuses protéines de liaison à l'ADN, polyamines et autres polycations sont présents dans ces compartiments cellulaires (Dean et al., 2005).

1.3.3 Les lipoplexes : Les lipides cationiques :

Le premier lipide cationique décrit est le (N-[1-(2,3,-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA) (Felgner et al., 1987), ce vecteur ayant une efficacité supérieure aux techniques de précipitation au chlorure de calcium ou au DEAE-dextran *in vitro*. Rapidement d'autres lipides cationiques ont été synthétisés et cette méthode est restée pendant longtemps une méthode de référence. De nombreux kits de transfection commerciaux, se basant sur l'utilisation de ce type de vecteur, sont disponibles aujourd'hui (lipofectamine[®], fugene 6[®]...).

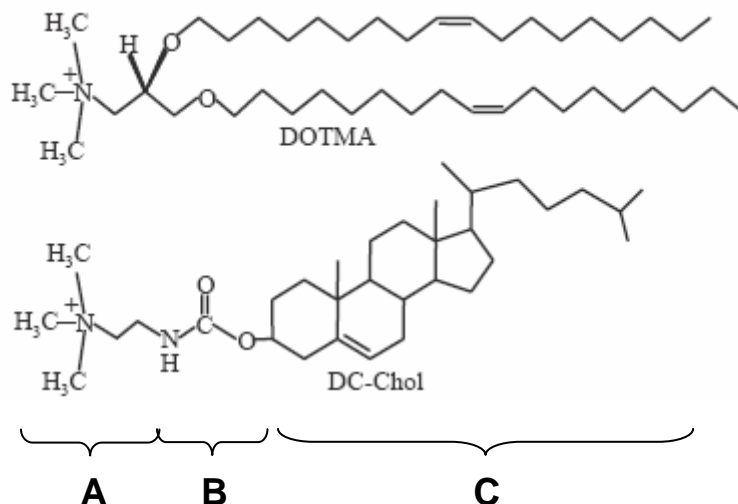


Figure 1-3 : Structures caractéristiques des lipides cationiques utilisés en transfection.

(A) groupement cationique

(B) groupement de lien

(C) groupement lipidique

(D'après Mahato et al., 2005)

La structure des lipides cationiques utilisés pour la transfection comporte trois groupements distincts (Mahato et al., 2005 ;Brown et al., 2004):

- Un groupement cationique qui permet l'interaction et la condensation de l'ADN. Ce groupement peut être un ammonium quaternaire comme pour le 1,2-diacyl-3-triméthylammonium propane) (DOTAP) (Plank et al., 1996), une polyamine comme pour le dioctadecylamidogkicylspermine (DOGS ou transfectam) (Behr et al.,1989) ou encore un hétérocycle cationique (Gao et al., 1991).
- Un groupement de lien. Ce groupement peut être de différentes natures : liaison ester, carbamate, amide. Le type de liaison détermine la stabilité de la molécule et sa biodégradabilité.
- Un groupement lipidique : en général il s'agit de cholestérol ou d'un de ses dérivés ou de doubles chaînes hydrocarbonées de 12 à 18 résidus. Ces chaînes ne sont pas forcément symétriques et peuvent être saturées ou partiellement désaturées. La composition de ce groupement influence fortement les capacités de transfection.

L'interaction de l'ADN avec des lipides cationiques se fait en deux temps : une première réaction exothermique rapide lors de la fixation par liaison électrostatique de l'ADN sur le liposome et une seconde réaction endothermique plus lente où il y a fusion des deux composés et réarrangement du complexe (Pector et al., 2000). Les complexes ainsi formés ont une charge de surface positive. Le passage de la barrière cytoplasmique s'effectue selon deux

modèles, soit par endocytose (98 %) soit par fusion du lipoplexe avec la membrane plasmique (2%) (Zhdanov et al., 2002).

La structure de ce type de vecteur influence son efficacité. Si on augmente le nombre de groupements amine ainsi que la distance entre le pôle cationique et le pôle hydrophobe l'efficacité de transfection s'en trouve augmentée (Zhdanov et al., 1998). La taille des complexes varie de 50 nm à 1 µm. Plus la taille de ces derniers est grande plus l'efficacité de transfection est bonne *in vitro* alors qu'*in vivo* ce sont des complexes de petite taille (inférieure à 100 nm) qui sont les plus efficaces (Sternberg et al., 1998).

L'efficacité des lipoplexes peut être augmentée par ajout d'un lipide neutre dans le système de complexation. La formation de complexes avec la dioleyle phosphatidylethanolamine (DOPE) ou du cholestérol en quantité égale à celle du lipide cationique montre une augmentation de l'efficacité de transfection quel que soit le type de lipide cationique utilisé. DOPE agit par déstabilisation de la membrane (Hui et al., 1996). Sa présence dans un complexe facilite l'échappement des endosomes (Farhood et al., 1995). L'action du cholestérol est moins claire. Néanmoins, *in vivo*, il stabilise le complexe en diminuant l'interaction des protéines sériques avec le complexe (Brown et al., 2001).

1.3.4 Les polyplexes : les polymères cationiques :

1.3.4.1 Le chitosane :

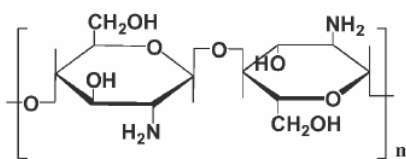


Figure 1-4 : Chitosane : unité polymérique

Polysaccharide biodégradable et non toxique possédant une faible immunogénicité, il est obtenu par désacétylation alcaline de la chitine, polysaccharide extrait de l'exosquelette des crustacés et des insectes. Il est composé de deux sous-unités : la D-glucosamine et la N-acetyl-D-glucosamine liées par une liaison glycosidique (figure : 1-4). Ce sont les chitosanes de petit poids moléculaire (inférieur à 22 kDa) hydrosolubles qui sont utilisés pour condenser

l'ADN. Leur efficacité de transfert est supérieure à celle de la poly-L-lysine et ils sont beaucoup moins toxiques. De plus ce sont des polymères muco-adhésifs. Les complexes formés de chitosane et d'ADN seraient particulièrement adaptés à la transfection gastro-intestinale des cellules épithéliales et des cellules immunitaires. Le poids moléculaire et le degré de désacétylation influence la taille et le potentiel de surface des complexes de chitosane/ADN. Ainsi les complexes ont une taille variant de 150 à 600 nm (Liu et al., 2002), 155 à 181 nm pour des chitosanes de 213 à 48 kDa, taille supérieure pour des poids moléculaires plus faibles. Le même type d'évolution est observé en fonction du taux de désacétylation pour le potentiel de surface des complexes. Mais aucun effet sur la condensation de l'ADN n'est observé. A partir d'un rapport N/P = 6, l'ADN est totalement complexé mais les complexes sont peu stables dans le temps et on assiste à une libération de l'ADN en quelques heures dans du PBS sauf si les complexes ont été réticulés au préalable (Brochard et al., 2001). Ces complexes présentent une bonne résistance vis à vis des nucléases. Mais dans ce cas également ceci est corrélé au poids moléculaire. Il existe une corrélation entre l'endocytose des complexes, le taux de transfection et le N/P et donc le potentiel de surface (Mao et al., 2001). Haun et al (1998) montrent que le taux de transfection diminue de 12 % à 0,6 % entre un chitosane de 213 et 10 kDa.

1.3.4.2 La poly(L-lysine) (PLL) :

La poly(L-lysine) est un des premiers polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène (Wu *et al.*, 1987). C'est un polypeptide linéaire dont la sous-unité est la lysine. C'est un polymère dégradable ce qui le rend intéressant pour une utilisation *in vivo*. La PLL est caractérisée en général par son degré de polymérisation ou son poids moléculaire.

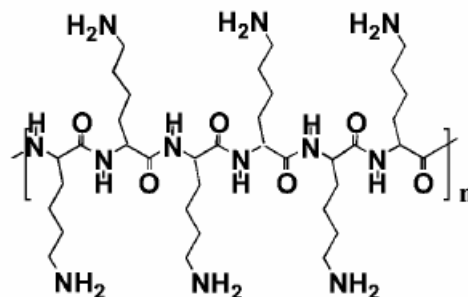


Figure 1-5 : Poly(Lysine)

La condensation de l'ADN ainsi que l'efficacité de transfection augmente avec le poids moléculaire (Zhang S. *et al.*, 2004), mais la cytotoxicité de ces complexes augmente également. C'est un polymère peu efficace pour la transfection. Il ne présente en effet qu'un faible pouvoir tampon ne permettant pas une sortie efficace des endosomes. Ainsi l'utilisation d'agents lysosomotropiques comme la chloroquine est souvent nécessaire pour obtenir une transfection efficace. Sans modification les complexes de PLL/ADN ne sont pas de bons candidats pour la transfection *in vivo*. En effet les complexes s'agrègent lorsque le taux de sel atteint un seuil physiologique et la fixation des protéines sériques entraîne leur élimination rapide de la circulation. Néanmoins différentes modifications permettent de contourner les désavantages de ce polymère. La solubilité peut être augmentée par le greffage de PEG (Brown MD *et al.*, 2000) ou de dextran (Muruyama A. *et al.*, 1999). De plus les PLL amphiphiles présentent une plus faible toxicité et leur capacité de transfection est 30 fois supérieure aux PLL classiques. La stabilité des PLL glycosylées est également plus importante comparée aux PLL classiques et leur toxicité est moindre (Boussif O. *et al.*, 1999). Enfin l'adjonction de résidus histidine permet d'augmenter l'efficacité de transfection en favorisant l'échappement des endosomes du fait de l'activité de pompe à proton de ces résidus (Pichon C. *et al.*, 2001).

1.3.4.3 Les cyclodextrines :

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques du glucose en forme de coupe (figure :1-6). Elles peuvent contenir 6,7 ou 8 résidus glucose, on parle alors de α , β et γ -cyclodextrine. L'extérieur de ces molécules est hydrophile mais elles présentent une poche hydrophobe qui leur permet de former des complexes d'inclusion avec de petites molécules hydrophobes. Cette particularité leur vaut d'être utilisées comme excipients pour certaines drogues car elles permettent la protection de celles-ci contre la dégradation physique, chimique ou enzymatique et la solubilisation de certaines molécules thérapeutiques hydrophobes. De plus elles augmentent la perméabilité membranaire de certains médicaments. En effet il a été montré que les β -cyclodextrines extraient le cholestérol de la membrane cytoplasmique et entraînent ainsi la déstabilisation de la membrane. Les CDs présentent une faible immunogénicité. Ce sont des molécules présentant de nombreux sites permettant le greffage de fonctions comme des fonctions cationiques ou des groupements permettant le ciblage cellulaire.

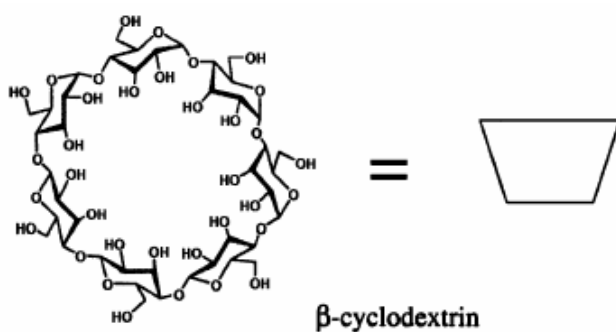


Figure 1-6 : Beta-cyclodextrine : formule et représentation schématique de sa forme caractéristique.

Les CDs neutres peuvent interagir avec les acides nucléiques et les nucléotides, mais sont incapables de les complexer. Le greffage de groupements amine permet la formation de CDs cationiques qui interagissent plus fortement avec les acides nucléiques (Schwinté et al., 1998). Les cyclodextrines peuvent donc être utilisées en transfection. D'une part, car la capacité de certaines CDs de déstabiliser les membranes favorise l'association et la prise en charge des oligonucléotides (Zhao et al., 1995). La 2,6-diméthyl- β -cyclodextrine associée à l'ADN permet une transfection 180 fois supérieure à celle de l'ADN nu. Freeman et al., (1996) montrent que l'utilisation de β -cyclodextrine comme adjuvant dans une formulation lyophilisée de complexes de DOTAP et d'ADN pour une instillation intra-trachéale chez le rat augmente l'efficacité de transfection. D'autre part, les CDs cationiques interagissent directement avec l'ADN et forment des complexes d'une centaine de nanomètres efficaces pour la transfection. Cryan et al., 1996, montrent que des cyclodextrines de type heptakis(6-amino-6-deoxy)- β -cyclodextrine présentent une efficacité de transfection en présence de sérum égale à celle du DOTAP. Ces complexes présentent une charge de surface positive qui leur permet d'interagir avec les protéoglycanes membranaires. La transfection par ces complexes est augmentée en présence de chloroquine ce qui suggère que leur entrée dans le cytoplasme se fait par endocytose et non par déstabilisation de la membrane.

Ces molécules ont également été utilisées par greffage à des polymères cationiques ou des dendrimères pour diminuer leur toxicité. Le greffage de CDs à des dendrimères de PAMAM a permis d'augmenter l'efficacité de transfection de ces dendrimères *in vitro* et *in vivo* (Wada et al. 2005A ; 2005B)..L'efficacité de transfection et la toxicité de complexes formés à partir de bPEI et β -CD diminuent avec l'augmentation du nombre de résidus CD (Pun et al., 2004). Mais le greffage de CDs à des polymères cationiques donne l'opportunité d'associer de

manière simple une autre fonction au complexe en utilisant la capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes. Des groupements PEG peuvent ainsi être associés après complexation en utilisant des formulations de PEG-adamantane (Pun et al., 2004 ; Pun et al., 2002) ce qui permet de favoriser la stabilité des complexes. De l'insuline greffée à un groupement hydrophobe palmitate permet le ciblage et l'augmentation de l'efficacité de transfection en facilitant l'endocytose récepteur-dépendante (Forrest et al., 2005).

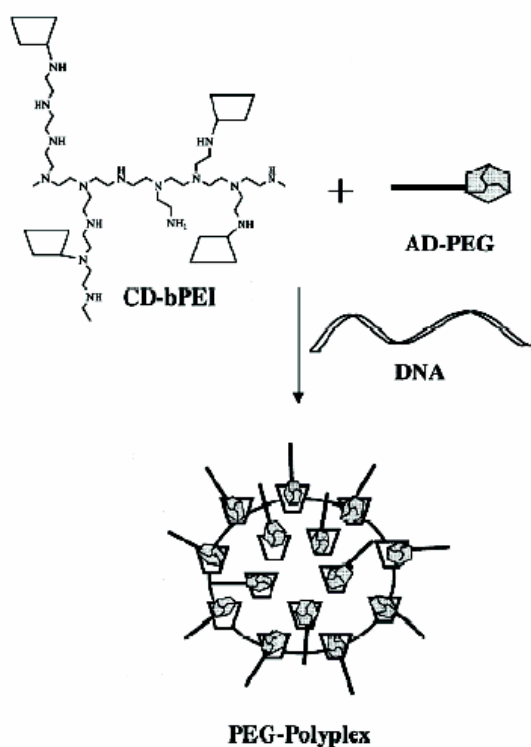


Figure 1-7 : Fonctionnalisation de complexes (ADN/ β -cyclodextrine) par formation de complexes d'inclusion (d'après Pun et al., 2004).

1.3.4.4 Les polymères thermosensibles :

Les polymères thermosensibles peuvent contrôler la libération de molécules encapsulées en réponse à une variation de température. Cette libération est le résultat d'un changement de conformation du polymère qui entraîne une variation de l'interaction de celui-ci avec l'ADN. Ces polymères ont été utilisés dans le but de créer un système de transfection permettant la protection de l'ADN, depuis l'injection jusqu'au passage intracellulaire, par une forte complexation et une libération de celui-ci dans le cytoplasme permettant un meilleur

transport nucléaire (Twaites B et al., 2005). Le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAAm) est un polymère thermosensible non chargé hydrosoluble à basse température et précipitant à une température supérieure à 31-32°C. C'est la température critique inférieure de solution. Il est utilisé sous forme de copolymères avec des polymères cationiques comme le N',N'-diméthylacrylamide (DMA), le butyl méthacrylate (BMA), le PEI (Twaites et al., 2004) et même le chitosane (Sun S et al., 2005) pour complexer l'ADN. La température critique de solution peut être modifiée en fonction des copolymères utilisés.

Des copolymères de NIPAAm et DMAEMA peuvent condenser l'ADN pour former des particules de 200 nm efficaces pour la transfection et présentant une faible cytotoxicité (Hinrichs et al., 1999).

Okano et al. ont synthétisés des copolymères de PIPAAm-DMAEMA-BMA comprenant 20 % de DMAEMA et 10 % de BMA qui sont aussi efficaces pour la transfection in vitro que la lipofectamine (Takeda et al., 2004). De plus l'efficacité de transfection est modifiée par les variations de température. Ainsi une diminution de la température à 20 °C pendant 3 h à 18 h après la transfection augmente la capacité de transfection de 2,1 fois. Les auteurs montrent que ceci est lié à une libération de l'ADN du complexe car l'ADN interagit moins fortement avec le polymère hydraté (Takeda N et al., 2004). Le même type de réponse a été observé pour des polymères de chitosan-NIPAAm/vinyl laurate.

1.3.4.5 Les peptides :

Une nouvelle classe d'agents permettant la translocation membranaire a été développée à partir de peptides. Ces peptides sont regroupés sous la dénomination de peptides pénétrant les cellules (CPPs). Le premier peptide dit CPP décrit en 1994, est dérivé de la troisième hélice de l'homéodomaine de la protéine d'Antennapedia dénommée penetratin (Derossi et al., 1994). Les CPPs sont des peptides de 7 à 30 résidus. Il se répartissent en deux classes : les peptides en hélice alpha riches en lysine et les peptides riches en arginine. Jusqu'à très récemment ils étaient décrits comme entrant dans le cytoplasme et le noyau des cellules eucaryotes par des processus ne nécessitant pas d'énergie (possible à + 4° C). Mais aujourd'hui il n'existe aucun consensus et la voie d'entrée de ces peptides dans la cellule est peu claire. Les CPPs pourraient entrer dans la cellule par des mécanismes passifs mais également par endocytose (Järver et al., 2004). Ces peptides permettent le transport de petites molécules mais également de nanoparticules. Le type de molécules associées influence la voie

d'entrée dans la cellule. Les premiers CPPs utilisés en transfection proviennent de protéines virales comme l'hémagglutinine HA2 du virus de l'influenza, Tat (transactivateur de transcription) du virus de l'immunodéficience acquise, VP22 du virus herpès simplex de type 1 ou encore JTS1. La plupart de ces peptides ne peuvent pas complexer l'ADN et sont donc en général associés à un autre type de vecteur de transfection, un lipide cationique ou du PEI (Kilk K. et al., 2005 ; Lee H. et al., 2002). Aujourd'hui on développe une nouvelle classe permettant la complexation de l'ADN et la translocation au sein de la cellule. Le premier peptide de ce type décrit est KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALACEA). C'est un peptide cationique amphipatique. Ce peptide subit un changement conformationnel en fonction du pH. Il interagit avec l'ADN par ses résidus lysine et arginine, le complexe efficacement, et peut interagir avec les membranes. Les complexes ainsi formés sont internalisés par endocytose puisque leur transfection est sensible à la bafilomycine, un agent empêchant l'acidification des endosomes. De manière générale ces peptides présentent une partie cationique permettant l'interaction avec l'ADN. Ces groupements cationiques sont apportés en général par des résidus lysine ou arginine. Le passage dans le cytoplasme à travers la membrane plasmique ou à travers la membrane des endosomes est possible du fait du caractère amphipatique de ces peptides leur permettant l'interaction avec les lipides. Ainsi Jacobs et collaborateurs ont synthétisé des vecteurs dérivés de JTS1 en substituant tous les résidus acide glutamique par des résidus lysine ou arginine. Ces peptides ppTG1 et ppTG20 sont efficaces pour la transfection (Rittner K. et al., 2002). Les résidus lysine sont répartis du même côté de l'hélice alpha, ce qui confère au peptide un caractère amphipatique. Comme la distance entre deux groupements NH_3^+ est de 7.11 Å, comparable à la distance entre deux groupements phosphate dans l'ADN (6.55 Å), le peptide peut interagir avec l'ADN sans que cela n'affecte sa structure secondaire et donc son activité fusogénique. Ceci n'est pas le cas pour d'autres peptides comme KALA qui s'assemble en plusieurs couches. De plus ce sont les premiers peptides décrits comme efficaces pour la transfection *in vivo*. Après injection intravasculaire, les auteurs observent une expression dans les poumons. Leur efficacité est pourtant pour le moment 10 fois inférieure à celle des formulations de DOTAP et cholestérol et 40 fois inférieure au PEI dans les mêmes conditions. Ces peptides existent sous forme de dendrimères qui présentent une capacité de transfection accrue et comparable à celle de vecteurs synthétiques comme la lipofectamine® (Tung et al., 2002 ; Liu et al., 2005). L'introduction de résidus histidine dans la séquence permet l'échappement des endosomes par un effet de pompe à proton. Cet effet augmente l'efficacité de transfection de polypeptides de lysine (Midoux et al., 2002). Ils présentent une activité plus importante que le PEI ou le

DOTAP. L'utilisation de peptides comme vecteurs de transfection permet également d'utiliser des peptides possédant une autre activité et d'avoir accès à une multifonctionnalité des complexes, tels les peptides LAH4 (KKALLALALHHLAHLAHLALALKKA) qui présentent une activité antibactérienne (Kichler et al., 2003).

1.3.4.6 Les poly(amidoamines) (PAMAM) :

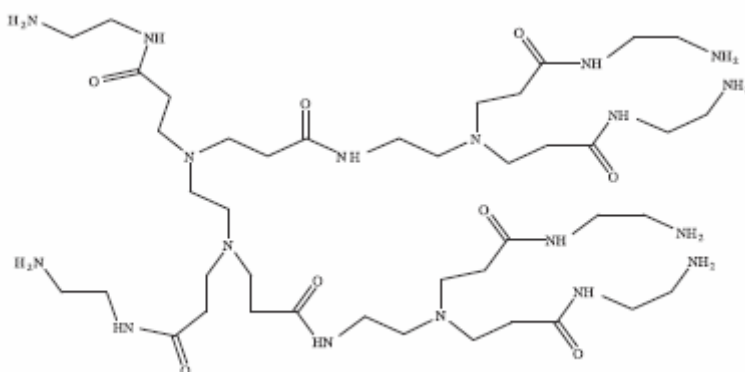


Figure 1-8 : Poly(amidoamine)

Les poly(amidoamines) sont des dendrimères dont le monomère est un amidoamine. Un dendrimère est une macromolécule constituée de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention, à la fin de chaque cycle réactionnel, d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique globulaire, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentées en périphérie. Les diverses ramifications ménagent entre-elles des cavités internes. Ce sont des polymères monodisperses. Les dendrimères peuvent être constitués de sucres (glycodendrimères), de peptides, de amidoamines (PAMAM) ou encore de propylèneimine. Ils sont utilisés pour la libération des médicaments dans le but d'augmenter la sélectivité ainsi que la stabilité des agents thérapeutiques. Les complexes peuvent être formés en utilisant les cavités formées au sein du dendrimère ou en greffant la molécule à une fonction terminale (Cloninger M, 2002). Ces molécules peuvent également être utilisées comme vecteur de transfection : deux classes sont alors utilisées du fait de leurs propriétés chimiques : les poly(amidoamines) et les poly(propylène imine) (Zinselmeyer et al., 2002)

Les poly(amidoamines) constituent la première famille de dendrimère décrite. Leur première utilisation en transfection est rapporté par Haensler et Szoka en 1993. C'est la présence de nombreuses fonctions amine secondaire et tertiaire qui les rend efficaces pour cette indication. Les groupements amine terminaux permettent l'interaction avec les groupements phosphate de l'ADN. Les groupements amine tertiaire présents au sein de la structure lui confèrent un pouvoir tampon (Brown et al., 2001).

L'ADN s'enroule autour des dendrimères pour former des complexes dont la taille a été évaluée pour des polyamidoamines de 6^{ième} génération à 50 nm (Gossl et al., 2002 ; Tang et al., 1996). Le type de polyamidoamine utilisé fait varier le complexe mais également l'efficacité de transfection. Ainsi un dendrimère de 3^{ième} génération ne complexe pas l'ADN. Au delà de la 4^{ième} génération et d'un excédant de charge, les polyamidoamines complexent l'ADN et forment des particules de charge nettement positive. L'efficacité de transfection augmente de manière exponentielle entre la 4^{ième} et la 10^{ième} génération avec un plateau à la 8^{ième} génération. La formation des complexes n'est influencée ni par la concentration en sel ni par le pH. Ils présentent donc une bonne stabilité dans les conditions physiologiques. La dissociation du complexe n'intervient qu'en présence de détergent ionique tel que le SDS. Les PAMAMs sont efficaces sur de nombreux types cellulaires. Leur efficacité est 10 à 100 fois supérieure à celle des lipides cationiques (Kukowska-Latallo et al., 1996). Les PAMAM présentent une efficacité de transfection pratiquement égale à celle du PEI linéaire de 22 kDa. De plus ils présentent une faible cytotoxicité qui permet leur utilisation sur 24-48h et donc d'augmenter l'efficacité de transfection en allongeant le temps de contact ce qui n'est pas possible avec le PEI (Gebhart et al., 2001).

L'utilisation de polyamidoamines partiellement dégradées par hydrolyse dans l'eau ou dans le butanol a été évoquée par Tang et collaborateur (Tang et al., 1996). Leur capacité de transfection est supérieure à celle des dendrimères natifs. Cette variation n'est pas due à des variations dans la morphologie du complexe, ceux-ci présentant la même forme et la même taille que les complexes formés avec des dendrimères non dégradés. C'est leur plus grande flexibilité qui est à l'origine de cette différence. En effet la forme native est compacte et ne permet pas de remaniement de la molécule. Les formes dégradées présentent une conformation développée du fait de la répulsion entre les groupements terminaux. Lorsqu'ils sont complexés avec de l'ADN du fait de la neutralisation des charges terminales, les PAMAMs présentent une forme plus compacte. Au sein des endosomes leur pouvoir tampon va permettre l'augmentation en charge du polymère. La quantité de polymère nécessaire pour complexer l'ADN est donc moins importante et une partie est libérée dans le milieu. Ces

molécules reprennent alors une forme développée. Ce phénomène de gonflement des polymères participe au gonflement des endosomes qui mènera à leur éclatement et à la libération des complexes dans le cytoplasme. Ceci est corroboré par le fait qu'il existe un taux optimal de dégradation. Au dessus de ce taux la gêne stérique est trop importante pour permettre ces changements de conformation. Au dessous, les molécules sont trop petites pour participer à ce phénomène.

Leur faible toxicité en fait un vecteur intéressant pour une utilisation *in vivo*. Ainsi ils présentent une efficacité de transfection supérieure au PEI branché de 25 kDa dans le cadre d'une étude sur la transfection d'artères carotides de lapin (Turunen et al., 1999) mais une plus faible efficacité au niveau pulmonaire après administration intratrachéale (Rudolph et al., 2000). En association avec un plasmide dérivé du virus d'Epstein-Barr, l'injection intratumorale de complexes formés de dendrimères présente une efficacité dans l'arrêt de la croissance tumorale et mène à la prolongation de la survie des sujets dans le cadre d'une thérapie utilisant des gènes-suicide (Maruyama-Tabata et al., 2000).

1.3.4.7 Le poly(éthylèneimine) (PEI) :

Le PEI est un polymère qui existe sous forme branchée (BPEI) ou sous forme linéaire (LPEI) en fonction de son mode de synthèse (figure 1-9). Il est utilisé comme vecteur de transfection depuis 1995 *in vitro* et *in vivo* (Boussif et al., 1995). Il existe dans le commerce sous forme de réactifs de transfection utilisant le PEI linéaire (Exgen500[®], jetPEI[®]).

Les deux types peuvent être utilisés comme vecteur de transfection mais ils présentent des caractéristiques propres.

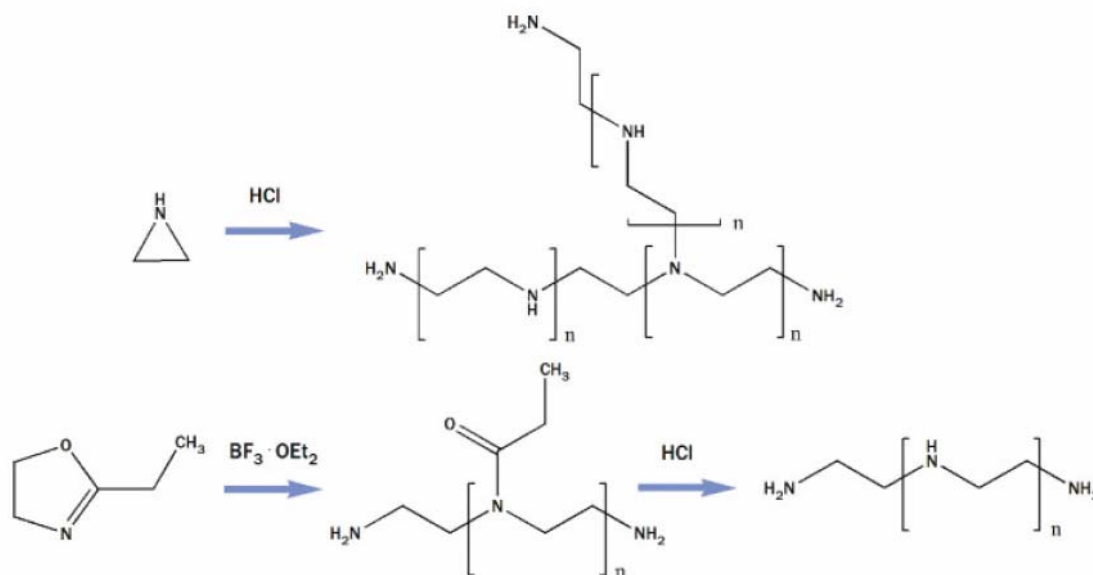


Figure 1-9 : Voies de synthèses du PEI :

Le PEI branché est synthétisé à partir de l'aziridine par catalyse par un acide. La polymérisation par ouverture du cycle de la 2-ethyl 2-oxazoline conduit à un polymère N substitué qui par hydrolyse peut être transformé en PEI linéaire (d'après Neu et al., 2005).

Les PEIs existent sous une grande diversité de poids moléculaire allant de 1000 Da à $1,6 \cdot 10^3$ kDa mais les PEIs utilisés dans le cadre de la transfection ont un poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa. Des poids moléculaires plus importants présentent une plus forte cytotoxicité (Fisher et al., 2003). Ces polymères peuvent présenter une forte densité de charge cationique. En effet un atome sur 3 est un atome d'azote qui peut être protoné. Comme le PEI ne contient pas d'amine quaternaire, les charges sont générées par protonation des groupements amine en milieu physiologique. La densité de charge est liée au pH. A pH = 7,4 seules 20 % des amines sont protonées alors qu'à pH = 5, 45 % le sont (Suh et al., 1994).

Le PEI est capable de tamponner le milieu des endosomes et d'engendrer un choc osmotique menant à la rupture de leur membrane. Son utilisation en transfection ne nécessite pas l'adjonction d'agents endosomolytiques. Les complexes PEI/ADN sont classiquement décrits en fonction du rapport N/P (l'azote étant apporté par le PEI et le phosphate par l'ADN). La structure du PEI détermine les propriétés physico-chimiques et biologiques des complexes qu'il forme avec de l'ADN ou de l'ARN. Les effets des propriétés physico-chimiques des complexes sur les phénomènes biologiques et les processus de transport ne sont pas encore totalement compris et nécessitent plus de recherche fondamentale (Neu et al., 2005).

La formation de complexes entre PEI et ADN produit des structures de forme sphérique, globulaire ou en forme de bâtonnet (Dunlapp et al., 1997). La complexation se fait

principalement par interaction électrostatique (Bloomfield et al., 1996 ; Bronich et al., 2001). L'augmentation de la concentration en sel entraîne une diminution de l'affinité de liaison par écrantage des charges (Kabanov et al., 1998). Il peut y avoir des phénomènes de substitution ou d'échange de polyions après formation du complexe dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. La complexation du PEI avec l'ADN est influencée en partie par la structure tertiaire de l'ADN. Des copolymères de PEI-PEG complexent préférentiellement de l'ADN sous forme super-enroulée plutôt que linéaire (Bronich et al., 2001). Mais la structure de l'ADN ne change pas après complexation (il reste sous forme B). Lors de la complexation à des N/P supérieurs à 6 une grande partie du PEI (86%) reste à l'état libre (Clamme et al., 2003). La purification des complexes mène à la réduction de la cytotoxicité mais également de l'efficacité de transfection car le PEI libre, endocyté en même temps que les complexes, participerait à l'effet tampon menant à la libération des complexes dans le cytoplasme (Boeckle et al., 2004). Ce processus de purification est peu utilisé car la formation des complexes est un processus à l'équilibre et on ne sait pas réellement évaluer les effets de la modification de concentration de l'un des composants dans le milieu après complexation .

Le comportement des complexes peut être modifié par la structure et le poids moléculaire du PEI. L'augmentation du poids moléculaire du PEI engendre une diminution de la taille des complexes. Mais en deçà de 2kDa et au dessus de 25kDa les variations de poids moléculaire n'engendrent plus de variation de taille. Ces observations sont valables pour les PEI branchés et les PEI linéaires (Brissault et al., 2003). Le PEI linéaire possède une capacité de condensation plus faible que les formes branchées, ceci étant lié à une présence moindre d'amine primaire dans la structure. Les amines primaires condensent plus efficacement l'ADN du fait de leur plus grande protonation quelque soit le pH (Wolfert et al., 1999). D'ailleurs les capacités de fixation ainsi que la stabilité des complexes et l'efficacité de transfection peuvent être corrélées à la proportion d'amines primaires. Lors du couplage du PEI avec des fonctions spécifiques (RGD, transferrine...), le couplage au niveau des amines secondaires et tertiaires est privilégié. Pour les PEI branchés, la structure et en particulier le taux de ramification, influence l'activité de formation des complexes ainsi que l'efficacité de transfection et la cytotoxicité. Les PEI présentant un faible taux de ramification nécessitent des N/P plus élevés pour une complexation totale de l'ADN que les PEI présentant un fort taux de ramification (Fischer et al., 1999). Des PEI présentant un fort taux de ramification forment des complexes plus petits avec une efficacité de transfection augmentée mais une toxicité plus importante.

Pour être complexé, 90 % des charges de l'ADN doivent être neutralisées, ce qui correspond à un ratio minimum N/P de 2-3, pour obtenir une stabilité des complexes avec du PEI branché (Gebhart et al., 2003 ; Petersen et al., 2002) ou du PEI linéaire (Choosakoonkriang et al., 2003 ; Jeog et al., 2001). L'augmentation de la quantité de polymère modifie la taille des complexes. En augmentant le rapport N/P de 2 à 20, la taille des complexes passe de 1000 nm à 100-200 nm. Ceci s'accompagne d'une réduction de la polydispersité de la taille des complexes. Le type de milieu nécessaire pour la formation des complexes influence également leur taille. Avec un PEI linéaire de 22 kDa, dans un milieu physiologique, la taille des complexes est d'ordre micrométrique alors qu'en présence de 5 % de glucose, la taille des complexes chute à 30-60 nm. Ces phénomènes ont des répercussions lors de l'utilisation *in vivo* des complexes. En effet un milieu de phosphate de sodium est plus favorable que le chlorure de sodium ou le PBS.

La taille des polyplexes joue un rôle primordial dans la biocompatibilité du système et son extravasation. L'agrégation des complexes dans des conditions physiologiques est encore très controversée et doit être mieux caractérisée. En effet des particules de charge positive ont tendance à s'agréger avec le temps. Mais l'agrégation est également fonction de la charge de surface et de la force ionique du milieu. En général, des complexes formés à N/P 2 à 5 s'agrègent du fait d'interactions de type hydrophobe et de liaisons de Van der Waals. Pour un rapport N/P plus élevé, l'agrégation est moins importante du fait de la mise en place de forces de répulsion d'origine électrostatique. Les capacités d'agrégation sont variables en fonction du poids moléculaire. Des complexes formés avec un PEI de 48 kDa sont stables alors que ceux formés avec un PEI de 5 kDa s'agrègent pour former des particules de 750 nm à N/P = 7 (Kunath et al., 2003). L'agrégation s'observe pour l'ensemble des formulations citées quelle que soit la force ionique du milieu lors du vieillissement des solutions (Sung et al., 2003 ; Wightman et al., 2001).

1.3.4.8 Les polymères dégradables :

Une des barrières majeures à l'utilisation de polymères synthétiques comme vecteur de transfection *in vivo* réside en leur relative cytotoxicité. La toxicité des polymères est en partie liée à leur manque de dégradabilité et leur accumulation au sein de l'organisme. Pour répondre à ce problème, des polymères dégradables sont développés. L'utilisation de tels polymères permet également de s'assurer d'une meilleure décomplexation de l'ADN au sein

de la cellule. L'inefficacité de certains vecteurs de transfection réside, en effet, dans l'inhibition de la transcription du transgène du fait de la complexation des plasmides avec le vecteur. Plusieurs stratégies ont été développées dans cette optique. Deux stratégies peuvent être dégagées : l'utilisation de liaisons ester hydrolysables en conditions physiologiques, et l'utilisation de ponts disulfures.

Plusieurs polycations dégradables ont ainsi été décrits. Le poly [acide α -(4-aminobutyl)-L-glycolique] (PAGA) est issu de la polymérisation du monomère par des liaisons ester. Ce polymère présente une dégradation spontanée en milieu aqueux par attaque nucléophile des groupements amine. La dégradation finale aboutit à un monomère dégradé (L-oxylysine) dans un délai de six mois. Mais une dégradation rapide dans les 5 premières heures mène à des monomères de poids moléculaire 3 fois moins important. Ce polymère peut complexer l'ADN et le complexe ainsi formé protège l'ADN de la dégradation. Ce polymère présente une cytotoxicité à partir de 300 $\mu\text{g/ml}$. Il possède une activité 3 fois supérieure à celle de la PLL mais son utilisation nécessite la présence de chloroquine (Lim et al., 2000). D'autres polycations ont été synthétisés tels des poly(phosphoesters). Ceux-ci présentent également une toxicité faible Dose létale (LD)₅₀=100 $\mu\text{g/ml}$, celles de PEI (25 Kda) et PLL (20 Kda) étant de 20 $\mu\text{g/ml}$ et 40 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'intérêt de tels polymères réside dans le fait que leur vitesse de dégradation peut être modulée en fonction de divers paramètres comme la longueur de leurs chaînes latérales et le type de groupement porté par celle-ci. L'interaction avec l'ADN se faisant par les chaînes latérales portant des groupements amine, le clivage de ces dernières permet une décomplexation rapide de l'ADN au sein de la cellule (Zhao et al., 2003). D'autres polymères de type poly(β -aminoester), ont montré une efficacité égalant celle du PEI et se sont montrés de bons candidats pour la transfection *in vivo* (Pack et al., 2005).

Le poly-(acide lactique) (PLA) et le poly(acide lactique-l-glycolique) (PLGA) sont utilisés pour la formation de nanoparticules pouvant complexer l'ADN (Kumar et al., 2004). L'efficacité de transfection de ces particules est moindre que celle de liposomes *in vitro* mais la relation est inverse *in vivo*. L'avantage de ces particules est qu'elles engendrent un échappement rapide de l'ADN des endosomes. La dégradation progressive de ces particules entraîne également une expression prolongée du transgène *in vivo*. Par exemple l'expression du transgène (β -galactosidase) a été détectée jusqu'à 28 jours après injection intramusculaire de particules de PLGA contenant les plasmides dans un modèle murin (Panyam et al., 2003).

Le PEI est un vecteur efficace, mais ceci est contre balancé par sa relative toxicité. Les PEI de petit poids moléculaire (inférieur à 2000 Da) ne sont pas toxiques mais ne sont pas du tout efficaces en transfection. Forrest et al. ont utilisé cet antagonisme pour synthétiser des polymères de PEI dégradable en liant des unités de PEI de petit poids moléculaire (800 Da) par des liaisons diacrylate. Ce polymère présente les mêmes caractéristiques que le PEI 25 kDa en terme de complexation et de protection de l'ADN. Il présente même une capacité de transfection supérieure. Cette effet semble être corrélé à une transcription plus efficace liée à une meilleure décomplexation des plasmides et une plus faible interaction du polymère dégradé avec les fonctions cellulaires (Forrest et al., 2003). Une approche similaire a été réalisée avec des copolymères de PEI et PEG (Ahn et al., 2002).

L'utilisation de ponts disulfure, qui seront clivés dans des milieux réducteurs comme le cytoplasme et le noyau, a été exploitée dans deux types d'approche. Le poly[lys-(AEDTP)] est un polymère dont les résidus interagissant avec l'ADN sont liés au polymère par des ponts disulfure. La décondensation de l'ADN intervient donc en présence d'agents réducteurs comme le dithiothreitol. La transfection de cellules de type HepG2 avec ces polymères est 50 fois plus efficace qu'avec de la PLL (Pichon et al., 2002). Gosselin et al. ont lié des unités de PEI 800kDa avec ce même type de liaison. Tous les polymères générés se sont révélés moins toxiques que le PEI 25 kDa mais également moins efficaces (Gosselin et al., 2001).

1.3.5 Les vecteurs synthétiques : des outils modulables.

1.3.5.1 Les barrières à une transfection efficace :

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux polymères peuvent servir de vecteurs de transfection du fait de leur caractéristiques intrinsèques. Malheureusement jusqu'à présent ils n'égalent pas l'efficacité *in vitro* et surtout *in vivo* des vecteurs viraux. Ce manque d'efficacité est lié à plusieurs facteurs :

- Leur cytotoxicité limite quantitativement leur utilisation.
- Les particules cationiques ont tendance à s'agréger. D'autre part leur manque de stabilité est à l'origine de leur élimination rapide de l'organisme. Ce phénomène est exacerbé par leur forte interaction avec les protéines plasmatiques.

- Leur charge les rend également plus prompts à des phénomènes d'interaction non spécifiques et de ce fait rend la transfection non spécifique de nature. Ainsi la quantité de complexes présents au niveau de la zone à transfecter peut être réduite.
- L'échappement des endosomes est un processus très variable d'un vecteur à l'autre.
- La faible translocation nucléaire en dehors des phénomènes de mitose est un frein à la transfection des cellules post-mitotiques ou présentant un cycle cellulaire long comme les cellules hépatiques.

Mais les vecteurs synthétiques sont très modulables, c'est pourquoi de nombreuses équipes cherchent à conjuguer différents polymères pour associer leurs avantages. Le but de ces études est d'obtenir une synergie d'action permettant de générer un vecteur efficace pour la transfection *in vivo*. Diverses stratégies ont été mises en œuvre :

1.3.5.2 Utilisation de polyéthylène glycole (PEG) :

Le PEG est utilisé depuis de nombreuses années comme adjuvant pour la libération de molécules d'intérêt thérapeutique *in vivo*. Son utilisation, dans le cadre du transfert de matériel génétique relève de plusieurs effets. Premièrement il diminue la toxicité de nombreux vecteurs. Des groupements PEG liés à de la PLL ou du PEI diminuent fortement leur toxicité. Ce phénomène est déterminant dans le maintien de l'expression du transgène *in vivo*. L'injection itérative, au niveau de la moelle épinière de souris, de complexes BPEI/ADN entraîne une expression qui chute de 70% en deux semaines alors que l'expression est maintenue avec des complexes PEG-BPEI/ADN (Kommareddy et al., 2005). Le PEG est reconnu comme permettant la stabilisation des complexes. En effet il rend ces derniers plus hydrosolubles. Des complexes de LPEI/ADN précipitent à une concentration en ADN de 0,5 mg/ml alors que des complexes formés à partir de PEG-LPEI ne précipitent pas même à une concentration de 1,5 mg d'ADN par ml. Généralement l'agrégation des complexes liée en partie à leur interaction avec les protéines plasmatiques est à l'origine de leur élimination rapide de l'organisme. Le PEG, du fait de son caractère hydrophobe empêche ces interactions par compensation de charge et favorise la circulation des complexes. Les complexes de BPEI/ADN sont localisés préférentiellement au niveau des poumons suite à une injection intravasculaire. Dans des modèles murins le greffage d'un groupement PEG permet une

circulation intra vasculaire plus longue ce qui permet une expression du transgène au niveau de tumeurs et bien que faiblement au niveau rénal (Kommareddy et al., 2005). La plus grande stabilité des complexes permet également d'injecter une plus grande quantité d'ADN ce qui entraîne une plus grande rémanence sanguine, les mécanismes d'élimination étant saturables. Enfin le greffage de ligands spécifiques par l'intermédiaire de groupements PEG permet d'éliminer toute interaction entre le ligand et le vecteur. Il n'y a donc aucune action néfaste du vecteur vis à vis du ligand et celui-ci réagit comme lorsqu'il est libre.

1.3.5.3 Modifications permettant la localisation nucléaire :

La barrière nucléaire est un frein à la transfection par des vecteurs non viraux. Différentes approches ont été expérimentées pour augmenter ce transport et ce surtout dans les modèles cellulaires ne se divisant pas ou lentement :

- greffage d'un motif peptidique portant une séquence de localisation nucléaire
- greffage d'une séquence peptidique correspondant au domaine de liaison de l'importine β de l'importine α
- utilisation de ligands de récepteurs nucléaires.

Les protéines nécessaires à l'activité nucléaire, comme les facteurs de transcription par exemple, portent dans leur séquence peptidique, une séquence spécifique de localisation nucléaire (NLS). Cette séquence permet l'interaction avec l'importine α et le déclenchement de la translocation nucléaire par des mécanismes actifs à travers les complexes du pore nucléaire (figure: 1-10). Un certain nombre d'études ont associé cette séquence à des complexes de transfection par simple interaction électrostatique ou par greffage covalent au vecteur ou au plasmide lui-même par la technique de PNA. Les résultats des différentes approches sont variables avec parfois une augmentation de l'efficacité de transfection (Cartier et al., 2002). L'approche de Carrière et al. est basée sur ce même principe, i.e favoriser le transport actif, mais exploite une autre séquence. L'importine α interagit avec l'importine β pour former un complexe qui sera transloqué. Cette interaction se fait par l'intermédiaire d'une petite séquence peptidique dite domaine de liaison de l'importine β . Même si les auteurs démontrent une augmentation de l'efficacité de transfection lorsque cette séquence est associée à des lipoplexes, celle-ci semble liée aux modifications des caractéristiques physico-chimiques des lipoplexes plutôt qu'à une augmentation du transport nucléaire (Carrière et al., 2003).

Les récepteurs nucléaires constituent une famille de récepteurs qui peuvent traverser la membrane nucléaire après avoir interagi avec leur ligand. Cette propriété a été utilisée pour favoriser le passage de plasmides modifiés par de la dexaméthasone. La liaison de la dexaméthasone sur le récepteur des glucocorticoïdes entraîne son passage dans le noyau. L'efficacité de transfection a été augmentée de 20 à 40 fois dans des cellules post-mitotiques par rapport aux plasmides non modifiés (Rebuffat et al., 2001 ; Rebuffat et al., 2002).

Ces approches sont très intéressantes *in vitro*, mais se révèlent peu efficaces *in vivo*. La seule approche qui ait pu montré une efficacité est l'utilisation de séquences nucléiques de localisation nucléaires (DTS) (Dean et al. 2005). Les DTS correspondent à une séquence de 72 paires de bases provenant du promoteur de SV40. Ce promoteur présente différents sites de liaison de facteurs de transcription ubiquitaires comme AP1, AP2, AP3, NF- κ B, Oct1 et TEF-1. La présence de DTS dans le plasmide transfectant augmente le transport nucléaire de celui-ci dans des cellules post-mitotiques. C'est l'interaction de facteurs de croissance nouvellement synthétisés, présentant une séquence NLS, qui va permettre l'interaction avec l'importine α et donc le passage par le complexe du pore nucléaire. Cependant, tous les facteurs de transcription ne peuvent pas être exploités pour la translocation nucléaire d'un plasmide car il faut que le domaine de liaison à l'ADN soit bien distinct de la séquence NLS. Ainsi SP1, qui présente sa séquence NLS dans le doigt de zinc permettant l'interaction avec l'ADN, ne peut interagir

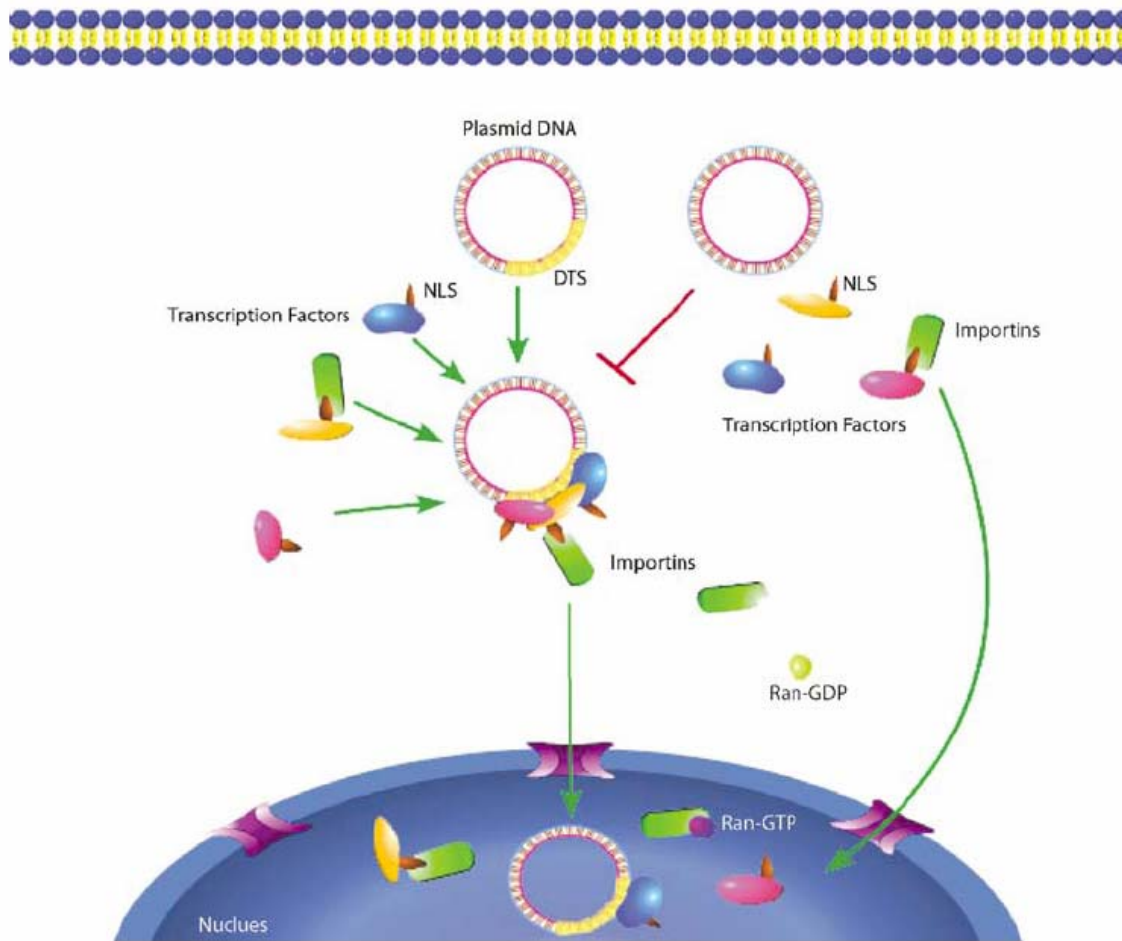


Figure 1-10: Modèle de transport nucléaire d'ADN plasmidique lié aux séquences nucléotidiques de transport nucléaire. Une fois dans le cytoplasme, le plasmide contenant une DTS (en jaune), interagit avec des facteurs de transcription nouvellement synthétisés pour former un complexe nucléo-protéique. Les facteurs de transcription comportant des séquences de localisation nucléaire peuvent interagir avec l'importine α pour permettre la translocation nucléaire. Les plasmides ne portant pas cette séquence nucléotidique ne peuvent interagir avec ces facteurs de transcription (Dean et al., 2005).

avec l'importine α après sa fixation sur un plasmide. NF- κ B dont les deux séquences sont éloignées peut interagir avec l'importine α . L'inclusion de telles séquences dans un plasmide transfectant a permis d'augmenter la capacité de transfection du plasmide nu par électroporation d'un facteur 20 au niveau de cellules musculaires lisses chez la souris (Li et al., 2001; Blomberg et al., 2002). Mais cette approche n'a pas encore été testée en polyfection.

1.3.5.4 Augmentation de l'endocytose des complexes et ciblage cellulaire :

La plupart des vecteurs synthétiques interagissent de manière aspécifique avec les protéoglycanes extracellulaires par de simples interactions électrostatiques. Ce phénomène aspécifique permet leur internalisation par endocytose mais il pose un problème dans le cadre de leur utilisation *in vivo*. En effet ces complexes seront potentiellement internalisés par toutes les cellules avec lesquelles ils entreront en contact, ce qui nécessitera une quantité importante de plasmide. C'est pourquoi dans le but de favoriser l'endocytose des complexes, des ligands particuliers ont été greffés sur du PEI, de la PLL ou même des lipides cationiques. Les ligands présents à la surface de ces complexes permettent une interaction spécifique, de type ligand-récepteur, ayant une plus forte affinité avec les cellules portant le récepteur ciblé. Les stratégies sont multiples et dépendent des cellules ciblées. Ainsi des groupements galactose sont utilisés pour cibler les hépatocytes et des groupements mannose pour cibler les récepteurs aux asialoglycoprotéines présentes sur les macrophages (Akasaka et al., 1999 ;Remy et al., 1995). La transferrine (Kircheis et al., 1997) et la protéine liant le folate ont été utilisées pour cibler les cellules cancéreuses à division rapide (Dauty et al., 2002). Des motifs RGD de liaison à certaines intégrines ont également été utilisés (Colin et al., 200 ;Carlisle et al., 1999) de même que des anticorps (Chiu et al. 2004). L' utilisation d'anticorps est limitée par leurs effets sur la physico-chimie des complexes qui sont en général de grande taille et moins stables. De plus l'utilisation répétée *in vivo* peut induire le développement d'une réponse immunitaire. C'est pourquoi ce ne sont que des fragments d'anticorps qui sont utilisés actuellement (Lungwitz et al., 2005).

L'utilisation de telles stratégies permet également d'augmenter l'endocytose en associant l'endocytose récepteur-dépendante.

1.3.5.5 Modifications permettant l'échappement des endosomes :

Comme cela a été discuté précédemment certains polymères cationiques permettent la déstabilisation de la membrane des endosomes soit par leur pouvoir tampon (effet de pompe à proton), soit par interaction directe du polymère avec la membrane. Ces vecteurs tel le PEI sont souvent les plus efficaces en transfection. Mais pour un certain nombre de systèmes non viraux l'échappement des endosomes est un véritable problème. Ainsi pour la transfection avec de la poly(L-lysine), l'adjonction de chloroquine est un pré-requis, ce type d'approche

n'étant possible qu'*in vitro*. Des peptides fusogéniques mimant le mode d'action de certains virus ont été utilisés. En particulier, l'hémagglutinine HA-2 du virus influenza a été couplée à des lipides cationiques (Navarro-Quiroga et al., 2002) ainsi qu'à de la PLL (Wagner et al., 1992) pour augmenter leur efficacité *in vitro*. Le peptide endosomolytique JTS1 incorporé dans des complexes PLL/ADN augmente jusqu'à mille fois le pouvoir de transfection de la PLL (Wagner, 1999).

2 Transfection locale *in vivo* :

Les vecteurs synthétiques dans le cadre du transfert de gène *in vivo* rencontrent comme nous l'avons vu précédemment un certain nombre de barrières. Le mode d'administration le plus couramment utilisé pour les expériences de transfection *in vivo* est la voie intraveineuse. Néanmoins la circulation de complexes contenant de l'ADN est fonction de leur stabilité ainsi que de leur éventuelle spécificité. Les gros complexes formés par agrégation de complexes peu stables en milieu physiologique, sont rapidement éliminés de la circulation. Du fait de leur interaction non spécifique avec les membranes plasmiques, les complexes se localisent en général, dans les tissus pulmonaires car le système capillaire pulmonaire est le premier rencontré après une injection intraveineuse. L'adsorption à leur surface de protéines sériques va faciliter leur élimination au niveau du système hépatique ou rénal. Ainsi l'approche d'autres types de tissus par cette voie est difficile. De plus le manque de spécificité nécessite l'utilisation d'une quantité importante de matériel transfectant. Or les polymères synthétiques quels qu'ils soient présentent une relative toxicité. Enfin la présence de nucléases dans l'ensemble des compartiments traversés par l'ADN nécessite souvent l'injection itérative de matériel génétique. Or l'injection répétée d'ADN ne peut être à l'origine d'une réaction immunitaire de par la présence de motifs CpGs (Herweijer et al., 2003). L'injection locale de matériel génétique permet de contourner certains de ces problèmes. Les barrières hépatiques et rénales sont levées, et le manque de spécificité n'est alors plus un problème puisque le matériel génétique est injecté au contact des cellules cibles. Néanmoins les problèmes liés à la dégradation de l'ADN, à la toxicité des vecteurs demeurent. De plus la diffusion de complexes au sein d'un tissu est limitée par leur taille. Des particules de 500 nm soumises à un champ électrique de 100 à 200 V ont un coefficient de diffusion se situant entre 10^{-9} et 10^{-12} cm²/s dans un mélanome murin (Zaharoff et al., 2002). Cette faible diffusion motive les stratégies de libération locale, en particulier l'utilisation de matrices polymériques. Les

matrices polymériques qu'elles soient naturelles (collagène, acide hyaluronique) ou synthétiques (PLGA) sont couramment utilisées pour la culture cellulaire en ingénierie tissulaire. Les éponges de collagène sont utilisées depuis de nombreuses années en chirurgie esthétique pour la cicatrisation de certaines plaies. L'incorporation au sein de telles matrices de matériel génétique sous forme d'ADN nu ou complexé répond théoriquement à plusieurs problèmes en constituant un système de réservoir d'ADN et en permettant la protection du matériel génétique. De plus leur dégradation doit permettre une libération prolongée de l'ADN. Ceci doit éviter d'avoir à réintervenir sur le site traité mais également permettre de libérer une quantité totale de matériel importante sans effet toxique. Les applications sont multiples et recouvrent les domaines de l'ingénierie tissulaire en premier lieu mais également la vaccination anti-cancéreuse, voir la thérapie génique de maladies systémiques. L'ADN est une molécule beaucoup plus stable, plus facile à produire et plus économique que les protéines dans ce type d'application. Ainsi les cellules environnantes servent de bioréacteurs pour la production de protéines d'intérêt qui vont permettre l'activation paracrine et autocrine des cellules *in situ*.

L'utilisation des matrices polymériques se base sur deux principes : la libération progressive dans le milieu environnant et la libération médiée par le substrat (transfection en phase solide). Ce sont les caractéristiques physico-chimiques du vecteur de transfection et de la matrice qui vont déterminer le type de mécanisme mis en jeu. Dans la plupart des stratégies utilisées les deux types de mécanismes coexistent (Jang et al., 2004).

2.1 Technique de transfection locale par libération de matériel génétique depuis une matrice :

La libération progressive correspond à la libération prolongée d'ADN depuis des matrices polymériques. Cette méthode a la capacité d'augmenter l'efficacité du transfert de gène en maintenant une concentration élevée d'ADN dans l'environnement cellulaire et en protégeant celui-ci de la dégradation. L'expression du transgène peut être augmentée par internalisation successive de l'ADN libéré au cours du temps. La quantité finale délivrée peut même être plus importante que celle injectée en bolus sans atteindre son degré de cytotoxicité. La libération de l'ADN va être liée à sa diffusion au sein de la matrice et à la dégradation de celle-ci. La diffusion est fonction du type d'interaction existant entre la matrice et le vecteur ou l'ADN, et de la taille du complexe ou de la conformation de l'ADN. En effet, les trois

conformations de l'ADN plasmidique, linéaire, enroulée et super-enroulée, diffusent à des vitesses différentes dans une matrice. C'est pourquoi elles peuvent être discriminées au cours d'une électrophorèse en gel d'agarose. Or ces trois formes n'ont pas la même efficacité de transfection. S'il est convenu que ce sont les formes super enroulées qui présentent la meilleure efficacité de transfection, il n'y a pas de consensus puisque des études ont montré que l'ADN linéaire peut être à l'origine d'une expression prolongée du transgène (Chen et al., 2001), et qu'en utilisant des lipides cationiques le type de conformation importe peu (Bergan et al., 2000). La forme de la matrice importe et surtout le rapport surface sur volume. Megeed et al., montrent que la libération d'ADN d'un hydrogel est plus importante au cours du temps si ce rapport augmente (Megeed et al., 2004). La vitesse de diffusion d'un plasmide au sein d'un hydrogel est inversement liée à son poids moléculaire. L'utilisation d'ADN complexé va limiter également la diffusion au sein de la matrice en fonction de la taille des complexes. Cohen-Sacks et al., ont montré que la libération de lipoplexes est moins rapide que celle d'ADN nu dans des matrices collagéniques (Cohen-Sacks et al., 2004). La libération de l'ADN est également fonction de la vitesse de dégradation de la matrice. Ainsi Kim et al. montrent que la libération d'ADN d'une matrice d'acide hyaluronique est dépendante du degré de réticulation de l'hydrogel. Plus celui-ci est réticulé plus la dégradation est lente et plus la libération de l'ADN est prolongée (Kim et al., 2003).

Des matrices collagéniques (Bonadio et al., 1999), des hydrogels de fibrine (Trentin et al., 2005), de HA (Chun et al., 2004) et de PEG (Quick et al., 2003), d'alginate (Kaul et al., 2005) mais également de PLGA (Shea et al., 1999) ont été utilisées avec succès. Le collagène sert de matrice pour la migration des cellules réparatrices dans le cadre de la cicatrisation. Il présente l'avantage d'avoir dans sa séquence des motifs RGD favorisant l'adhésion cellulaire. De l'ADN peut y être incorporé avant la formation de la matrice ou même après par simple adsorption. L'ADN peut y être incorporé seul ou complexé avec des polymères cationiques comme la PLL ou le PEI ou des lipides cationiques comme le DOTAP. L'adsorption des complexes dans la matrice permet d'augmenter l'efficacité de transfection et de diminuer la quantité d'ADN à incorporer. Les matrices collagéniques ont prouvé leur efficacité par exemple dans un modèle de défaut osseux limite chez le chien (Bonadio et al., 1999). Des matrices chargées avec 50 µg d'ADN complexé avec du PEI libèrent celui-ci pendant plus de 50 jours et transfectent les cellules environnantes après implantation sous-cutanée (Scherer et al., 2002). L'utilisation d'un plasmide exprimant HST-1/FGF-4 adsorbé dans une matrice d'atolocollagène implantée sous la peau de souris a permis de montrer que l'expression dans les cellules environnantes transfectées est suffisante pour engendrer une réponse

physiologique au plan systémique. En effet après implantation, une augmentation du nombre de plaquettes dans le sang circulant a pu être mise en relation avec l'augmentation de la concentration sérique de HST-1/FGF-4 (Ochiya et al., 1999). Des hydrogels formés de gélatine et de chitosane ont été utilisés dans le cadre de régénération de cartilage car ils présentent des dérivés de dégradation non toxiques et miment la matrice extra cellulaire, pouvant même entrer dans la synthèse de certains de ces composants comme la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et le collagène de type II. Ces hydrogels montrent une libération d'ADN avec un pic à 5 jours et une libération prolongée sur 2 semaines liée à leur dégradation. Il semblerait que l'ADN libéré soit complexé au monomère ce qui le protégerait des dégradations (Guo et al., 2005). Par génie génétique un polymère constitué de motifs provenant de la soie et de l'élastine et présentant une transition de phase sol-gel à la température corporelle, a été synthétisé pour la libération de médicaments. En injection intra tumorale ces gels entraînent une expression à 7 jours qui décroît jusqu'au 28^{ième} jour. Cette décroissance est liée à la dégradation de la matrice qui entraîne une décroissance de la libération (Megeed et al., 2003). L'utilisation de matrice de PLGA est particulièrement exploitée dans le cadre de la transfection *in vivo*. Des procédés de fabrication ne nécessitant pas l'utilisation de solvants organiques permettent la constitution d'architectures bien tolérées *in vivo* au contact desquelles et dans lesquelles les cellules peuvent adhérer et proliférer. De telles architectures implantées sous la peau de rats a permis la transfection des cellules adjacentes 4 semaines après leur implantation alors qu'une injection locale du plasmide n'a aucun effet. Ces membranes permettent la protection de l'ADN et sa libération progressive. La vitesse de dégradation de la matrice est modulable en fonction du poids moléculaire utilisé et peut s'étendre de 10 à 30 jours. L'ADN libéré n'est pas dégradé et permet la transfection *in vitro* malgré l'acidification du milieu engendré par la dégradation du polymère (Shea et al., 1999). L'incorporation de complexes de PEI/ADN pour l'expression de la "bone morphogenetic protein-4" (BMP-4) dans une matrice de PLGA permet la formation d'os dans le cas d'un défaut osseux crânien limité (Huang et al., 2005). L'incorporation de complexes dans ce cas est efficace alors que celui de plasmides nus ne l'est pas.

2.2 La transfection en phase solide :

Dans le cas de la transfection en phase solide, on procède à l'immobilisation de complexes (vecteur/ADN) à la surface ou dans le matériau qui sert de substrat d'adhésion aux

cellules. Cette méthode place les plasmides dans le microenvironnement des cellules et permet d'éliminer les premières barrières liées à la physico-chimie des complexes comme l'agrégation et la diffusion. Dans ce type de systèmes ce ne sont que les cellules au contact de la matrice qui seront transfectées. Une telle caractéristique suggère qu'on peut contrôler spatialement la transfection. Ainsi des architectures complexes peuvent être créées pour cibler des cellules en fonction de leur localisation au sein d'un tissu (Jang *et al.*, 2004). L'immobilisation permet d'augmenter la concentration en plasmide. La fixation de groupements biotine sur des complexes de type (PLL/ADN) permet de fixer jusqu'à 2 µg d'ADN /cm² sur une surface traitée à la neutravidine. La fixation de complexes de type PLL/ADN sur une surface de culture cellulaire par l'intermédiaire d'interactions de type biotine/neutravidine permet d'augmenter la taux de transfection par rapport à des systèmes classiques dans lesquels les complexes sont mis en solution (Segura et al., 2002). De plus le taux de transfection augmente entre 48 et 96 heures après la mise en culture ce qui tend à démontrer que l'internalisation des complexes fixés à la surface se prolonge au cours du temps et permet d'augmenter l'expression du transgène. Le même type de traitement appliqué à des complexes de PEI n'entraîne pas de variation significative de l'efficacité de transfection par rapport aux systèmes en solution (Segura et al., 2003). Les cellules au contact de complexes fixés sur leur support vont soit internaliser l'ADN directement soit provoquer la dégradation des liaisons entre le vecteur et la matrice et entraîner la libération des complexes.

Des vecteurs synthétiques ont été immobilisés sur des biomatériaux par le biais de liaisons biotine/streptavidine, par lyophilisation ou par adsorption non spécifique. Des plasmides nus ont pu également être immobilisés dans un hydrogel de HA par réticulation chimique (Kim et al., 2003). Malgré cette réticulation, les plasmides exprimant le PDGF ont permis d'augmenter la prolifération des fibroblastes cultivés au contact. Des PAMAMs complexés à des plasmides ont été lyophilisés dans des membranes de PLGA et collagène. Ces complexes immobilisés peuvent induire une transfection *in vitro* et *in vivo* (Bielinska et al., 1999). *In vivo* ces membranes ont permis la transfection transdermique de kératinocytes indifférenciés ou de fibroblastes de la région périfolliculaire. Par ailleurs, des polyplexes immobilisés dans une matrice de HA par l'intermédiaire de groupements biotine permettent la transfection de cellules cultivées sur la matrice, le nombre de cellules transfectées et le niveau d'expression du transgène étant dépendant de la taille des complexes. Alors que les petits complexes (100nm) transfectent plus de cellules, les gros complexes (1000nm) conduisent à une expression plus importante du transgène. Une immobilisation spatialement contrôlée des complexes a été réalisée de façon à orienter la croissance cellulaire (Segura et al., 2005). Enfin

Trentin et al., ont synthétisé un peptide pouvant complexer l'ADN et portant un groupement permettant la fixation covalente à la fibrine en présence du facteur XIII de la coagulation. Les matrices de fibrine libèrent l'ADN au fur et à mesure de leur dégradation et l'ADN libéré est capable de transférer des cellules. Ainsi après deux jours de culture, 8 % des cellules de type HUVECs cultivées au contact de ces structures sont transfectées (Trentin et al., 2005).

3 Films multicouches de polyélectrolytes : interfaces à activité biologique modulables

3.1 Films multicouches de polyélectrolytes : Principe

Les films multicouches de polyélectrolytes constituent des films minces (quelques nanomètres à quelques micromètres) pouvant être assemblés sur de nombreux substrats. Ces structures résultent de l'interaction entre des polyélectrolytes de charge opposée. Leur application dans le cadre des biomatériaux est la constitution d'interfaces fonctionnalisables pour des matériaux bioinertes. Ils peuvent également constituer des structures tridimensionnelles, comme des microcapsules, après dissolution du substrat ayant servi à leur construction (Volodkin *et al.*, 2004 ; Breguet *et al.*, 2005). La construction de ces films se fait par dépôt couche par couche de chacun des polyélectrolytes constitutifs.

3.1.1 Principe de dépôt couche par couche :

Le principe de la méthode de dépôt couche par couche, "Layer-by-Layer" (LbL) est décrit très schématiquement dans la figure 1-11. Un substrat chargé négativement est d'abord exposé à une solution de polyion de charge opposée (polycation) pendant un temps assez court (de 5 à 20 min) (Ramsden et al. 1995; Advincula et al. 1996; Hoogeveen et al. 1996). Les polycations s'adsorbent sur la surface et le surplus est éliminé par simple rinçage (Caruso et al. 1998; Lvov et al. 1999). Après rinçage, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement: il y a surcompensation de charge lors de l'adsorption (Caruso et al. 1998; Ladam et al. 2000). Par conséquent, lorsque ce substrat est exposé à une seconde solution, contenant des polyanions, ceux-ci peuvent également interagir et s'adsorber sur la surface. Cette adsorption est à nouveau suivie d'une étape de rinçage et le signe de la charge de

surface, à l'issue du rinçage, est de nouveau inversé. Des cycles consécutifs, alternant l'adsorption de polycations et de polyanions, permettent ainsi la croissance par étapes des architectures de polyélectrolytes. Grâce aux interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat, les films présentent généralement une bonne uniformité et une bonne adhésion sur le substrat. La surcompensation de charge à chaque étape du dépôt a clairement été mise en évidence par des mesures du potentiel ζ (Hoogveen et al. 1996; Caruso et al. 1999; Ladam et al. 2000). Cette surcompensation de charge constitue le moteur de la construction des multicouches de polyélectrolytes.

Néanmoins, même si au cours de la construction ce sont les interactions électrostatiques qui prédominent, d'autres types d'interactions peuvent entrer en jeu comme des interactions de type hydrophobe ou des liaisons hydrogène, en fonction de la nature des polyélectrolytes (Haynie *et al.*, 2005).

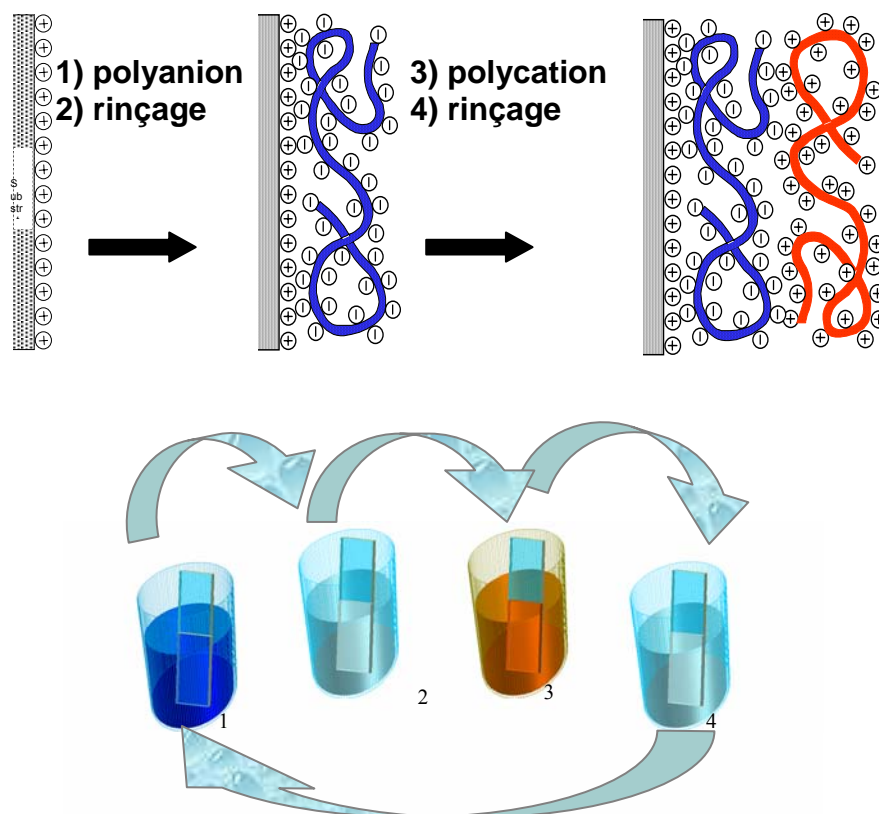


Figure 1-11 : Schéma de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions et répétition cyclique des deux étapes représentées (Decher G., 1997).

3.1.2 Croissance des films multicouches :

Le dépôt couche par couche peut être appliqué à de nombreux polyélectrolytes, qu'ils soient naturels comme le collagène (Zhang *et al.*, 2005), la fibrine, l'acide hyaluronique (Thierry *et al.*, 2003) ou le chitosane (Marudova *et al.*, 2005), ou qu'ils soient synthétiques comme le poly(styrene sulfonate) (PSS) ou la poly(allylamine) (PAH). La nature des polyélectrolytes va déterminer les caractéristiques physico-chimiques des assemblages, tout d'abord dans leur mode de croissance. On distingue en effet deux types de croissance : croissance linéaire et croissance exponentielle.

3.1.2.1 Les films à croissance linéaire :

Les films à croissance linéaire dont le modèle est le film (PAH/PSS)_n augmentent en masse et en épaisseur de façon linéaire. Ils se comportent ainsi parce qu'aucun des polyélectrolytes ne peut diffuser au sein de la structure. Néanmoins il existe une forte interpénétration entre deux couches adjacentes. Ces films sont classiquement décrits comme comportant trois zones (fig.8). Une zone en contact avec le substrat (zone I), une zone en contact avec le milieu (zone III) et une zone intermédiaire. Les zones I et III sont respectivement influencées par la nature du substrat et la nature du milieu. Lorsque les trois zones sont formées, seule la zone II s'étend par addition de couches (Decher *et al.*, 2003)

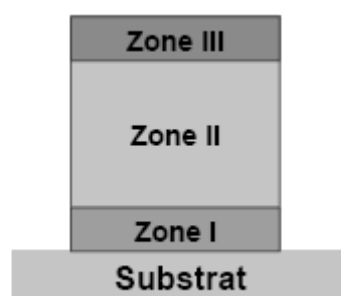


Figure 1-12 : Représentation schématique d'une multicouche à croissance linéaire. La zone I est adjacente au substrat, la zone II forme la majeure partie de la multicouche et la zone III est adjacente à l'interface film/solution ou film/air. La frontière entre les zones est diffuse et non plane et parfaitement localisée comme schématisé ici. Lorsque les trois zones sont formées, seule la zone II s'étend par addition de couches (Ladam *et al.* 2000)

3.1.2.2 Les films à croissance exponentielle :

Les films à croissance exponentielle sont décrits pour la première fois par Ebner *et al.* (1999) avec le système (PLL/alginate)_n. Ces films atteignent une épaisseur de 1,5 µm après le dépôt de 15 bicouches. Depuis, d'autres systèmes ayant le même comportement ont été étudiés tel le système (PLL/PGA)_n (Lavalle *et al.*, 2002) et le système (PLL/HA)_n (Picart *et al.*, 2002). Le mode de croissance est influencé par la diffusion d'un des polyélectrolytes au sein même de l'architecture. Brièvement, en mettant la multicouche préalablement au contact de la solution de polyanions, au contact de la solution de polycations, ces derniers vont à la fois interagir avec l'excès de charges négatives distribuées sur la surface extérieure du film, conduisant à la formation d'un excès de charges positives, et diffuser à l'intérieur du film en formant un réservoir de polycations "libres". Lorsque la solution de polycations est remplacée par le tampon pur, lors de la phase de rinçage, seule une partie des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche. Cette libération partielle résulte de l'excès de charges positives qui reste à la surface du film, créant une barrière de potentiel qui empêche la totalité des polycations de quitter la multicouche. Lorsque le film est ensuite mis au contact de la solution de polyanions, ceux-ci interagissent avec l'excès de charges positives et font ainsi disparaître la barrière de potentiel positif. Les polycations libres restant dans le film diffusent alors vers l'extérieur. Dès leur arrivée près de l'interface film/solution, ils sont complexés par les polyanions. Ces complexes peuvent interagir fortement avec l'interface et font alors partie intégrante de la nouvelle couche la plus externe du film.

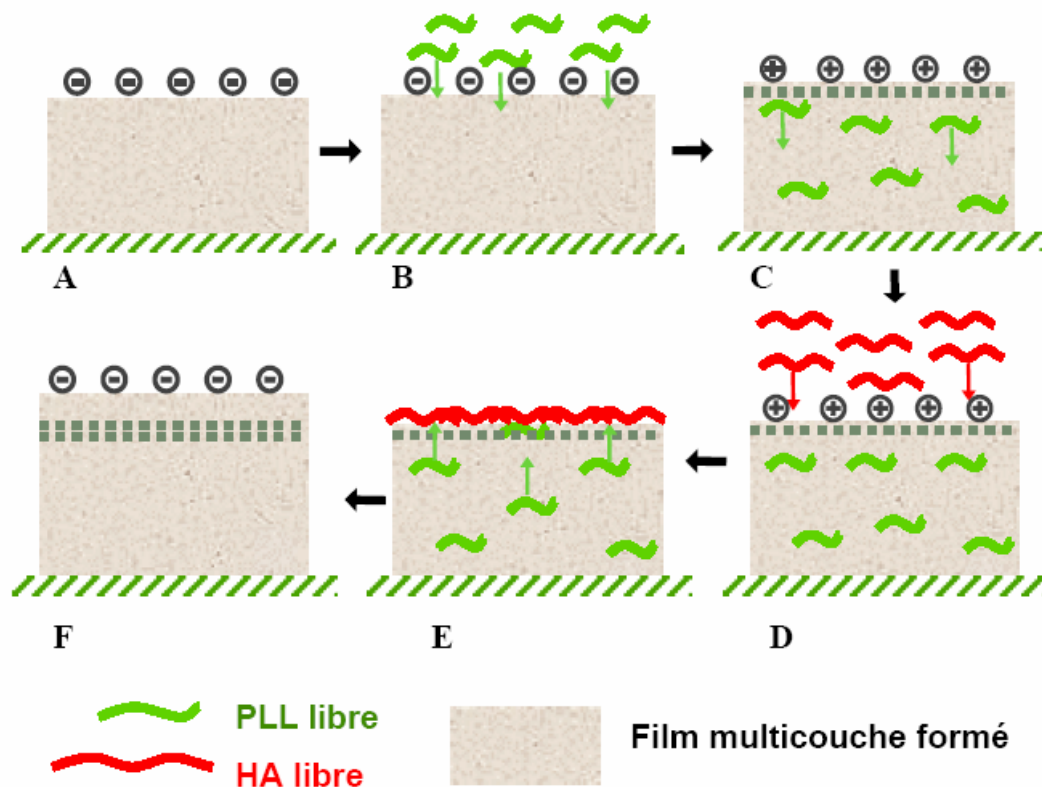


Figure 1-13 : Représentation schématique du mécanisme de construction d'une multicouche de poly(L-lysine)/acide hyaluronique (PLL/HA) :

(A) Film multicouche de PLL/HA chargé négativement. (B) Contact de la multicouche avec une solution de PLL. (C) Adsorption et diffusion de PLL dans la multicouche, suivies du rinçage (non représenté). (D) Contact de la multicouche avec une solution de HA. (E) Diffusion de PLL vers la surface et complexation avec HA à l'interface film/solution. (F) Film après rinçage de la solution de PLL présentant une charge négative en surface.

Cependant, récemment, Porcel et al. (2006) ont montré qu'au delà de 12 bicouches, un film de type $(PLL/HA)_n$ passe d'un mode de croissance exponentiel à un mode croissance linéaire. Ce phénomène semble lié à la restructuration du film empêchant la diffusion de PLL dans une partie du film. Un modèle de croissance semblable a été proposé pour expliquer la transition de phase de croissance des films de type $(PDADMA/PSS)_n$ sous l'effet de la température (Salomaki et al., 2005) et sous l'effet de l'utilisation de mélange de polyélectrolytes au cours de la construction (Hubsch et al., 2004).

3.1.3 Nature du substrat et technique de dépôt :

Ces architectures peuvent être construites sur de nombreux substrats quelle que soit leur nature, leur forme ou leur taille. Les supports les plus souvent utilisés dans la littérature

sont des surfaces planes ou des particules colloïdales, dont le matériau et les dimensions dépendent des applications envisagées et/ou des techniques de caractérisation employées. Il peut s'agir de substrats inorganiques tels que des lames de verre (Decher 1997), de quartz (Lvov, *et al.* 1995), de mica (Kim *et al.*, 1999) ou de silicium (Sukhorukov *et al.*, 1996; Thierry *et al.*, 2003) ou encore d'argent (Yamada et Shiratori 2000). D'autres substrats inorganiques tels que l'or (Caruso *et al.*, 1997; Kurth et Osterhout 1999) ou le titane fritté (Vautier *et al.*, 2003), l'acier (Tan *et al.*, 2003) ou des particules de calcium (Gao *et al.*, 2001) peuvent être recouvertes. On peut également utiliser des substrats organiques polymériques, comme des particules colloïdales de polystyrène (Donath, Walther *et al.* 1997), de silicone (Ai, Meng *et al.* 2003), de latex (Schuetz and Caruso 2002), de poly((methyl-méthacrylate) (Etienne *et al.*, 2005), mais aussi des polymères greffés avec des groupements ioniques (Teflon) (Chen and McCarthy 1997) et même des polymères standards non chargés (polypropylène, polystyrène, poly(éthylène-téréphtalate)) (Delcorte *et al.*, 1997; Brynda and Houska 2000).

Dans ce dernier cas, ce sont des interactions de type Van der Waals et/ou hydrophobe qui assurent l'adsorption du polyélectrolyte sur le support. De façon générale, comme l'auto-assemblage en multicouches n'impose aucune restriction de taille ou de forme aux supports, il est même possible de concevoir également des structures bi et tri-dimensionnelles (Hammond 1999). Il est devenu possible, par exemple, de diriger la formation de films selon des motifs imposés par le substrat en vue de construire des microstructures complexes régulières (Chen, Jiang et al. 2000; Jiang et al. 2000; Zheng, Rubner et al. 2002; Berg, Choi et al. 2003). D'autres formes peuvent également être envisagées comme des sphères creuses en assemblant des multicouches sur des particules de latex qui sont ensuite calcinées ou dissoutes sélectivement avec un acide ou un solvant organique adéquat (Caruso et al. 1999; 1999).

La méthode "traditionnelle" de dépôt est celle du procédé d'immersion en solution, ou "dip-coating", dans laquelle il s'agit de tremper le substrat dans un bain de polyanions ou polycations. Cette méthode permet facilement de varier les temps de trempage et de rinçage. De même, il est possible de faire varier le taux de sel ou le pH des solutions, de sécher ou non le film après dépôt de chaque couche.

D'autres techniques de dépôt ont été étudiées en vue de changer la structuration des films ou de les déposer plus rapidement. Ainsi, les polyélectrolytes peuvent être déposés à l'aide d'un procédé aérosol, le spray, contenant alternativement des polycations et polyanions. (Schlenoff *et al.*, 2000 ; Izquierdo et al., 2005 ; Porcel et al., 2005) ont ainsi

construit des films à base de PSS/PDADMAC en présence de sel (1M) en effectuant un rinçage entre chaque couche.

Une autre possibilité consiste à utiliser la méthode de “spin coating”. Il s’agit de déposer une gouttelette de polyélectrolyte sur une surface en rotation qui est étalée par force centrifuge lorsque la surface est mise en mouvement. Le temps de dépôt d’une seule couche peut être ainsi réduit à quelques secondes (Chiarelli *et al.*, 2001). En utilisant des solvants très volatiles, il est donc possible de construire des films sans rinçage entre les dépôts de polyélectrolytes. Les films déposés par cette méthode présentent une stratification homogène.

Enfin, on peut citer une autre technique de dépôt qui permet de réaliser des réseaux microgravés des films multicouches. Guo et al (Guo *et al.*, 2002) ont déposé des films à base de PAH/PAA sur un substrat en polyéthylène téréphtalate en utilisant un dépôt par jet d’encre.

3.2 Comportement des multicouches de polyélectrolytes vis à vis du milieu biologique :

3.2.1 Adhésion des protéines :

L’utilisation des films multicouches comme interfaces pour les biomatériaux les expose à un milieu riche en protéine. L’interaction de ces structures avec les protéines a donc été massivement étudiée. Il a été démontré que les protéines s’adsorbent à la surface des multicouches de polyélectrolyte et peuvent même être enfouies au sein de ces architectures. Après enfouissement les protéines peuvent conserver leur structure et leur activité biologique (Schwinté *et al.*, 2002, 2001). L’adsorption des protéines s’effectue quelles que soient la charge de la protéine et la charge de surface du film (Ladam *et al.* 2001). Néanmoins la quantité de protéine adsorbée à la surface et leur répartition est dépendante de la charge. Ainsi la quantité de protéine adsorbée est supérieure sur une surface de charge opposée. Ceci s’explique par les forces qui interviennent dans ces contacts. L’interaction des protéines avec les polyélectrolytes peut se faire par des liaisons de type Van der Waals, par des liaisons hydrogène, des liaisons dipolaires, des liaisons hydrophobes ainsi que des liaisons électrostatiques. Ce sont les liaisons électrostatiques qui prédominent.

L’adsorption est un phénomène dynamique dépendant de la force ionique, du pH et de la température (Jackler *et al.*, 2005). L’adsorption de protéines sur des surfaces de charge identique est due à l’hétérogénéité de charge à la surface des protéines en fonction de leur

structure primaire et secondaire. Ainsi Salloum et al.(2004), montre l'adsorption, sous forme d'îlots, de BSA sur des surfaces de type (PDADMA/PSS)_nPDADMA, par microscopie à force atomique. Mais l'adsorption des protéines ne mène pas à la formation d'une couche uniforme. Les protéines sont en effet recouvertes partiellement par des polyélectrolytes diffusant au sein de cette couche (Ngankam *et al.*, 2004 ; Ladam *et al.*, 2001). Salloum et al. montrent également que lors de l'adsorption de protéine de charge opposée à la charge de surface, la quantité est proportionnelle au nombre de couche de polyélectrolyte pour des architectures de type (PDADMA/PSS)_n. Ce phénomène s'explique par l'inclusion des protéines au sein même de la multicouche (fig.1-14). Le même phénomène a été observé pour l'adsorption de la nucléase de *Staphylococcus aureus* sur des architectures de type (PAH/PSS)_n. Il est lié à la complexation des protéines avec les polyélectrolytes ainsi qu'à des interactions hydrophobes (Jackler *et al.*, 2005). Ce phénomène est d'ailleurs réversible par augmentation de la concentration en contre-ion entraînant l'échange du complexe. L'adsorption de protéine est meilleure sur des surface hydrophobes (Prime *et al.*, 1991). Ce phénomène est observé également sur les multicouches de polyélectrolyte. Ainsi un film de type (PDADMA/PAA)_n très hydrophile est moins sujet à l'adsorption de protéines. C'est pourquoi l'emploi de groupement poly(éthylèneglycole) a été utilisé avec succès pour limiter l'adsorption de protéines (Boulmedais et al., 2004).

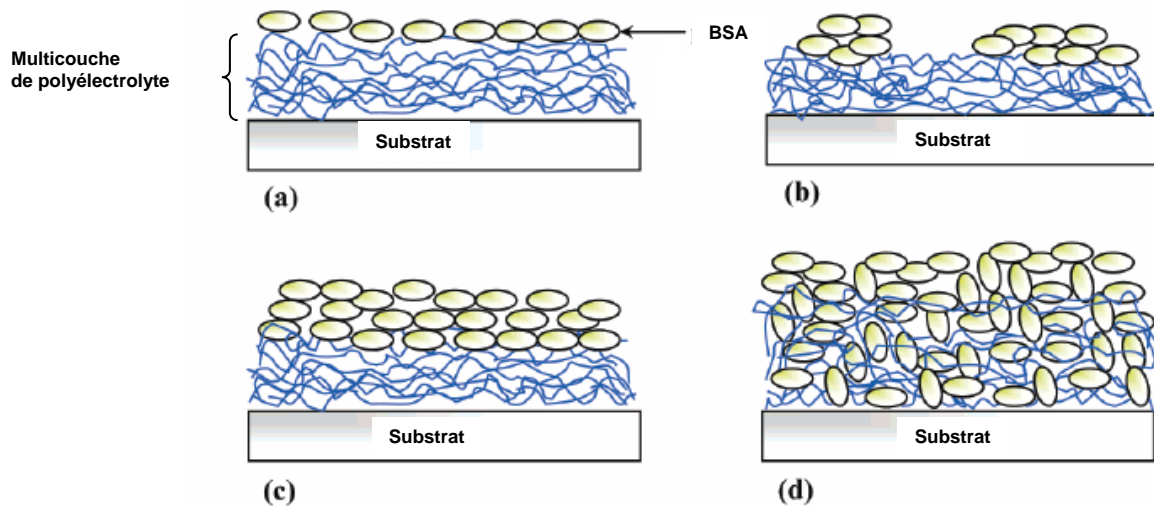


Figure 1-14 : Modèles d'interaction de protéines avec une multicouche de polyélectrolyte selon Salloum et Schlenoff (1994) :

Adsorption menant à la formation d'une monocouche (a) ou d'une multicouche (c) sans interpénétration avec la couche sous-jacente.

(b) Adsorption d'une protéine sur une surface de charge identique. Après adsorption les protéines s'agrègent sous l'effet d'interactions de type hydrophobe.

(d) L'adsorption d'une protéine sur une surface de charge opposée s'accompagne de l'inclusion de protéines dans la multicouche de polyélectrolyte.

3.2.2 Adhésion cellulaire :

Les multicouches de polyélectrolytes sont des substrats possibles pour la culture cellulaire. L'adhésion cellulaire sur ce type d'architecture est variable. Ainsi on a pu décrire des surfaces, construites par adsorption alternée de polyélectrolyte, anti-adhésives (Yang *et al.*, 2003) ou adhésives (Tryoen-Toth *et al.*, 2002). Les caractéristiques intervenant dans l'adhésion des cellules ne sont pas encore toutes élucidées. L'adhésion sur une architecture donnée semble cellule-dépendante et l'adhésion d'un même type cellulaire est dépendante du type d'architecture et de ses caractéristiques physico-chimiques.

La nature des polyélectrolytes utilisés pour la construction de l'architecture intervient tout d'abord parce qu'elle dicte les caractéristiques physico-chimiques du film en terme mécanique, et deuxièmement du fait de l'interaction directe du polyélectrolyte terminal avec les cellules. Ainsi plusieurs études ont montré l'importance du type de polyélectrolyte présent à la surface de la multicouche. Richert *et al.* (2002), ont montré par des expériences de micropeeling que pour des architectures de type (PLL/PGA)_n, l'adhésion de cellules de type chondrosarcome est beaucoup plus forte sur des films se terminant par de la PLL que sur des

films se terminant par du PGA. Dans cette étude plus le nombre de couches constituant le film augmente, moins l'adhésion des cellules est forte. Kidambi *et al.* (2004), montrent qu'une multicouche constituée de poly(acide 4-styrenesulfonique) (PSS) et de poly(chlorure diallyldiméthylammonium) (PDAC) présente des caractéristiques d'adhésion cellule-dépendante. Ainsi des architectures se terminant par du PSS favorise l'adhésion d'hépatocytes primaires et empêche l'adhésion de cellules fibroblastiques. Des films se terminant par du PDAC présentent les caractéristiques inverses. Ce caractère versatile permet la co-culture de ces deux types cellulaires sur des architectures présentant des motifs de PSS sur un film se terminant par du PDAC.

Il n'existe pas de corrélation entre l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire. Une surface présentant une faible adsorption de protéine peut favoriser l'adhésion cellulaire (Mendelsohn *et al.*, 2003).

Les caractéristiques mécaniques constituent un facteur important pour l'adhésion cellulaire sur des multicouches. Une corrélation a été établie entre l'augmentation du module d'élasticité d'un film et l'augmentation des capacités d'adhésion cellulaire (Thompson *et al.*, 2005). C'est Mendelsohn *et al.* (2003), qui montrent que des films de poly(allylamine) et poly(acide acrylique) construits à $\text{pH} = 2$, deviennent résistant à l'adhésion cellulaire. De même des films au caractère anti-adhésif de type $(\text{PLL}/\text{HA})_n$ après réticulation chimique permettent la culture de cellules de type chondrosarcome (Richert *et al.*, 2004). Ces observations ont été corrélées au degré d'hydratation du film.

Les propriétés d'adhésion cellulaire peuvent être également modifiées par l'adjonction dans la multicouche de protéines de la matrice extracellulaire. La laminine a été utilisée dans les films multicouches pour faciliter la croissance de motoneurons (Ai *et al.*, 2003; Bataille *et al.*, 1998). Des films constitués de PSS et de collagène de type I conduisent à une bonne adhérence de cellules telles que les myoblastes (Grant *et al.*, 2001). Il est également possible d'insérer un facteur de croissance neurotrophique comme le BDNF (brain-derived growth factor) dans des films $(\text{PSS}/\text{PAH})_n$ ou $(\text{PLL}/\text{PGA})_n$ pour favoriser la formation et la croissance d'axones. Les films terminés par PSS se sont révélés être très favorables au développement des axones (Vodouhe *et al.*, 2005).

Peu d'études néanmoins caractérisent le comportement cellulaire sur ces architectures. Vautier *et al.* (2003) ont montré que la couche terminale joue un grand rôle sur la morphologie de chondrosarcomes HCS-2/8. Sur un film formé d'un précurseur de PEI- $(\text{PSS}/\text{PAH})_2$, de deux paires de couches de (PSS/PAH) ou (PGA/PLL) et d'une couche terminale de polyanion, les cellules adoptent une forme plus étalée et présentent des points

focaux d'adhésion préférentiellement sur les films terminés par PSS et PGA. Des cellules de type SaOS et des fibroblastes pulpaire conservent leur phénotype lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces de type (PSS/PAH)_n (Tryoen-Toth *et al.*, 2002). Enfin l'expression d'intégrine $\beta 1$ par des cellules endothéliales est moindre lorsque celles-ci sont cultivées sur des multicouches de polyelectrolytes par rapport à des contrôles de culture sur le verre (Boura *et al.*, 2005).

3.2.3 Stabilité/Dégradabilité des films multicouches de polyelectrolytes dans un milieu biologique :

Les films multicouches de polyélectrolytes présentent un comportement variable en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur environnement. En effet les polyélectrolytes utilisés en général sont dit faibles. Leur densité de charge varie en fonction du pH. Ainsi même des variations faibles de pH peuvent engendrer des changements de structure du film qui peuvent se traduire par des gonflements (Sui *et al.*, 2003). Le taux de sel présent dans le milieu va faire varier également la structure et la stabilité du film dans le temps, car l'augmentation du taux de sel peut mener à un écrantage des charges du polyélectrolyte intervenant dans les interactions électrostatiques à l'origine de la formation de l'architecture. Sui *et al.* (2003) montre que la concentration critique en NaCl provoquant la décomposition d'un film de type (PSS/PDADMAC) est de 4,5 M. Il est à noter que du fait de l'homéostasie les conditions environnementales ne sont pas ou peu modifiées *in vivo*.

La stabilité dans le temps d'un film est dépendant de la nature des polyélectrolytes utilisés mais également de la longueur des chaînes. En effet, Houska *et al.* (2004), ont montré que la construction d'un film par dépôt alterné couche par couche d'une protéine et d'un polyanion est dépendante de la taille de la chaîne du polyanion. Lorsqu'on utilise des polyanions de faible poids moléculaire, la protéine adsorbée entre en compétition avec les protéines adsorbées sous-jacentes dans le cadre de l'interaction avec le polyanion. Cette compétition va mener à la re-solubilisation du polyanion. Ce fait est à prendre en compte puisque tout biomatériau implanté va être en contact avec des protéines.

Les films constitués de polypeptides sont sensibles à la dégradation par voie enzymatique (Picart *et al.*, ; Etienne *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2004). Ce phénomène dépend de l'énantiomère utilisé. Ainsi Jessel *et al.* (2005) montre qu'une protéine enfouie dans une multicouche constituée de poly(D-lysine) et de poly(acide glutamique) n'est pas accessible

aux cellules. La résistance des films peut également être augmentée par réticulation chimique. Picart et al. montrent que des films de type (PLL/HA)_n gardent leur intégrité en présence d'alpha chymotrypsine lorsqu'ils sont réticulés chimiquement. De même, des films de type (CHI/HA)_n sont moins dégradés après implantation *in vivo* s'ils ont été réticulés chimiquement.

3.3 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes :

L'adjonction de fonctions aux multicouches de polyélectrolytes peut se faire par inclusion de protéines, de peptides, de molécules à activité biologique (médicaments), de nanoparticules, de liposomes et d'ADN. Le mode d'inclusion au sein de ces architectures va dépendre des caractéristiques propres des molécules à inclure.

3.3.1 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes par des peptides ou des protéines :

L'inclusion de protéines peut se faire par simple adsorption du fait de leur charge. L'adsorption peut se faire en surface mais l'incorporation au cours de l'édification de l'architecture peut mener à l'enfouissement. La structure des protéines est un facteur influençant leur activité. Par des études par spectroscopie infra rouge, Schwinté *et al.* (2002, 2003) ont montré que les protéines enfouies peuvent conserver leur structure. La fonction de ces dernières est également conservée (Jessel et al., 2003). L'inclusion de la protéine A dans des architectures de type (PLL/PGA)_n, a montré que la protéine ne peut diffuser verticalement dans le film. Néanmoins les cellules peuvent interagir avec ces protéines. Ainsi des monocytes cultivés au contact de ces architectures produisent du TNF α en réponse à l'activation par la protéine A. L'adsorption de HSA montre que les protéines adsorbées peuvent diffuser latéralement. Leur coefficient de diffusion latérale est de l'ordre de 10^{-10} à 6×10^{-11} cm²/s en fonction du type de polyélectrolyte.

L'accessibilité des protéines peut être modulée en fonction du type de polyélectrolyte utilisé et l'interaction des cellules avec ces protéines peut être due à la dégradation de la multicouche. Ainsi Jessel *et al.*, ont montré que l'utilisation de l'énantiomère D de la poly(lysine), non dégradé par les cellules, permet de moduler l'activité des protéines enfouies en faisant varier leur accessibilité (Jessel et al., 2004). Mais la formation de

pseudopodes au travers du film a également été décrite comme modèle pour l'interaction cellulaire avec les protéines. Des enzymes telles que la glucose oxydase, la peroxydase, la glucose amylase ont été enfouies (Onda *et al.*, 1996). Ces enzymes conservent leur activité tant que leur substrat peut diffuser au sein de l'architecture. Leur non diffusion verticale permet d'élaborer des architectures complexes.

L'inclusion de médicaments est également possible. L'inclusion de molécules hydrophobes (piroxicam[®]) est possible en complexation avec des cyclodextrines (Benkirane-Jessel *et al.*, 2004). L'utilisation de liposomes pour former des bioréacteurs au sein de ces architectures présente également de nombreuses applications (Michel *et al.*, 2004, 2005).

L'enfouissement de peptides nécessite le greffage de ces derniers sur l'un des polyélectrolytes constitutants. Chluba *et al.*, ont ainsi greffé un peptide analogue de l' α -MSH sur de la PLL. Le polymère PLL α -MSH enfoui dans une architecture de type (PLL/PGA) conserve son activité. Son niveau d'enfouissement modifie le délai de réponse à court terme mais non celui à long terme. L'accessibilité du peptide aux cellules semble être liée à différents phénomènes, d'une part la formation de pseudopodes traversant l'architecture et d'autre part la diffusion du PLL α -MSH au sein du film présentant le peptide en surface. Néanmoins l'auteur présente des résultats similaires avec des multicouches de type (PSS/PAH)_n, dans lesquelles il n'existe aucun phénomène de diffusion. De telles architectures ont déjà été évaluées *in vivo* dans un modèle murin de trachée artificielle (Schultz *et al.*, 2005).

3.3.2 Fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes avec de l'ADN :

3.3.2.1 Utilisation d'ADN comme polyanion dans la construction de multicouches :

L'incorporation d'ADN, sous forme d'ADN génomique, d'oligonucléotides ou de plasmides, au sein de multicouches de polyélectrolytes a été étudiée par différentes équipes. Les applications sont en effet nombreuses, dans le cadre du diagnostic, de la création de biosenseurs et de la transfection (appliquée aux biomatériaux) (Boon *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2004). Structurellement l'ADN est un polyanion qui peut donc être inclus dans le processus de construction d'une multicouche. Ainsi des multicouches ont été réalisées avec de l'ADN en combinaison avec de la poly(lysine), de la poly(allylamine), du poly(éthylène imine), de la

poly(arginine), des poly(β aminoester), poly(4-vinylpyridine) et poly(di-allylmethylammonium chloride) (Luo *et al.*, 2001 ; Pei *et al.*, 2001 ; Sukhorukov *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 2005). Dans ce cadre ce sont essentiellement des interactions électrostatiques qui prédominent. Le mode de croissance est en général linéaire.

Ces architectures peuvent être utilisées comme substrat pour l'adhésion cellulaire. Elles ne présentent aucune toxicité ni aucune mutagénicité (Van den Beucken *et al.*, 2006). La structure de l'ADN peut être modifiée en fonction du polycation utilisé. Ainsi par spectroscopie infra rouge on a pu montré que l'ADN passe d'une conformation A à Z dans des structures contenant l'énantiomère D de la poly-lysine (PDL) et d'une conformation A à B dans des structures contenant du PAH. Néanmoins il n'est pas dénaturé. De plus Zhang *et al.* (2004), montrent que de l'ADN plasmidique présent dans une multicouche de type (PLL/ADN)_n, peut être transcrit, après libération et transfection à l'aide de lipides cationiques.

Le polycation qui entre dans la constitution de l'architecture influence sa structure. Des films contenant du PAH présentent une structure moins régulière que des films contenant PLL. Ces films présentent donc des rugosités de surface plus importantes. Ceci serait dû aux différences d'adsorption des ces polycations. Les différences d'adsorption influent également sur la quantité d'ADN adsorbé à la surface dans les premières couches. Au-delà peu de différences sont observées et environ 3 μ g d'ADN/cm² sont déposés par couche pour des films de type (PDL/ADN)_n et (PAH/ADN)_n (Van den Beucken *et al.*, 2006). De manière étonnante la même valeur a été retrouvée par une autre équipe dans le cadre de l'utilisation de poly(β aminoester) ($2,7 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Jewell *et al.*, 2005). Au cours de la construction d'un film, ce sont les mêmes processus d'interaction qui interviennent que lors de la formation de complexes en solution. Le PAH se complexe autour de l'ADN et les molécules de PAH constituent un pont entre les molécules d'ADN. Ainsi Gong *et al.* (2005) montrent par microscopie à force atomique que des surfaces se terminant par de l'ADN présentent de larges domaines parallèles constitués d'ADN alors que des surfaces constituées de PAH sont plus poreuses et se forment alors que les molécules de PAH emplissent les creux formés par l'ADN.

La stabilité de ces architectures varie en fonction du polycation utilisé. Ainsi des multicouches constituées de poly(β aminoester) s'auto-hydrolysent en condition physiologique entraînant une libération de l'ADN en une trentaine d'heures (Jewell *et al.*, 2005). Des films de type (PLL/ADN)_n libèrent également l'ADN en présence de PBS (Zhang *et al.*, 2004). Ce même type de film est sensible à l'alpha chymotrypsine. L'ADN libéré est

présent sous forme de complexes avec le polycation dégradé (Ren *et al.*, 2005). Des films constitués de PAH ou de PEI sont plus stables dans le temps. Néanmoins, la libération de l'ADN de structures de type $(PEI/ADN)_n$ peut être obtenue par utilisation de champs électriques (Yamauchi *et al.*, 2005).

L'interaction possible de deux oligonucléotides par des liaisons hydrogène entre paires de bases a été utilisée pour former des multicouches avec des oligonucléotides (Johnston *et al.*, 2005). Ces multicouches de polyA20G20 et polyT20C20, peuvent également être exploitées pour former des capsules. Ces multicouches, peu stables dans l'eau, sont par contre résistantes à des traitement à l'urée 6M. Le traitement à l'urée permet en outre d'augmenter la stabilité du film en permettant l'interaction de polynucléotides situés dans des couches très éloignées.

3.3.2.2 Utilisation des multicouches de polyélectrolytes dans le cadre de la transfection :

Les premières études que l'on peut citer dans ce domaine sont postérieures au début de ce travail de thèse. Deux types d'architecture ont montré une capacité de transfection.

Les travaux de Yamauchi *et al.* (2005) ont montré que des cellules cultivées sur des architectures de types (PEI/ADN plasmidique) peuvent être transfectées par électroporation, les films étant construit directement sur l'électrode. La viabilité cellulaire est de plus de 90 % et le taux de transfection obtenu sur des cellules de type HEK 293 est de 27%.

L'utilisation de polycation dégradable (poly(β aminoester)) a permis également de transfecter localement des cellules cultivées au contact de ces films. Le taux de transfection est de l'ordre de 18,7 % après 2 jours. Mais ce système présente le désavantage de libérer tout l'ADN contenu dans une période courte (30 heures). Dans ce cas, L'ADN est libéré dans le micro environnement cellulaire sous forme complexé avec le polycation. C'est ce qui semble favoriser la transfection (Lynn *et al.*, 2000). Les complexes se forment très rapidement au sein du film lorsque celui-ci est placé dans des conditions physiologiques (Jewell *et al.*, 2005). Il apparaît également que lors de la dégradation d'un film de type $(PLL/ADN)_n$ par de l'alpha chymotrypsine , l'ADN soit libéré sous forme de complexe avec PLL, cette complexation n'étant pas suffisante pour permettre la transfection (Ren *et al.*, 2005).

Notons qu'en 1994 Lvov *et al.* ont montré la possibilité d'incorporer des virus chargés de la famille des carnovirus dans une multicouche de type (PAH/PSS)_n. Même si ce travail n'a porté que sur l'étude physico-chimique de l'architecture, l'incorporation de virus pour la transduction de cellules comme celle d'adénovirus pourrait être utilisée dans le cadre de transfection médiée par multicouche.

Chapitre 2 Matériel et Méthodes :

1	Matériel :	66
1.1	Polyélectrolytes :	66
1.1.1	Polyélectrolytes utilisés pour la construction des multicouches :	66
1.1.2	Polyéthylèneimine utilisé comme vecteur de transfection :	67
1.1.3	Poly(acide glutamique) couplé :	68
1.1.3.1	PGA-mannose :	68
1.1.3.2	PGA-(10 %) NDP-MSH :	68
1.2	Plasmides :	69
1.3	Cellules :	71
2	Méthodes :	71
2.1	Méthodes de caractérisation des multicouches de polyélectrolyte :	71
2.1.1	Spectroscopie par guide d'onde optique :	71
2.1.1.1	Principe :	71
2.1.1.2	Dispositif expérimental :	72
2.1.1.3	Protocole expérimental :	73
2.1.1.4	Traitement du signal :	74
2.1.2	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier en mode totalement atténué (FTIR-ATR) :	74
2.1.3	Microscope à force atomique :	77
2.1.3.1	Principe :	77
2.1.3.2	Mode image :	78
2.1.3.3	Procédure en mode image :	78
2.1.4	Microscopie confocale :	79
2.2	Méthodes de caractérisation des complexes :	81
2.2.1	“Dynamic light scattering” :	81
2.2.1.1	Principe :	81
2.2.1.2	Déroulement d'une expérience :	83
2.2.2	Mesure de potentiel zeta (ζ) :	83
2.2.2.1	Principe :	83
2.2.2.2	Déroulement d'une expérience :	85
2.2.3	Electromobilité en gel d'agarose :	86
2.3	Construction des multicouches de polyelectrolytes :	87
2.3.1	Construction des multicouches : généralités :	87
2.3.2	Construction des multicouches fonctionnalisées avec des complexes (PEI/ADNp) :	87
2.3.2.1	Formation des complexes (PEI/ADNp) :	87
2.3.2.2	Fonctionnalisation des multicouches avec des complexes (PEI/ADNp) :	88
2.4	Protocoles de transfection :	88
2.4.1	Protocole de transfection en solution :	88
2.4.2	Protocole de transfection par multicouche :	89
2.4.3	Analyse du taux de transfection :	89
2.4.3.1	Par cytométrie en flux :	89
2.4.3.2	Par fluorimétrie :	91
2.4.3.3	Par mesure de l'activité de la luciférase :	91

2.5	Mesure de cytotoxicité	91
2.5.1	Mesure de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide :	91
2.5.2	Fragmentation de l'ADN :	92
2.6	Mesure de l'activité d'endocytose :	93
2.6.1	Mesure de l'activité d'endocytose de cellules eucaryotes par dosage de la HRP :	93
2.6.2	Mesure de l'efficacité de transfection en présence d'inhibiteurs de l'endocytose :	94
2.7	Dosage de la mélanine intra cellulaire :	95

1 Matériel :

1.1 Polyélectrolytes :

1.1.1 Polyélectrolytes utilisés pour la construction des multicouches :

Les polyélectrolytes sont préparés en solution aqueuse de 0,15 M NaCl et 20 mM Hepes, préparée à partir d'eau ultra-pure (18.2 MΩ de résistivité) délivrée par un système Milli-Q-plus (Millipore), à une concentration de 1 mg/mL sauf indication contraire. Le pH est ajusté avec des solutions d'acide chlorhydrique et de soude. Plusieurs types de polyanions et polycations ont été utilisés. Leurs caractéristiques sont données respectivement dans les tableaux 2-1 et 2-2.

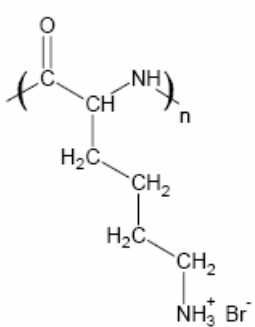
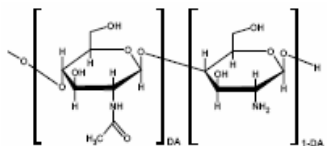
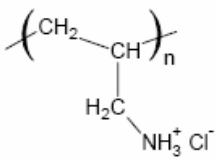
Nom du polyélectrolyte	Notation	Nature	pKa	Formule développée	Fournisseur	Poids moléculaire 10^3 g/mole
Poly(l-lysine)	PLL	Polypeptide synthétique dégradable	10.5 (Kyte, 1995)		Sigma	30
Chitosan	CHI	Polysaccharide naturel dégradable	6.5-7.4 (Denuziere et al., 1996)		FMC Biopolymer	100
Poly(allylamine) hydrochloride	PAH	Synthétique dégradable	9 (Mendelsohn et al., 2003)		Aldrich	50

Table 2-1 : Polycations utilisés

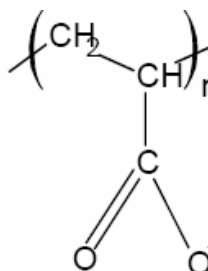
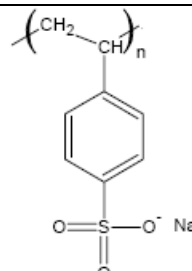
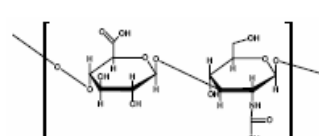
Nom du polyélectrolyte	Notation	Nature	pKa	Formule développée	Fournisseur	Poids moléculaire 10^3 g/mole
Poly(acide l-glutamique)	PGA	Polypeptide synthétique dégradable	4.3 (Kyte, 1995)		Sigma	54
Poly(4-styrène sulfonate)	PSS	Synthétique non dégradable	2 (Ahrens et al., 2000).		Aldrich	70
Acide Hyaluronique	HA	Polysaccharide naturel dégradable	2.9 (Lapcık et al., 1998)		Bioiberica	400

Tableau 2-2 : Polyanions utilisés

1.1.2 Polyéthylènimine utilisé comme vecteur de transfection.

Le PEI 22 kDa a été gracieusement fourni par le Dr Benoît Frisch. Il a été synthétisé selon le protocole décrit par O. Boussif (1996).

1.1.3 Poly(acide glutamique) couplé :

1.1.3.1 PGA-mannose :

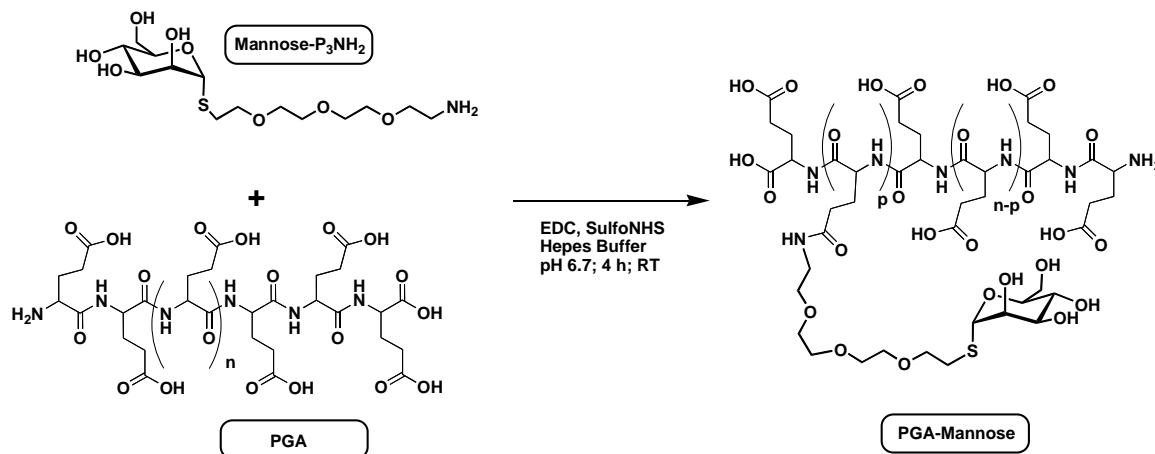


Figure 2-1 : Couplage du α -mannose-P₃NH₂ sur le PGA, le taux de greffage est de 10%

La synthèse du PGA-mannose a été réalisée dans le laboratoire du Dr Benoit Frisch :

30 mg (soit 0.19867 mmol de fonction acide carboxylique) de PGA, 2mg (soit 0.00993 mmol) de 177 mg (soit 0.089 mmol) de sel de sodium de N-hydroxysulfo succinimide (sulfo NHS) et 4.6 mg (soit 0.02384 mmol) de 1-Ethyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide (EDC) sont mélangés dans du tampon Hepes (0.02 M, pH=6.7, 1mL). Le mélange est agité pendant 5 min, puis sont ajoutés 7.4 mg de mannose-PEG amine primaire (soit 0.01986 mmol). Le taux de greffage visé est de 10%. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation, à température ambiante pendant 4 heures. Le mélange obtenu est dialysé deux fois pendant 12 heures contre 1 litre de solution de NaCl à 0.145M, puis il est dialysé deux fois pendant 12 heures contre 1 litre d'eau Milli-Q (membrane cut-off 10 000). Le produit est ensuite séché au lyophilisateur pendant une nuit, le degré de substitution a été déterminé par ¹HMRN, en comparant l'intégrale du pic à 5.38 ppm (H_{H α -mannose}) avec celui situé à 4.32-4.42 ppm (CH de l'acide glutamique). Le degré de substitution a été déterminé comme étant de 10%, le rendement de la réaction est de 60%.

1.1.3.2 PGA-(10 %) NDP-MSH :

Le couplage de NDP-MSH a été réalisé, par le Dr B. Frisch, en deux étapes dont nous exposons brièvement le protocole.

Synthèse du PGA (20 %) maléimide :

60 mg de PGA sont dissouts dans 3 ml de tampon Hepes 10 mM (pH = 6,7) avec 20 mg d'EDC et 3 mg de sulfo-NHS sous agitation magnétique et azote. 24 mg de NH₂EtMal sont alors ajoutés et la réaction est conservée sous agitation à température ambiante pendant 17 heures. Après élimination des coproduits par dialyse (membrane cut off 10 000) contre 2 X 2 L d'eau, le solvant est éliminé par lyophilisation.

Synthèse du PGA-NDP MSH (10 %) :

Le peptide, NDP MSH (HS-CH₂-CH₂-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-COOH), a été synthétisé par Neosystème. 5 mg de PGA-maléimide sont mélangés avec 5 mg de NDP MSH dans 1,5 ml de tampon Hepes 10 mM (pH = 7,4) à température ambiante sous agitation magnétique. Les groupements maléimide n'ayant pas réagi ont été neutralisés avec un excès d'acide mercaptopropionique. La solution a été dialysée (cut off 10 000) contre de l'eau (2 X 2 L) pendant une nuit puis lyophilisée.

1.2 Plasmides :

Deux plasmides ont été utilisés au cours de l'ensemble des expérimentations décrites dans ce travail : pEGFP-C1 et pIV1066. Ces deux plasmides ont été utilisés sans autre modification, ils ne contiennent qu'un gène rapporteur.

pEGFP-C1 est un plasmide commercial provenant de chez Clontech[®]. Il comporte un gène rapporteur exprimant l'“Enhanced Green Fluorescent Protein” (EGFP), un mutant de la “Green Fluorescent Protein” (GFP). Ce gène est sous promoteur CMV. Il présente une cassette de résistance à la kanamycine pour l'expression en système procaryote (figure 2-2). Le plasmide a été amplifié dans une souche d'*Escherichia coli* de type DH5 α puis purifié en utilisant un kit “endofree plasmid maxi kit” de Qiagen en suivant le protocole délivré par le fournisseur.

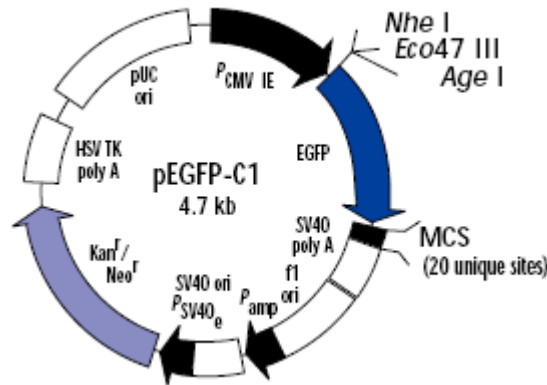


Figure 2-2 : Carte du plasmide pEGFP-C1

Le plasmide pIV1066 est un don du Dr Catherine Schuster. Il comporte un gène rapporteur exprimant la “firely luciférase” (LacZ) sous promoteur de CMV. Il possède une cassette de résistance à l’ampicilline pour l’expression en système procaryote (figure 2-3). Il a été amplifié dans une souche d’*E.coli* de type JM109 puis purifié en utilisant le kit “endofree plasmid maxi kit” de chez Qiagen.

La pureté des échantillons a été évaluée par spectrométrie en calculant le rapport d’absorbance à 260/280 ainsi que par électrophorèse en gel d’agarose à 1% après linéarisation du plasmide permettant de vérifier le poids moléculaire de ce dernier.

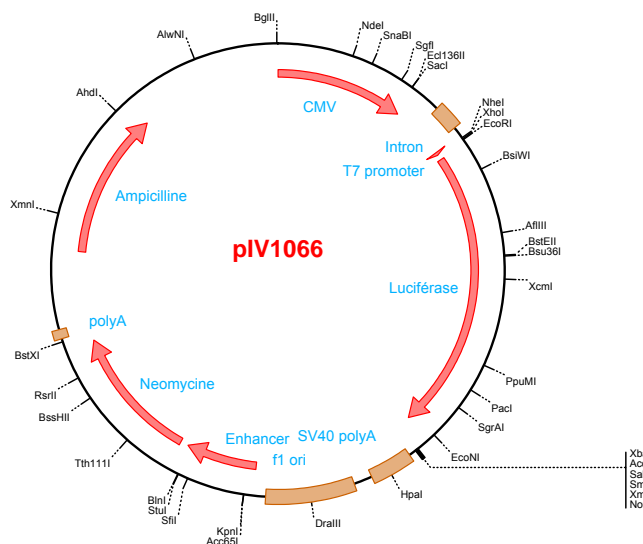


Figure 2-3 : Carte du plasmide pIV1066

1.3 Cellules :

Les cellules NIH/3T3 (ATCC CCL 92), cellules de souris de type fibroblastique, ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal (FCS), 2 mM L- glutamine et 50 µg/ml gentamicine.

Les cellules Huh-7, cellules hépatiques de carcinome humain, ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 10% de FCS, 50 µg/ml gentamicine, 0.1 mM acides aminées non essentiels, 2 mM L-glutamine et 1 mM sodium pyruvate.

Les cellules B16-F1 (ECACC 92101203), cellules de souris de type mélanocytaire, ont été cultivées dans un milieu « minimum essential medium » (MEM) additionné de sels de Earle contenant 10% de FCS, 50 µg/ml gentamicine , 0.1 mM d'acides aminés non essentiels, 2 mM L-glutamine et 1 % de vitamines..

Les cellules Thp1 (ECACC 88081201), cellules humaines de type pre-monocytaire, ont été cultivées dans un milieu Roswell Parc Memorial Institute (RPMI 1640) contenant 10 % de FCS et 50 µg/ml de gentamicine.

Les cellules CHO (ECACC 85050302), cellules d'ovaire de Hamster, ont été cultivées dans un milieu Ham's F12 + 2mM Glutamine + 10% FCS + 50 µg/ml de gentamicine.

2 Méthodes :

2.1 Méthodes de caractérisation des multicouches de polyélectrolyte :

2.1.1 Spectroscopie par guide d'onde optique :

2.1.1.1 Principe

La spectroscopie optique par guide d'onde ou OWLS, "Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy", est une technique optique permettant d'étudier in situ l'adsorption de macromolécules sur un substrat (Tiefenthaler et Lukosz 1989). La technique utilise les

propriétés de réflexion de la lumière à l'interface guide/couche adsorbée pour déterminer l'épaisseur et l'indice de réfraction de cette couche. Un faisceau laser est dirigé sur le guide d'onde (généralement en oxyde métallique transparent de ~ 200 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction supérieur à 1.7) sur lequel est gravé un réseau de diffraction. Pour un angle donné, appelé angle de couplage, le faisceau laser reste confiné au sein du guide d'onde par réflexion totale interne et se propage dans le guide (dans la direction x) jusqu'aux photodiodes disposées aux extrémités latérales du guide d'onde (Vorös et al., 2002).

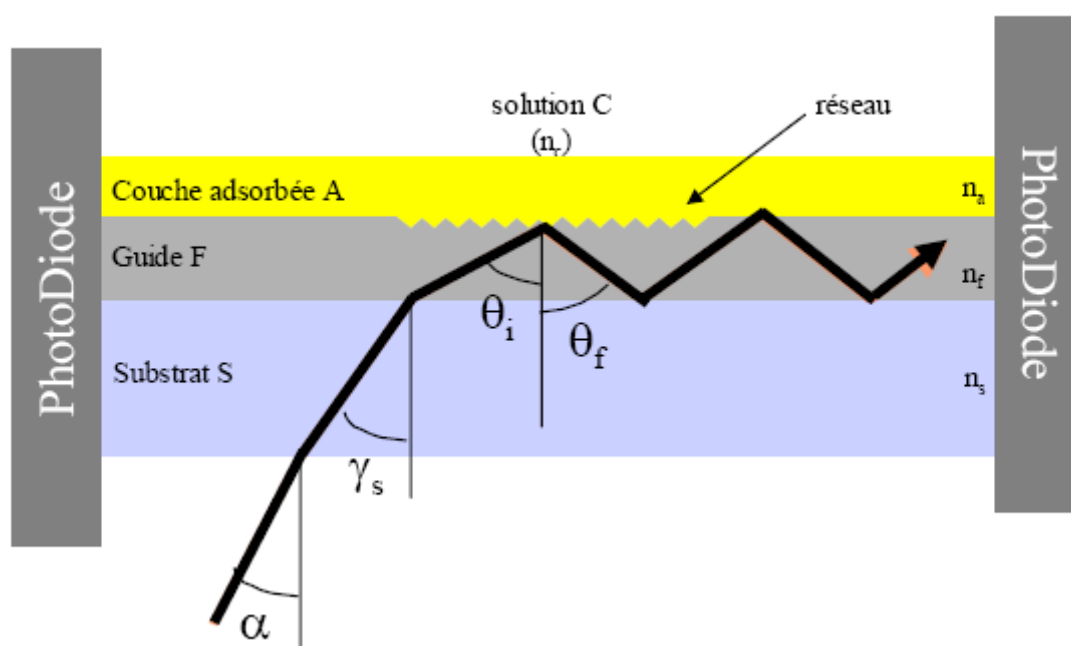


Figure 2-4 : Schéma du principe de la spectroscopie par guide d'onde optique

2.1.1.2 Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental, installé au sein de l'unité par le Dr Frédéric Cuisinier, est schématisé sur la figure 2-5. Un laser Hélium-Néon de 5 mW (Melles-Griot), de longueur d'onde 632.8 nm, est réfléchi par un miroir sur un guide d'onde en $\text{Si}_0.8\text{Ti}_{0.2}\text{O}_2$ (Micro Vacuum Ltd) mono-mode ($m=0$) permettant uniquement une réflexion du premier ordre ($l=1$). Le guide est monté dans une cellule de mesure, deux photodiodes (Hamamatsu) sont disposées à chaque extrémité du guide. Un ordinateur pilote le déplacement d'un moteur (M-UTM Newport) permettant la rotation du guide sur une plage angulaire de -8° à $+8^\circ$ avec une précision angulaire de $3 \cdot 10^{-4}$ degré. La résolution en indice de réfraction effective (Δn) est alors de 10^{-5} . Les guides d'onde ASI 2400 (MicroVacuum Ltd) sont en $\text{Si}_0.8\text{Ti}_{0.2}\text{O}_2$, ils sont déposés sur un substrat en silice pure.

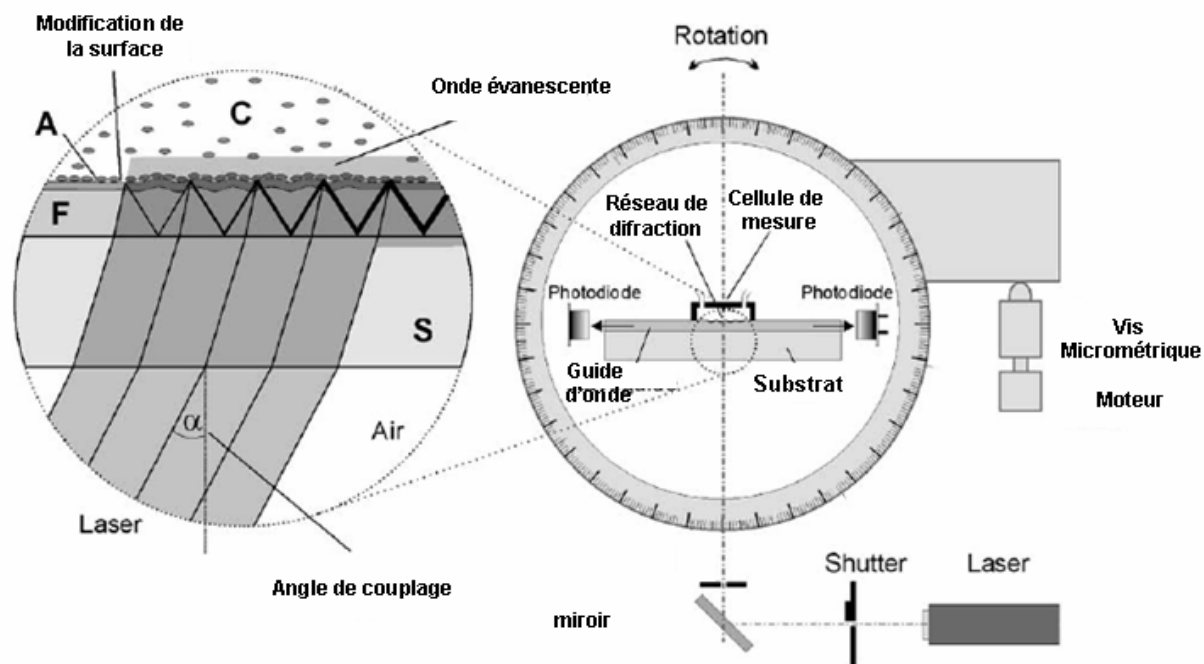


Figure 2-5 : Schéma de principe du spectroscopie par guide d'onde comprenant un laser polarisé, un guide d'onde et deux photodiodes qui mesurent les intensités de couplage et un moteur qui permet d'effectuer un balayage d'angulaire (schéma repris de (Vörös et al., 2002))

Lorsque les conditions de couplage sont vérifiées, le faisceau diffracté par le réseau se propage jusqu'aux photodiodes où l'intensité est mesurée. Deux angles de couplage sont ainsi obtenus pour chaque photodiode. Le temps d'acquisition d'un point étant d'environ 1min 30s, il est ainsi possible de suivre la construction du film multicouche.

2.1.1.3 Protocole expérimental :

Les solutions sont préalablement dégazées pendant 30 minutes. Cette opération est nécessaire pour éviter la formation de bulles d'air dans le montage. L'indice de réfraction de la solution tampon (n_c) est mesuré dans les conditions expérimentales avec un réfractomètre RFM 340 (Bellingham-Stanley). Après réglage du laser pour avoir des pics symétriques et d'intensité maximale, la cellule de mesure est mise à l'équilibration pendant 30 min. Les guides d'ondes utilisés étant chargés négativement, la construction du film débute par l'injection de la solution de polycations ($100\mu\text{L}$) dans la cellule de mesure ($37\mu\text{L}$). L'ensemble est laissé au repos durant 10 min. Après le dépôt de la couche de polycations, la cellule est rincée sous flux (10mL/h) pendant 10 min avec la solution de rinçage. Les étapes d'injection et de rinçage des différents polyélectrolytes sont ensuite répétées selon le même

schéma avec une alternance entre les polyélectrolytes chargés négativement et positivement. La construction de la multicouche est ainsi suivie in situ.

2.1.1.4 Traitement du signal :

Les indices effectifs (NTE et NTM) sont mesurés en fonction du temps. Avant le calcul de l'indice de réfraction du film (nA) et de son épaisseur (dA), il faut auparavant caractériser les propriétés optiques du guide d'onde : indice de réfraction (nF) et épaisseur (dF).

Un programme de résolution numérique des équations a été développé au sein du laboratoire. L'ensemble des équations nécessaires au traitement du signal a été décrit par Picart et al. (Picart, Gergely et al. 2004). Pour l'analyse numérique, le film multicouche de polyélectrolytes est défini comme un film homogène et uniforme.

A partir des grandeurs nA et dA, une formule approchée donnant la masse adsorbée (qA) a été proposée par DeFeyter et al. (De Feijter, Benjamins et al. 1978): où dn/dc (en mL/g) est la variation d'indice de réfraction par rapport à la variation de concentration en polyélectrolyte dans le film avec :

$dn/dc = 0.197 \text{ mL/g}$ pour les polyélectrolytes (Huglin 1972)

$dn/dc = 0.18 \text{ mL/g}$ pour les protéines (Huglin 1972)

La précision de l'appareil (10^{-5} sur les indices effectifs) limite l'épaisseur maximale réellement mesurable à environ 400 nm d'épaisseur pour les films d'indice 1.5 (Picart, Gergely et al., 2004).

2.1.2 Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier en mode totalement atténué (FTIR-ATR) :

L'adsorption des complexes de PEI/ADN et leur enfouissement dans un film de polyélectrolytes a été suivie par ATR-FTIR (Equinox 55 FTIR spectrometer (Brucker, Germany). Nous avons utilisé une cellule en mode réflexion totale atténuée avec le détecteur MCT refroidi à l'azote liquide.

La spectroscopie infrarouge est basée sur des mesures de transitions vibrationnelles entre un état énergétique fondamentale et excité d'une molécule. L'énergie totale d'une molécule est la résultante de la contribution de l'énergie électronique, l'énergie de vibration, l'énergie de rotation et l'énergie de translation. Les changements d'énergie de vibration sont

dus à des radiations dans le domaine spectral de l'infrarouge moyen (400-4000 cm^{-1}). L'absorption ou l'émission d'un rayonnement infrarouge par une molécule conduit à une variation de l'énergie vibrationnelle. Ainsi, le spectre d'un composé obtenu par des méthodes de spectroscopies vibrationnelles (infrarouge, Raman) lui est propre et joue le rôle d'une véritable empreinte chimique. Parallèlement, certains groupements chimiques présentent des bandes vibrationnelles qui apparaissent toujours aux mêmes fréquences, quelle que soit la molécule qui porte ces groupements. Par exemple, le groupement méthylène $-\text{CH}_2-$ produit toujours une bande intense vers 2850 cm^{-1} , que ce groupement appartienne à des lipides ou des protéines. Les fréquences de vibration d'autres groupements peuvent varier à cause des interactions intra ou inter moléculaires. Parmi les effets intermoléculaires, la liaison hydrogène est un des facteurs les plus importants qui affecte les fréquences des groupements. Cette propriété est très importante en infrarouge et permet l'étude de la structure secondaire de protéines ou de polypeptides par spectroscopie infrarouge. En général, l'ADN présente des bandes caractéristiques des nucléotides que le compose *i.e* à 1602 cm^{-1} (adenine), 1650 cm^{-1} (thymine), 1684 cm^{-1} (guanine) et 1481 cm^{-1} (cytosine) ainsi qu'une bande caractéristique des groupements phosphate à 1223 cm^{-1} .

Pour cette analyse, les films de polyélectrolytes ont été construits sur un cristal de ZnSe de forme trapézoïdale. Grâce à un montage optique constitué de plusieurs miroirs, le faisceau infrarouge est dirigé vers l'une des faces du cristal de ZnSe. Ce faisceau incident arrive au niveau de l'interface cristal d'ATR (milieu 1) et le film déposé au-dessus du cristal (milieu 2) Dans le cas où l'angle du faisceau incident α est supérieur à l'angle critique α_c , alors il y a réflexion totale du faisceau incident au sein du cristal. L'intensité du faisceau sortant est alors mesurée par un détecteur de type MCT (mercury cadmium telluride) refroidi à la température de l'azote liquide (figure 2-6).

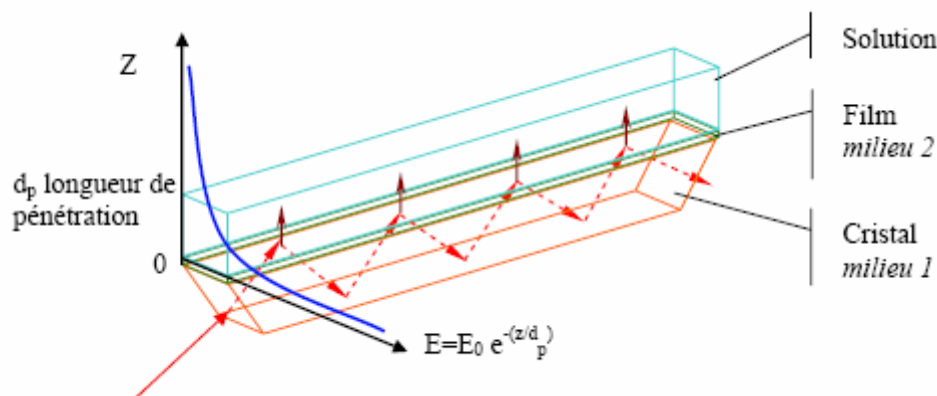


Figure 2- 6 : Faisceau infrarouge traversant un cristal trapézoïdal d'ATR. Le faisceau entre sous incidence normale par rapport à l'une des arêtes du cristal (l'arête du trapèze fait un angle $\alpha = 45^\circ$ avec la base du cristal) et atteint l'interface entre le milieu 1 et le milieu 2. Le faisceau crée une onde évanescente dans le milieu 2 au-dessus du cristal d'ATR pourvu que la condition de réflexion totale soit satisfaite. Le faisceau est ainsi réfléchi plusieurs fois avant de ressortir par l'autre face du prisme. L'intensité du faisceau sortant est alors mesurée par un détecteur de type MCT (mercury cadmium telluride) refroidi à la température de l'azote liquide. La courbe bleue représente l'évolution de l'intensité du champ électrique de l'onde évanescente par rapport à la distance à l'interface entre les milieux 1 et 2.

La cellule se compose d'une chambre thermostatée, composée de deux parties en inox, d'un cristal de ZnSe et d'un joint qui permet d'avoir un volume de 110 μL dans la cellule. Les tuyaux en Tygon[®] du montage, le joint, ainsi que la chambre sont nettoyés avec du Hellmanex puis rincés à l'eau. Le cristal de ZnSe est lavé avec du Hellmanex, du méthanol et ensuite rincé à l'eau Milli-Q. Les films multicouches contenant des complexes ont été construits *in situ* dans la cellule de mesure par adsorption successive sur un cristal de ZnSe. Les solutions de polyélectrolyte ont été injectées sous flux en circuit fermé avec un débit de 0.25 mL/min. A la fin de chaque étape d'adsorption, la cellule a été vidée et rincée par la solution tampon. Ceci correspond à une durée de rinçage d'environ 10 min. La multicouche a été construite en alternant l'adsorption du polyanion et du polycation. Un spectre issu de l'accumulation de 512 interférogrammes a été acquis après chaque étape d'adsorption et de rinçage avec une résolution de 2 cm^{-1} . Pour obtenir le spectre d'une couche n d'un film multicouche, le spectre de l'architecture (polyanion/polycation)_{n-1} est soustrait au spectre de l'architecture (polyanion/polycation)_n.

2.1.3 Microscope à force atomique :

La microscopie à force atomique (AFM “Atomic Force Microscopy”) est une microscopie à champ proche. Ce type de microscope a été développé dans les années 80 avec le microscope à effet tunnel (Binnig et al., 1982). L’AFM est une variante destinée à observer la topographie des surfaces non-conductrices (Binnig et al., 1986). Le principe consiste à balayer la surface de l’échantillon avec une pointe et à détecter les interactions entre cette pointe et la surface. L’AFM est ainsi utilisée pour imager les surfaces de différents matériaux, notamment les biomatériaux, avec une résolution latérale de l’ordre d’une dizaine de nanomètres et une résolution en z de l’ordre de l’Angström. Les évolutions des techniques AFM permettent d’établir des cartographie de diverses propriétés : mécaniques (Burnham et al., 1990), électrostatiques et magnétiques (Martin et al., 1988).

2.1.3.1 Principe

La technique consiste à balayer la surface de l’échantillon avec une sonde fixée à l’extrémité d’un levier à constante de raideur connue, l’ensemble formant le cantilever. L’échantillon est fixé sur un tube piezoélectrique 3D, ce qui permet un mouvement de l’échantillon dans les trois dimensions. Lors du balayage, les interactions de la sonde avec la surface génèrent la déflexion du cantilever. Pour mesurer la déflexion, un faisceau laser est focalisé sur l’extrémité du cantilever (zone réfléchissante) et est réfléchi sur une photodiode à quatre cadrans. La différence de potentiel entre les différents quadrants indique avec précision la déflexion du cantilever. Cette méthode de mesure de la déflexion présente l’avantage de ne détecter que les variations angulaires du cantilever. En revanche, ce type de mesure est sensible à la dérive thermique et nécessite un temps d’attente avant l’obtention d’un signal stable. La déflexion est reliée à la force (F) exercée sur la pointe par la loi de Hooke

$$F = -k_c \delta d$$

Où k_c représente la constante de raideur du cantilever et δd la déflexion du cantilever.

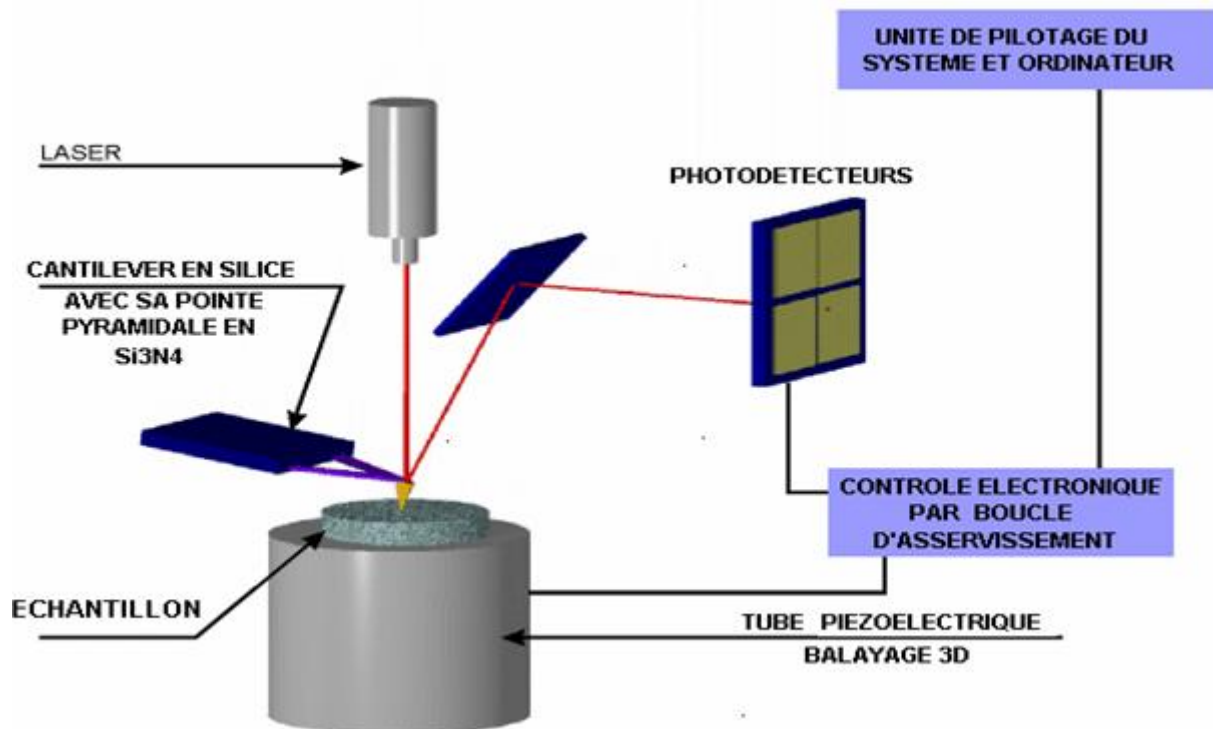


Figure2-7 : Schéma d'un microscope à force atomique. L'échantillon est fixé sur le tube piézo-électrique. La pointe du cantilever est approchée de la surface. Les interactions entre la pointe et la surface génèrent une déflexion du cantilever qui est mesurée optiquement. Un faisceau laser est réfléchi par l'extrémité de la pointe sur une photodiode. Le voltage mesure par la photodiode indique la déflexion du cantilever.

2.1.3.2 Mode image :

L'image en AFM est obtenue par la mesure de la déflexion du cantilever en chaque point (XY) de la surface, alors que la distance du tube piezoélectrique par rapport à celle-ci reste constante. Le mode image a été initialement développé pour observer la topographie de l'échantillon. Lors du balayage de la surface, les propriétés physico-chimiques de celle-ci modifient la déflexion de la pointe. Différentes procédures ont été développées afin de cartographier et de quantifier ces propriétés comme le module d'Young (Radmacher et al., 1996)

2.1.3.3 Procédure en mode image

Les images topographiques sont effectuées sur un instrument de type Nanoscope IV (Veeco) avec des pointes pyramidales ($\alpha = 35^\circ$) montées sur des cantilevers triangulaires de constantes de raideur comprises entre 50 et 200 pN/nm (MLCT-AUHW, Veeco). Les

observations des films sont effectuées en phase sèche. Les échantillons sont séchés en dessiccateur à cristaux après avoir été retirés du milieu.

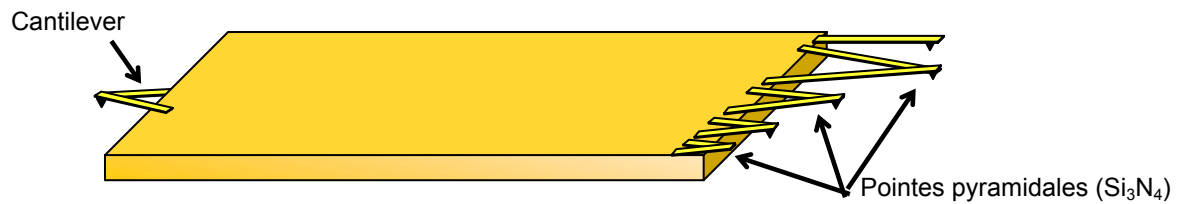


Figure 2-8 : Représentation schématique d'un cantilever utilisé en AFM

2.1.4 Microscopie confocale

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger une lumière ponctuelle, généralement obtenue à partir d'un laser, sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage (pinhole) (Figure 2-7) est placé en amont du détecteur, il ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal. L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal /bruit. Le balayage de l'échantillon en XY par le laser fournit une image du plan focal. Ce balayage est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage en Z, l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux et ainsi reconstituer une structure en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respective de $0.15 \mu\text{m}$ et $0.58 \mu\text{m}$ pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1.4 et l'utilisation d'une longueur d'onde de 500 nm (Stelzer and Lindek, 1994). Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des films multicouches épais (micrométriques) en milieux aqueux.

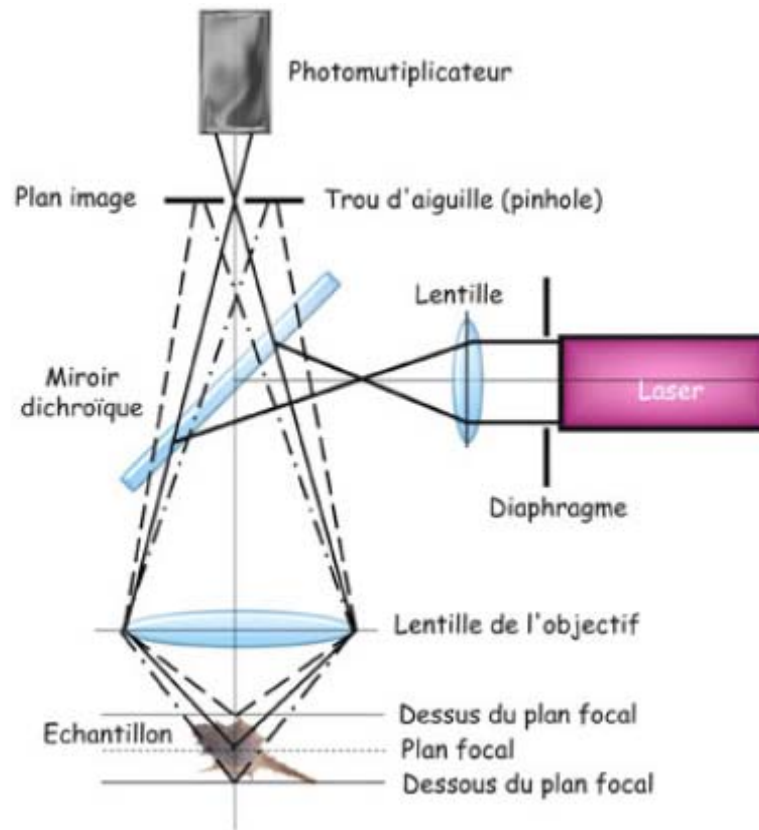


Figure 2-9 : Schéma de principe d'un microscope confocal en épi-fluorescence. La source laser est condensée par l'intermédiaire du miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif.

Le microscope confocal utilisé est de type LSM510 (Zeiss), monté sur un microscope AxioVert100M (Zeiss) associé à des lasers HeNe et Ar. Pour les visualiser, les films sont marqués à l'aide de fluorophores couplés aux polyélectrolytes, généralement à l'aide de fluorescéine isothiocyanate (FITC adsorption/émission 488nm/520nm). Les polyélectrolytes marqués utilisés sont la Poly(L-Lysine)-FITC (PLL-FITC, Sigma), le Chitosan-FITC ce composé étant préparé par X. Shu du groupe de G. Prestwich (University of Utah). Sur les films multicouches dont l'un au moins des polyélectrolytes diffuse, le dépôt d'un polyélectrolyte marqué qui diffuse à travers l'ensemble de la construction permet de visualiser l'intégralité du film. Pour obtenir un marquage complet du film, le polyélectrolyte est déposé en couche terminale pendant une durée minimale de 15 min pour la PLL-FITC (0.1 mg/mL). Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible de co-marquer les films multicouches à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes. Il est également possible d'observer le comportement cellulaire sur un film multicouche par un marquage distinct du film et des cellules.

2.2 Méthodes de caractérisation des complexes :

2.2.1 “Dynamic light scattering”:

2.2.1.1 Principe :

La DLS est une méthode importante pour la caractérisation de la granulométrie de systèmes colloïdaux (Allen). Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule). La fréquence et l’amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant : à une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relative importante. De même, plus la valeur de la viscosité du solvant est faible (température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée. Il est donc important de maîtriser la viscosité et donc la température du milieu. Le déplacement des particules sous l’effet de fluctuations de concentrations est caractérisé par le coefficient de diffusion de translation (D_T) qui, d’après la loi de Stokes-Einstein, est lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule :

$$d_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta_0 D_T}$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température, η_0 la viscosité du solvant, D_T le coefficient de diffusion et d_h le diamètre hydrodynamique de la particule considérée.

Le montage optique est constitué d’une source laser monochromatique (laser HeNe, longueur d’onde $\lambda=632.8$ nm), d’une cellule de mesure et d’un photomultiplicateur (choisi pour la mesure d’intensités diffusées très faibles générées par des particules de très petites tailles). Le laser est équipé d’un filtre spatial et d’une optique de focalisation du faisceau au milieu de la cellule. En général, le photomultiplicateur (PM) est placé sur un goniomètre afin d’obtenir un angle d’incidence variable. Cependant, dans nos expériences, nous travaillons à angle fixe, le détecteur étant immobilisé dans une direction faisant 90° avec la direction de l’onde incidente. Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations de

la lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'auto-corrélation du signal. Cette fonction représente la probabilité de retrouver une particule à un instant $t+\tau$ au même point de l'espace où elle se trouvait à l'instant t : plus une particule est petite et plus cette probabilité est faible, plus une particule possède un grand diamètre et plus cette probabilité est forte. Cette fonction d'auto-corrélation (G) est une exponentielle décroissante du temps dans le cas d'une distribution monomodale de particules. Sa forme est beaucoup plus complexe dans le cas d'une distribution de particules de tailles différentes. On ajuste alors différents modèles mathématiques à la fonction d'auto-corrélation issue de la mesure. Le résultat de ce traitement mathématique permet de donner une bonne approximation de la répartition granulométrique de l'échantillon si celui-ci n'est pas exagérément polydispersé. Cependant l'analyse devient très difficile, voire impossible si l'échantillon contient une distribution de très grandes (plusieurs micromètres) et de très petites particules (quelques nanomètres) colloïdales. En effet, les grandes particules, même présentes en faible concentration, contribuent de façon majoritaire à l'intensité diffusée et peuvent de ce fait occulter la contribution des petites particules, pourtant majoritaires, à l'intensité totale diffusée. Pour la plupart de nos expériences, nous avons adopté le mode d'analyse monomodal qui consiste à décrire la décroissance de la fonction d'autocorrélation comme s'il n'existait qu'une sorte de particules sphériques et à inclure le faible écart à la décroissance exponentielle parfaite dans un coefficient de polydispersité (analyse des cumulants) :

$$\text{Log}(G) = a + b\tau + c\tau^2 + d\tau^3 + \dots$$

où b représente la taille moyenne des particules, et $2c/b^2$ la variance de la distribution ou polydispersité.

La méthode des cumulants (Koppel et al., 1972) offre des résultats intéressants pour une distribution monomodale étroite, définie par le diamètre moyen des particules et leur polydispersité.

2.2.1.2 Déroulement d'une expérience :

Dans ce travail, nous avons utilisé un dispositif commercial, le Zetasizer 3000 HS (Malvern Instrument, Ltd, UK) qui permet de mesurer la taille des complexes mais également leur potentiel zêta. Ce dernier mode de mesure sera décrit ultérieurement.

Après la préparation des complexes, la solution est prélevée et introduite dans une cuve jetable en polystyrène dont les quatre faces sont polies. La solution est introduite de manière à remplir suffisamment la cuve (environ 2 mL) afin que le faisceau laser monochromatique traverse le coeur de la solution.

La cuve est insérée dans l'appareil et les mesures peuvent être menées. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de 5 mesures sur un échantillon donné.

2.2.2 Mesure de potentiel zeta (ζ) :

2.2.2.1 Principe :

La mesure du potentiel zêta des particules colloïdales est basée sur la mesure de leur mobilité électrophorétique. En effet, quand un champ électrique est appliqué à une solution d'électrolyte, les particules chargées en suspension dans cet électrolyte sont attirées vers l'électrode de charge opposée. La force de frottement visqueux subie par les particules tend à s'opposer à ce mouvement. Quand l'équilibre entre ces deux forces de sens opposé est atteint, les particules se déplacent avec une vitesse limite. La valeur de cette vitesse dépend de l'intensité du champ électrique, de la constante diélectrique du milieu, de sa viscosité et du potentiel zêta de la particule. On définit la mobilité électrophorétique d'une particule par le rapport entre sa vitesse limite V et la valeur de l'intensité du champ électrique appliqué :

$$U_e = \frac{V}{E}$$

La valeur du potentiel zêta est calculée à partir de celle de la mobilité électrophorétique par application de la loi de Henry :

$$U_e = \frac{\varepsilon \zeta}{6\pi\eta} f(\kappa a)$$

avec ϵ la constante diélectrique du milieu, η sa viscosité, ζ le potentiel zêta et U_e la mobilité électrophorétique. Le facteur Ka est égal au produit de l'inverse de la longueur de Debye-Hückel K^{-1} et du rayon a de la particule. L'épaisseur de la zone de solution influencée par les charges fixes de la surface dépend fortement de la concentration et de la charge des ions de l'électrolyte. Plus la charge et la concentration sont élevées, plus la couche diffuse est comprimée.

Afin d'éviter l'électrolyse de la solution, le champ appliqué doit être alternatif. Lors de l'application du champ électrique, la particule se déplace vers l'électrode de charge opposée. Dans la demi période suivante, lorsque le champ s'oppose, la particule change le sens de son déplacement. La particule effectue donc un mouvement de va et vient alternatif avec une certaine fréquence U_p . Cette fréquence est reliée à la vitesse de la particule et à la fréquence du champ alternatif appliqué. La valeur de U_p est mesurée par effet Doppler. En effet, deux faisceaux laser monochromatiques éclairent la particule et la vitesse de la particule est mesurée dans le volume d'intersection de ces deux faisceaux. Le croisement des faisceaux laser donne naissance à une figure d'interférence. En modifiant le trajet optique d'un des deux faisceaux laser, à l'aide d'un miroir monté sur un oscillateur piézoélectrique haute fréquence, la figure d'interférence générée peut être déplacée, de manière parfaitement contrôlée, autorisant ainsi la mesure des faibles mobilités. Les particules à mobilité nulle ou très faible sont caractérisées lors de la détection par une fréquence identique à celle de l'oscillateur piézoélectrique, et présentent par conséquent une variation de fréquence nulle. Les particules en mouvement dans la grille interférentielle vont diffuser la lumière à une fréquence U_p en fonction de leur vitesse. La lumière diffusée est captée par un photomultiplicateur qui génère une impulsion pour chaque photon détecté. Le signal obtenu est traité par un corrélateur numérique qui collecte et fait la moyenne du nombre de photons détectés par unité de temps. Ce traitement permet d'établir la fonction d'autocorrélation comme pour les expériences de diffusion de la lumière. Le traitement de cette fonction d'autocorrélation nous permet alors d'établir l'intensité relative diffusée en fonction de U_p . La variation de fréquence $\Delta\varphi = U_p - U_0$ observée permet de remonter à la vitesse grâce à la relation :

$$V = S\Delta\varphi$$

Dans cette relation, V est la vitesse de la particule, S l'espacement des franges dans la région de croisement des faisceaux laser et $\Delta\varphi$ la variation de fréquence (Hz). La valeur de l'interfrange est donnée par

$$S = \frac{\lambda}{2} \sin \frac{\theta}{2}$$

avec λ longueur d'onde du faisceau laser, et θ l'angle de diffusion. Par cette expérience on obtient donc la distribution de l'intensité diffusée en fonction du potentiel zêta des particules.

2.2.2.2 Déroulement d'une expérience :

Avant toute mesure du potentiel zêta il est indispensable de calibrer l'appareil. Cette précaution est indispensable car les parois de la cellule en quartz sont chargées négativement. De ce fait la surface de la cellule accumule des contre-ions. Lors de l'application du champ électrique, ces contre-ions se mettent en mouvement ce qui entraîne un déplacement du fluide : c'est le phénomène de mobilité électro-osmotique. Ce déplacement du fluide va également entraîner un déplacement des particules à étudier. Ainsi, la mobilité totale de la particule est égale à la somme de la mobilité électro-osmotique et de la mobilité électrophorétique. Dans le dispositif expérimental utilisé, la contribution de la mobilité électro-osmotique est éliminée parce que la mesure est effectuée dans un plan de la cellule (de géométrie rectangulaire) sur lequel la vitesse moyenne du fluide est nulle. Ce plan, appelé plan stationnaire, existe parce que la cellule de mesure est un système fermé : la solution de particules y est injectée par l'ouverture d'une électrovanne. Cette dernière est en position fermée lorsque l'injection manuelle est arrêtée. Toutes les mesures ultérieures sont effectuées à cellule fermée. Lors de l'adsorption d'un polycation sur les parois de la cellule, la nature des contrions accumulés à la surface est modifiée et le signe de la mobilité électro-osmotique est inversé. Cela peut fausser les résultats. Le but de la calibration est d'injecter dans la cellule des particules colloïdales chargées négativement et de mobilité connue. Cette calibration s'effectue grâce à l'utilisation d'une solution de latex sulfaté (référence AZ55 fournie par Malvern) de densité de charge et donc de potentiel zêta connus. Cette solution nous donne une valeur de potentiel zêta négatif égale à $-(55 \text{ mV} \pm 5) \text{ mV}$ (en solution aqueuse et en présence de chlorure de sodium à 1 mM). Si cette valeur du potentiel zêta n'est pas obtenue, à l'incertitude expérimentale près, la cellule de mesure est démontée de son bâti et nettoyée. Le nettoyage s'effectue en immergeant la cellule dans une solution aqueuse de Hellmanex à 2 % (en volume) et à une température

proche de 60°C. A la sortie du bain de détergent, les parois internes de la cellule sont frottées au goupillon, la cellule est ensuite lavée à l'éthanol, à l'eau, plongée dans une solution d'acide chlorhydrique à 0.1 M, puis lavée à l'eau distillée avant de la remettre en place dans le bâti du dispositif de mesure. Une fois la calibration effectuée, la mesure peut être entreprise avec la solution de complexes. Avant chaque injection de complexes, la cellule de mesure est intensivement rincée à l'eau Milli-Q. Il est indispensable d'éviter toute présence de bulles d'air dans la cellule car elles risqueraient de fausser les mesures, puisque la lumière est diffusée à l'interface gaz-solution aqueuse. Aussi, toutes les solutions sont légèrement soniquées (au bain à ultrasons pendant quelques secondes et à faible puissance) avant chaque mesure. L'amplitude de la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule a été de 200 mV pour toutes les mesures effectuées avec des complexes

2.2.3 Electromobilité en gel d'agarose :

L'ADN est une molécule chargée négativement, qui soumise à un champ électrique peut diffuser au sein d'un hydrogel d'agarose. La vitesse de diffusion est fonction de l'intensité du courant utilisé, de la taille des fragments d'ADN et de la concentration en agarose. Grâce à ces paramètres des fragments de différentes tailles peuvent être facilement dissociés au cours d'une électrophorèse. Un ADN plasmidique présente donc trois bandes caractéristiques au cours d'une électrophorèse en gel d'agarose correspondants aux trois formes sous lesquelles il est retrouvé (super-enroulé, enroulé, linéaire). Après complexation la charge de surface de l'ADN devient positive (Parker et al., 2002). De ce fait l'ADN ne migre plus dans le même sens. Ainsi l'état de complexation de l'ADN peut être objectivé au cours d'une électrophorèse en gel d'agarose car celui-ci ne migre plus. De plus pour révéler la présence d'ADN dans le gel d'agarose, celui-ci est marqué avec du bromure d'éthidium (BET). Ce fluorophore ne peut marquer l'ADN complexé. En effet le BET ne peut se fixer sur l'ADN complexé du fait de l'encombrement stérique engendré par le PEI.

Un gel d'agarose 1% est préparé par dissolution à chaud de 1g d'agarose (agarose electrophoresis grade, Invitrogen) dans 100 ml de TBE (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA). Les complexes formés sont dilués dans un tampon de charge (6X loading dye, Fermentas) puis soumis à une électrophorèse (77 V pendant 1 heures). Les gels sont observés sous lumière ultraviolette à l'aide d'une caméra (geldoc 2000, Biorad).

2.3 Construction des multicouches de polyelectrolytes :

2.3.1 Construction des multicouches : généralités

Pour l'ensemble des études réalisées sur les multicouches ainsi que les essais de transfection, les multicouches ont été construites sur des lamelles de verre, d'un diamètre de 12 ou 14 mm (CLM, France). Préalablement ces lamelles sont nettoyées par passage successif dans un bain de SDS 0,01 M chauffé à 50°C pendant 15 min, puis dans un bain de HCl 0,1N chauffé à 50°C pendant 15 minutes puis rincées abondamment à l'eau distillée. Les lamelles sont alors disposées individuellement dans les puits d'une plaque 24 puits. On ajoute alors 300 µl de la solution de polycation à une concentration de 1mg/ml pour PGA et HA et de 5mg/ml pour PAH dans un tampon NaCl 0,15 M, Hepes 20 mM pH = 7,4. Après 10 min d'incubation la solution de polycation est retirée et la lamelle rincée avec 500 à 1000 µl de tampon (NaCl 0,15 M, Hepes 20 mM pH = 7,4) pendant 10 minutes (on change alors le tampon trois fois pendant cette période). Après rinçage, 300 µl d'une solution de polyanion est ajoutée par puits. Les lamelles incubent à nouveau 10 minutes puis subissent le même protocole de rinçage que précédemment. Ces étapes sont répétées n fois afin d'obtenir un film (polycation/polyanion)_n. Les films multicouches ainsi construits sont conservés dans la solution tampon jusqu'à utilisation (jusqu'à 15 jours).

Pour la réalisation de films contenant un nombre élevé de couches, l'opération de dépôt est programmée à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot DR3, Kriestein) déplaçant séquentiellement des portoirs à lamelles dans les différents bains de polyelectrolytes et de rinçage.

Préalablement à leur utilisation en culture cellulaire les multicouches sont stérilisées par exposition aux UVs pendant 15 minutes en immersion dans le tampon de construction.

2.3.2 Construction des multicouches fonctionnalisées avec des complexes (PEI/ADNp)

2.3.2.1 Formation des complexes (PEI/ADNp)

Les complexes (PEI/ADNp) sont préparés dans le même tampon que celui servant pour la construction des films multicouches (NaCl 0,15M + Hepes 20 mM pH = 7,4).

1 μg d'ADN plasmidique est dilué dans 50 μl de tampon. La quantité de PEI nécessaire à la complexation de l'ADN au N/P désiré est dilué dans 50 μl de tampon également. Les deux solutions sont mélangées puis vortexées vigoureusement afin de bien homogénéiser la solution. La solution incube pendant 15 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes entre le PEI et l'ADN. Après cette période d'incubation les complexes sont directement utilisés soit pour fonctionnaliser une multicouche ou transférer des cellules en solution soit pour analyse physico-chimique.

2.3.2.2 Fonctionnalisation des multicouches avec des complexes (PEI/ADN_p)

L'adsorption des complexes sur une multicouche est réalisée sous une hotte à flux laminaire afin de conserver la stérilité des multicouches. La solution tampon est retirée de chaque puits contenant des films multicouches. 200 μl de la solution tampon sont ajoutés à chaque puits. 100 μl de la solution de complexe contenant 1 μg d'ADN sont ajoutés dans chaque puits. La solution est homogénéisée manuellement. L'ensemble incube durant 1 heure à température ambiante. Les films multicouches sont alors rincés trois fois 5 minutes dans un tampon (NaCl 0,15 + Hepes 20 mM pH = 7,4). Le processus de construction d'un film multicouche peut être poursuivi afin d'enfouir les complexes au sein même de l'architecture. De même l'adsorption des complexes peut être répétée à différents niveaux de l'architecture.

2.4 Protocoles de transfection :

2.4.1 Protocole de transfection en solution :

L'efficacité de notre protocole de transfection par l'intermédiaire de multicouche de polyélectrolyte a été comparée à un système classique de transfection en solution. Pour cela nous avons choisi comme vecteur le PEI 22kDa linéaire. La méthode est largement décrite dans la littérature et des systèmes commerciaux sont en vente (jetPEI, polyplus transection, Strasbourg) (Zaric et al., 2004).

24 heures avant la transfection les cellules sont mises en culture dans une plaque 24 puits, à une concentration permettant d'atteindre une population à sub-confluence le lendemain.

Les cellules sont rincées au PBS, puis 500 µl de milieu complet sont ajoutés dans chaque puits. 100 µl de solution de complexes contenant 1 µg d'ADN sont alors ajoutés par puits. Les cellules sont incubées 6 heures à 37°C à 5 % CO₂. Le milieu de transfection est alors retiré et 1 ml de milieu complet est ajouté dans chaque puits. Après 24 h de culture le taux de transfection est évalué (le choix de la technique d'évaluation est dictée par le gène rapporteur utilisé cf 2.5.3).

2.4.2 Protocole de transfection par multicouche :

Une fois les films multicouches préparés, les cellules sont directement mises en culture sur ces substrats. Après 24 heures le taux de transfection peut être évalué.

2.4.3 Analyse du taux de transfection :

L'analyse de l'efficacité de transfection a été réalisée selon trois protocoles en fonction du gène rapporteur utilisé. Pour les expériences utilisant le plasmide pEGFP-C1 exprimant EGFP, l'analyse a été faite par cytométrie en flux ou par mesure de fluorescence. Pour les expériences réalisées avec le plasmide pIV1066 exprimant la luciférase, l'analyse a été réalisée par mesure de l'activité spécifique de l'enzyme. Chaque mesure est la moyenne de trois valeurs mesurées trois fois indépendamment

2.4.3.1 Par cytométrie en flux

2.4.3.1.1 Principe de la cytométrie en flux :

La cytométrie en flux permet l'analyse des cellules en suspension dans un flux continu de liquide. Chaque cellule est analysée séparément et la distribution des populations peut-être étudiée. La cytométrie permet de déterminer la taille des cellules, leur granularité et permet d'enregistrer une ou plusieurs fluorescences émises par ces cellules.

Un système de centrage hydrodynamique permet de canaliser les cellules et de les faire passer une à une dans le faisceau d'un laser, source lumineuse permettant le monochromatisme et la stabilité de la lumière émise. La cellule dans le faisceau émet en retour un certain nombre de signaux lumineux qui seront recueillis par des systèmes optiques collecteurs spécifiques d'une longueur d'onde donnée et positionnés selon des axes précis :

- La diffusion dans l'axe : la cellule excitée par le faisceau incident diffuse une partie de la lumière reçue, cette diffusion se fait à la même longueur d'onde et, recueillie dans l'axe du laser, elle est indicatrice de la taille des cellules.
- La diffusion aux grands angles : une partie de la lumière du faisceau incident traverse la paroi cellulaire et est diffusée par les organites intracellulaires dans toutes les directions. Cette lumière de même longueur d'onde et recueillie avec un angle de 90° par rapport au laser rend compte de l'hétérogénéité du contenu cellulaire ou de sa granularité.
- La fluorescence : le faisceau laser est fourni par une lampe à argon, sa longueur d'onde est de 488 nm. Il va exciter un ou plusieurs fluorochromes présents à la surface ou dans les cellules, qui vont émettre des fluorescences de longueur d'onde supérieure, séparées par des filtres et des miroirs dichroïques pour être enregistrées après photomultiplication.

Un système informatique performant récolte toutes ces informations et assigne à chaque cellule analysée (jusqu'à 2000 cellules par seconde) plusieurs paramètres permettant l'étude des populations cellulaires.

2.4.3.1.2 Déroulement d'une expérience :

Après 24 heures de culture, les cellules sont rincées au PBS, puis 200 µl d'une solution de trypsine sont ajoutés par puits. Les cellules incubent 5 min à 37°C. 800 µl de milieu complet sont ajoutés dans chaque puits et les cellules sont décollées de leur substrat de cultures. Les cellules sont récupérées par centrifugation (1000g pendant 5 min). Le culot est mis en suspension dans 500 µl de PBS + PFA 4 %. Les cellules sont alors analysées par cytométrie.

Pour chaque type cellulaire le cytomètre est calibré à l'aide d'une population non transfectée.

L'ensemble des échantillons est par la suite analysé. L'analyse ne porte que sur une population homogène en taille et en granulométrie en rapport avec la population de référence (cellule non transfectées) afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires. A partir de l'analyse de la population de cellules non transfectées, le seuil inférieur de fluorescence à partir duquel la fluorescence peut être attribuée à la production de GFP est déterminée. Les résultats seront présentés en pourcentage de cellules fluorescentes par rapport à la population de cellules analysées sans tenir compte de l'intensité de la fluorescence. Les

cellules transfectées produisant de la EGFP (longueur d'onde d'émission : 488 nm) la fluorescence a été analysée dans le canal F11.

2.4.3.2 Par fluorimétrie :

La quantité d' EGFP produite est proportionnelle à la fluorescence produite. Ainsi la mesure de la fluorescence est une valeur relative de la quantité d' EGFP produite par les cellules transfectées. Ainsi après transfection les cellules sont lysées dans 200 µl de tampon de lyse (tris 10 mM + Triton X100 0,1 %). Les cellules sont centrifugées à 10 000 tr/min pendant 5 min puis le surnageant est récupéré. La fluorescence du surnageant est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (VersaFluor™, Biorad). Cette mesure est normalisée par la quantité de protéine présente dans chaque échantillon.

2.4.3.3 Par mesure de l'activité de la luciférase :

Les cellules sont lysées par incubation pendant 15 minutes dans un tampon Tris + tritonX100 0,1 %. Les cellules sont centrifugées à 10000g pendant 5 min. Le surnageant est récolté et utilisé pour mesurer l'activité de la luciférase. L'activité est mesurée en utilisant le kit "Luciferase assay system" (Promega) en suivant les instructions du fabricant. La quantité de protéine est dosée dans chaque échantillon analysé. Les valeurs d'intensité lumineuse (RLU) sont normalisées en fonction de la quantité de protéine de chaque échantillon.

2.5 Mesure de cytotoxicité

2.5.1 Mesure de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide :

L'estimation de la survie cellulaire est souvent réalisée par dénombrement des cellules survivantes au microscope à contraste de phase ; il s'agit là d'une méthode longue et fastidieuse, et qui met souvent la culture en péril. Il existe des méthodes colorimétriques plus rapides et très reproductibles qui permettent de surmonter cette difficulté. La mesure de la viabilité par la méthode des phosphatases acides permet de quantifier le nombre de cellules vivantes avec plus de sensibilité que l'épreuve au XTT (Ueda et al., 1994). Elle consiste à titrer cette enzyme dont l'activité augmente proportionnellement au nombre de cellules

viables. Dans notre étude la viabilité cellulaire a été détectée et quantifiée par mesure colorimétrique de la phosphatase acide, adaptée à une lecture en plaque 96 puits.

Une solution de pNPP à 10 mM est préparée dans 5ml de tampon (acétate de sodium 0,1 M + 0,1 % triton X-100 pH = 5,5). La solution est incubée à 37°C en bain marie pendant 30 minutes.

Le milieu de culture est retiré et chaque puits est lavé avec 300 µl de PBS 1X. Les puits sont alors additionnés de 600 µl de tampon. Les plaques sont placées 2 à 3 heures à 37 °C dans un incubateur à air 95% CO₂ 5%. La réaction est arrêtée par addition de 10 µl de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1N. Il y a formation d'une solution colorée jaune. Chaque puits utilisé de la plaque à 24 puits est divisé en 6 fois 100 µl dans une ligne de puits d'une plaque 96 puits. L'absorbance de la solution colorée jaune qui s'est formée est mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Afin de comparer la cytotoxicité des films multicouches de polyelectrolytes, les résultats obtenus avec ce type de test sont comparés à ceux réalisés sur le même type cellulaire cultivé sur un substrat classique de culture cellulaire (surface de référence).

2.5.2 Fragmentation de l'ADN :

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée caractérisée par une condensation du cytoplasme, la formation de vésicules membranaires et la formation d'un noyau dit pycnotique. Au cours de ce phénomène l'ADN génomique est dégradé en petits fragments de 200 bp. Les cellules apoptotiques dans une culture cellulaire peuvent donc être détectées par analyse de l'ADN génomique (Iannou YA. et al., 1996).

Pour déterminer la présence de phénomène d'apoptose au cours de la culture de cellules de type B16-F1 sur différents types de substrats, l'ADN génomique des cultures cellulaires a été extrait et analysé par électrophorèse en gel d'agarose.

Brièvement, les cellules ont été lysées puis centrifugées à 12000g pendant 30 minutes. Le surnageant est mélangé à quantité égale avec un mélange phénol:chloroforme. L'échantillon est vortexé vigoureusement puis centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 minutes. La phase aqueuse est récupérée. L'ADN de la solution est alors précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu et 1 dixième de volume de d'acétate de sodium 3M. Après 20 minutes d'incubation, l'échantillon est centrifugé 25 minutes à 10 000 tr/min. Le surnageant est alors retiré. Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70 % trois fois. Puis le culot est repris dans 100µl de tampon TE.(10 mM Tris + 1 mM EDTA).

Chaque échantillon d'ADN est alors soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1,5 %.

2.6 Mesure de l'activité d'endocytose :

2.6.1 Mesure de l'activité d'endocytose de cellules eucaryotes par dosage de la HRP :

Le protocole de mesure de l'activité d'endocytose par des cellules eucaryotes utilisé ici est dérivé d'une méthode décrite par Li et Stahl (1993). La "Horse Radish Peroxidase" (HRP) a été utilisée comme marqueur d'endocytose en phase liquide. La quantité de HRP endocytée au cours d'une période donnée a été quantifiée par mesure de l'activité de la HRP sur L'ABTS. Ce substrat est oxydé par l'enzyme et le produit de la réaction est un composé bleu-vert. La réaction colorimétrique peut être quantifiée par mesure de l'absorbance de la solution à 405 nm.

24 h avant l'expérience, les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits contenant différents types de films multicouches, à une concentration de 6.10^4 cellules par puits.

Le jour de l'expérience, le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture contenant 50 µg/ml de HRP. Les cellules incubent ainsi durant 2h à 37 °C à 5 % de CO₂.

Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec 500 µl de PBS froid (4°C) afin de stopper tous les processus actifs dont l'endocytose. 200 µl d'une solution de trypsine (0,5 mg/ml, 0,5 mM EDTA) sont ajoutés pour permettre le décollement des cellules. Après 5 min d'incubation, 800 µl de milieu complet sont rajoutés dans chaque puits et les cellules récoltées. Après centrifugation 5 min à $4,5 \cdot 10^3$ tr/min, le culot est repris dans 500 µl de PBS et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est alors repris dans 200 µl de tampon de lyse (Tris 10 mM + triton X100 0,1%), 15 minutes sur glace.

Dans une plaque 96 puits on réalise alors le dosage de l'activité de la HRP dans chaque échantillon. 25 µL de chaque échantillon sont mélangés à 25 µl d'H₂O et 50 µl de tampon "HRP substrate" (Tampon citrate 20 mM + H₂O₂ 0,5 % + ABTS 10 mg/ml). La réaction est incubée 10 minutes à l'abri de la lumière. Puis la réaction est stoppée avec 0,1 % de SDS. On mesure la DO à 405 nm dans d'un lecteur de plaques (iEMS reader Multiskan EX, Thermo electron corporation). La quantité d'HRP présente dans chaque échantillon est calculée à l'aide d'une courbe étalon. Les résultats sont normalisés en fonction de la quantité

de protéine de chaque échantillon. Chaque valeur est la moyenne de trois mesures répétées trois fois indépendamment.

Notons que nous avons déterminé initialement que l'évolution de la quantité d'HRP endocytée au cours du temps subit une évolution linéaire jusqu'à 4 heures d'incubation (figure 2-10).

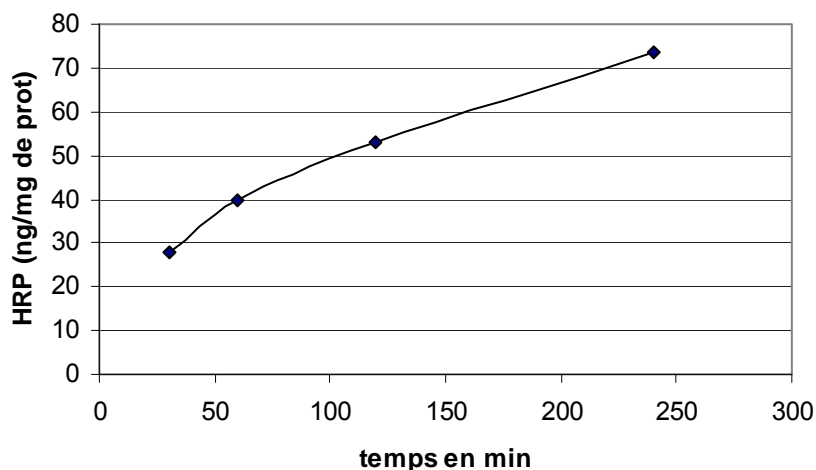


Figure 2-10: Evolution de la quantité d'HRP endocytée par des cellules de type B16-F1 au cours du temps.

2.6.2 Mesure de l'efficacité de transfection en présence d'inhibiteurs de l'endocytose :

Afin de connaître les voies d'endocytose menant à l'internalisation des complexes et à l'expression du transgène, nous avons procédé à des transfections en bloquant sélectivement les voies d'endocytose à l'aide d'agents chimiques.

Ainsi afin de cibler le cytosquelette les cellules ont été traitées avec de la cytochalasine D (cyt D) à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant la durée de la transfection. Afin de perturber l'organisation de la clathrine, les cellules ont été prétraitées pendant 30 minutes à 37°C avec de la chlorpromazine (10 $\mu\text{g/ml}$). L'action d'agents pharmacologiques a également été testée. Les cellules ont donc été préincubées pendant 30 minutes avec de la wortmaninne (W) (100 nM) ou de 5-(N,N-Diméthyl)amiloride (DMA). L'ensemble des agents chimiques ont été conservés au cours de la transfection. Afin de dépléter la membrane cellulaire de cholestérol pour objectiver le rôle des "lipid rafts" et des cavéoles au cours de l'endocytose des complexes, les cellules ont tout d'abord été incubées dans un milieu sans

sérum pendant 2 heures à 37°C puis 30 minutes en présence de methyl beta cyclodextrine (MCB).

Le protocole de transfection à partir de multicouches de polyélectrolytes a dû être modifié en raison de la cytotoxicité des agents chimiques utilisés. Ainsi les cellules ne sont cultivées que pendant un temps limité en présence des agents inhibiteurs sur des films fonctionnalisés. Ce temps a été fixé à 6h afin de permettre une détection facile de la transfection.

Ainsi les cellules sont prétraitées comme il a été décrit précédemment et mises en culture sur une architecture de type (PAH/PSS)₆PLX en présence des différents agents pharmacologiques. Les cellules sont alors rincées abondamment avec du PBS froid (4°C) afin de stopper tout processus actif dont l'endocytose. Les cellules sont alors traitées avec de la trypsine (0,5 mg/ml, 0,5 mM EDTA) pendant 10 minutes à 37°C. Cette étape permet de décoller les cellules du substrat (films multicouches) ainsi que d'éliminer tous les complexes adsorbés à la surface des cellules mais qui n'ont pas été internalisés. Les cellules sont alors centrifugées puis mise en suspension dans du milieu complet et ensemencées dans une plaque 24 puits. Les cellules sont ainsi cultivées pendant 48 heures afin de permettre l'expression du transgène. Puis l'efficacité de transfection est objectivée par des tests d'activité de la luciférase (voir 2.4.3.3).

La cyt D, le DMA, la W et la MBC étant dissouts dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), l'efficacité de transfection des architectures en présence de ces agents a été comparée à celle en présence uniquement de ce solvant. En effet de DMSO est un agent qui déstabilise les membranes lipidiques et qui peut ainsi avoir un effet potentiel sur l'internalisation des complexes.

2.7 Dosage de la mélanine intra cellulaire :

Le dosage de la mélanine intracellulaire a été réalisé suivant un protocole décrit par Kim et al. en 2004. Il a été réalisé après quatre de jours de culture sur différents films multicouches.

25000 cellules ont été ensemencées dans chaque puits, d'une plaque 24 puits, dans un milieu de culture enrichi avec 0,3 mM de L-tyrosine, sur différentes architectures. Après quatre jours de culture, les cellules sont lysées dans 500 µl de NaOH 1M pendant 30 minutes à 90 °C puis centrifugées à 10 000g pendant 20 minutes. La densité optique des surnageants a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (Multiskan EX, Thermo electro

corporation[®]). Avant chaque mesure, les cellules ont été dénombrées par comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer. La quantité de mélanine produite a été normalisée par rapport au nombre de cellule. Le dosage de la mélanine a été réalisé à l'aide d'une courbe étalon réalisée à partir de mélanine synthétique (Sigma) (0-200 µg/ml) dissout dans le même tampon.

Chapitre 3 : Caractérisation et pouvoir de transfection d'architectures de type (polycation/polyanion)_n(PEI/ADN_p)

1	Etude des complexes de PEI/ADN _p en solution :	101
1.1	Formation des complexes :	101
1.2	Taille et charge des complexes :	102
1.3	Interaction des polyanions avec les complexes en solution :	105
2	Caractérisation des complexes (PEI/ADN _p) adsorbés à la surface d'une multicouche :	108
2.1	Mise en évidence de l'adsorption des complexes :	108
2.1.1	Par OWLS :	108
2.1.2	Par FTIR :	110
2.1.3	Par microscopie confocale :	111
2.2	Stabilité des complexes au cours du temps :	113
2.3	Etude de la structure des films par microscopie à force atomique :	116
3	Caractéristiques de transfection d'architectures de type (polycation/polyanion) _n (PEI/ADN _p)	119
3.1	Caractérisation des conditions de transfection :	119
3.2	Influence du type de multicouche	122
3.3	Capacité de transfection des architectures (polycation/polyanion) _n polyplexes : ...	123
3.3.1	Evaluation du taux de transfection pour différents types cellulaires :	123
3.3.2	Optimisation du taux de transfection	125
3.3.2.1	Transfection en présence de polyanions.....	125
3.3.2.2	Transfection en fonction du nombre de couche de complexe :	126
3.3.3	Amélioration des propriétés d'adhésion cellulaire de films multicouche de type (PLL/PGA) _n PLX par utilisation de mannose couplé au PGA.....	127
4	Cytotoxicité liées aux complexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte : ...	129
4.1	Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide.	129
4.2	Mécanismes liés à la cytotoxicité de ces architectures :	130
5	Endocytose des polyplexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte :	131
5.1	Influence des multicouches sur l'endocytose :	132
5.2	Voie d'endocytose des complexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte :	133
6	Discussion :	135
7	Article 1 : " A general approach for local gene delivery based on polyplex - functionalized polyelectrolyte multilayers"	141

Introduction

L'immobilisation de complexes d'ADN et de PEI sur un substrat de culture à l'aide de liaisons streptavidine/biotine constitue un premier exemple d'immobilisation de complexes sur une surface, dans lequel le taux de transfection obtenu est comparable à celui en solution (Segura et al., 2003). L'utilisation des multicouches de polyélectrolyte représente une alternative simple à ce type de transfection en phase solide. Cette approche a été étudiée en utilisant l'ADN comme polycation constitutif de la multicouche. L'ADN plasmidique est distribué dans ce cas dans l'ensemble de la multicouche. La dégradation ou l'hydrolyse de la multicouche mène à la libération de l'ADN, celui-ci étant alors complexé avec le polyanion constitutif de la multicouche. Mais, de l'avis même des auteurs, les caractéristiques de ces complexes ne sont pas connues et surtout pas contrôlables. Or comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1, les caractéristiques des complexes influencent le pouvoir de transfection d'un vecteur. C'est pourquoi l'incorporation de complexes préformés dans une multicouche représente une alternative intéressante.

Les données de la littérature sur les caractéristiques des complexes suggèrent que l'incorporation de polyplexes dans une multicouche de polyélectrolytes, bien qu'elle n'ait jamais été décrite, peut se faire par simple adsorption des complexes au cours du processus de construction. Le but de ce travail est donc essentiellement (i) la constitution d'architectures de polyélectrolytes incluant des polyplexes, (ii) leur évaluation comme système de transfection et (iii) leur capacité à stocker l'ADN. Dans la première partie nous évaluerons l'adsorption de polyplexes sur différents types de multicouches selon un modèle présenté dans la figure 3-1. Ce type d'architecture, (polycation/polyanion)_n/PLX, constitue le modèle de base dans lequel les cellules sont directement au contact des polyplexes. Ce modèle, démultiplié, sera exploité dans la constitution d'un réservoir.

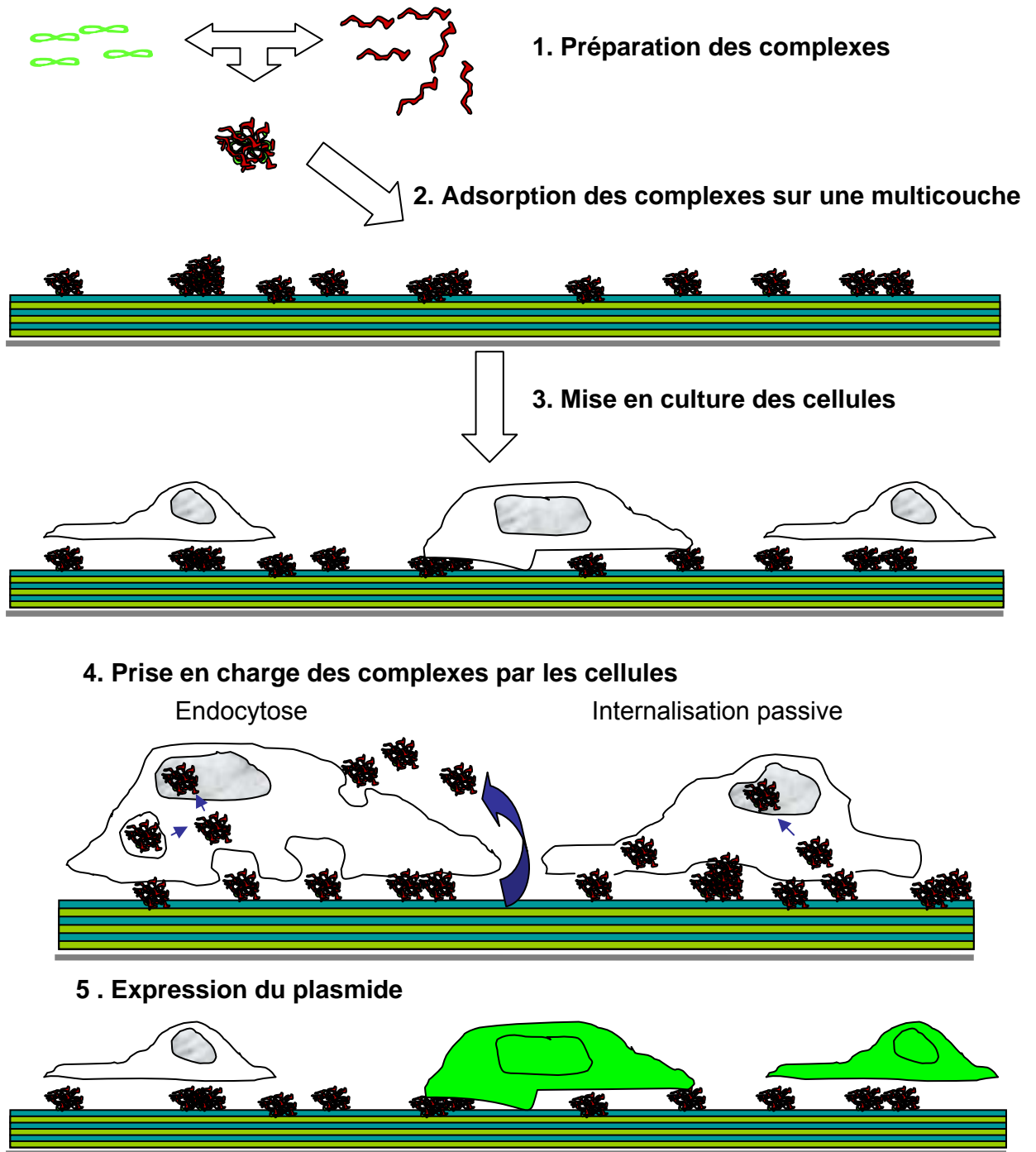


Figure 3-1 : Représentation schématique du système basique de transfection médiée par des films de polyélectrolytes. Des polyplexes sont adsorbés sur une multicouche de polyélectrolytes. Les cellules sont mises en culture directement sur ce substrat. La prise en charge des complexes mènera, sur une partie de la population cellulaire, à l'expression du transgène inséré dans le plasmide transfectant.

Ce chapitre comprend plusieurs parties : tout d'abord l'étude des complexes en solution, puis l'étude des complexes adsorbés sur une multicouche et enfin l'étude du pouvoir de transfection de ces architectures. Sans être exhaustive, l'analyse de différents types de multicouche, (PLL/PGA)_n, (CHI/HA)_n et (PAH/PSS)_n, est présentée. L'efficacité de transfection est testée sur différents types cellulaires et le comportement cellulaire sur ces architectures est examiné afin de définir les paramètres de base devant servir à l'optimisation de l'approche.

L'efficacité de cette approche est dépendante de plusieurs facteurs tels que le ratio PEI/ADN, la nature des polyélectrolytes constitutifs, et la quantité d'ADN utilisée pendant la construction. Le caractère modulable des multicouches, en particulier la possibilité de construire des assemblages composites, permet d'envisager l'adéquation des propriétés du système à une application donnée,

1 Etude des complexes de PEI/ADN_p en solution :

Nous avons utilisé le PEI linéaire de 22 kDa qui constitue un des meilleurs vecteurs synthétiques *in vitro*. De plus malgré une cytotoxicité avérée, il a été utilisé avec succès *in vivo* dans des matrices de PLGA et de collagène sans engendrer de réaction ni *in situ*, ni à distance du lieu d'implantation (Scherer *et al.*, *J. Gene Med*, 2002; Huang YC *et al.*, *Gene Therapy*, 2005).

Dans un premier temps l'étude des complexes en solution a été menée afin de connaître leurs caractéristiques physico-chimiques en terme de taille et de charge de surface avant d'envisager leur incorporation dans une multicouche. La stabilité des complexes de polyélectrolytes préformés variant en fonction de leur environnement moléculaire (Danielsen *et al.*, 2005 ; Etrych *et al.*, 2005), le comportement des polyplexes en présence de différents polyanions utilisés dans la construction de multicouches, a été évalué.

1.1 Formation des complexes :

Comme nous avons pu le décrire précédemment la formation d'un complexe entre le PEI et l'ADN résulte des interactions électrostatiques entre les groupements phosphate de l'ADN et les groupements azote du PEI. La complexation de l'ADN est fonction de la quantité de PEI et se décrit classiquement par le rapport azote/phosphate (N/P). Des expériences d'électromobilité en gel d'agarose ont été réalisées pour objectiver cette complexation. Une quantité constante d'ADN plasmidique (ADN_p) a été mélangée à une quantité croissante de PEI linéaire 22 kDa puis soumise à une électrophorèse en gel d'agarose 1%. Le plasmide utilisé ici est le pEGFP-C1 dont la taille de 4500 paires de base.

Il apparaît que l'ADN ne migre plus au delà d'un N/P = 3 (fig. 3-2). A partir d'un N/P de 5, l'ADN, n'étant plus marqué par le bromure d'éthidium, est suffisamment complexé.

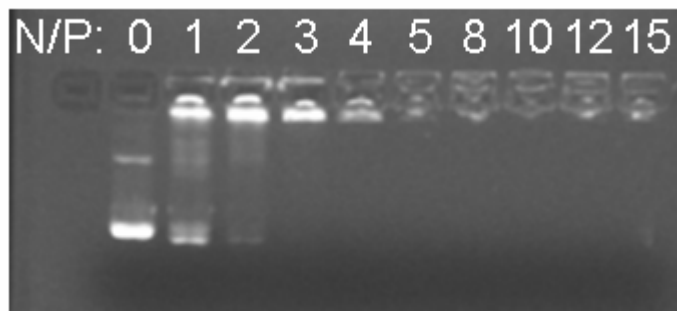


Figure 3-2 : Formation des complexes de (PEI/ADN_p) en fonction du N/P. Des complexes PEI/ADN_p ont été formés avec une quantité croissante de PEI. La quantité de PEI est exprimée en fonction du rapport N/P. Les complexes ainsi formés sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1%. L'ADN non complexé peut migrer, alors que complexé au PEI, du fait des compensations de charge, il ne migre plus. De plus l'ADN complexé ne peut plus être marqué par le bromure d'éthidium.

L'utilisation des complexes ne sera donc envisagée qu'à partir d'un N/P = 5. En effet la complexation de l'ADN avec le PEI lui confère une protection contre les nucléases extracellulaires (Gebhart et al., 2002).

1.2 Taille et charge des complexes :

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zeta des complexes (PEI/ADN_p) ont été évalués par "dynamic light scattering" (DLS) et "laser doppler electrophoresis". La taille moyenne des complexes est dépendante de la concentration en NaCl du milieu. Ainsi les complexes formés à 10 mM NaCl présentent un diamètre hydrodynamique inférieur à ceux formés à 150 mM (fig.3-3). Le diamètre évolue également en fonction du N/P. Plus la complexation de l'ADN est importante, plus le diamètre des complexes diminue. Pour des complexes formés à 150 mM NaCl, le diamètre moyen a été évalué à $774,6 \pm 78,1$ nm (N/P = 12) et à $897,6 \pm 79,8$ nm (N/P = 5). Dans les deux cas la polydispersité est inférieure à 0,1, ce qui démontre une distribution en taille relativement étroite (fig. 3-3). Pour des complexes formés à 10 mM de NaCl, la taille moyenne est de l'ordre de 250 nm pour un N/P = 12. Cette valeur est en accord avec différentes études portant sur des PEI de différents poids moléculaires (Choosakoonkriang *et al.*, 2003). Néanmoins la polydispersité est supérieure à 0,2 et atteint même 1 pour N/P = 5. La distribution en taille est beaucoup plus large ce qui rend l'estimation de la taille des complexes plus aléatoire (fig.3-3).

Les mesures de charge de surface ont été réalisées à 10 mM NaCl exclusivement. En effet pour des concentrations supérieures en sel dans le milieu, la quantité de contre-ions étant

plus importante, l'influence du phénomène de mobilité électro-osmotique est trop importante et perturbe les mesures (cf mat et met 2.2.2.2). Les complexes présentent une charge de $+ 6,8 \pm 6,4$ mV à $N/P = 5$ et de $+ 16,6 \pm 1,3$ mV à $N/P = 12$. Au de-là d'un $N/P = 5$ les complexes sont chargés positivement. Ceci implique que leur adsorption sur une multicouche de polyélectrolyte doit se faire sur un film se terminant par un polyanion. Ces films présentent en effet une charge de surface négative, comme cela a été décrit par mesure du potentiel d'écoulement sur (PAH/PSS)_n (Ladam et al., 2000), (PLL/PGA)_n (Lavalle et al., 2002) et (CHI/HA)_n (Richert et al., 2004), quelque soit le nombre de bicouche.

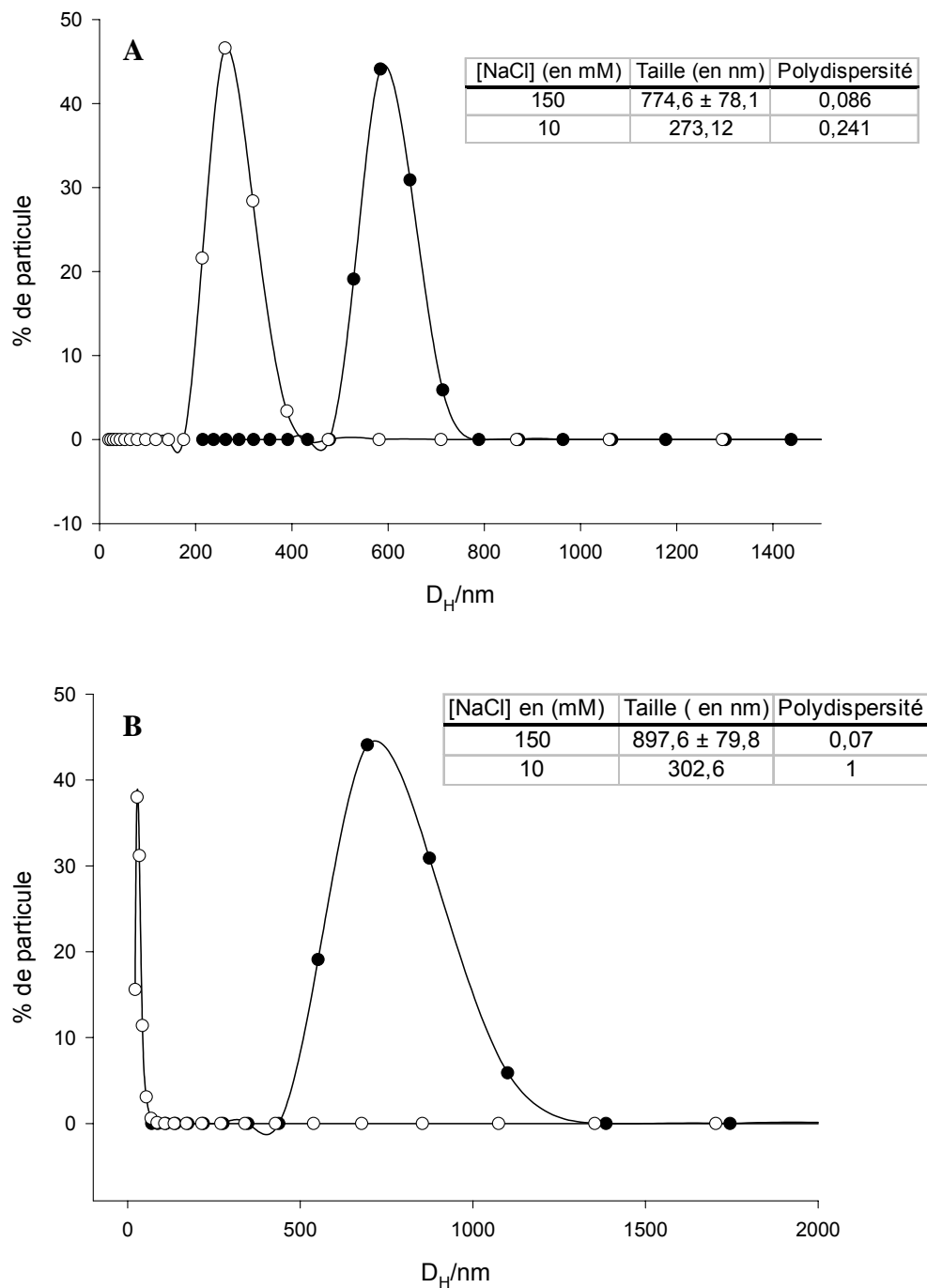


Figure 3-3 : Distribution des diamètres hydrodynamiques des complexes de (PEI/ADN_p) en fonction de la concentration en NaCl mesurée par DLS.

(A) Diagramme de distribution en taille des complexes (PEI/ADN_p) à N/P = 12

(B) Diagramme de distribution en taille de complexes formés à N/P = 5.

Dans les deux cas, les mesures ont été réalisées dans 150 mM NaCl (●) et 10 mM NaCl (○).

En encart, apparaissent les valeurs moyennes de taille calculées sur plusieurs mesures (n = 5).

1.3 Interaction des polyanions avec les complexes en solution :

Les complexes de polyelectrolytes sont des structures dynamiques. Ces structures sont sensibles aux conditions environnementales comme le taux de sel ou la présence d'autres polyélectrolytes (Danielsen et al., 2004). L'interaction de deux polyélectrolytes est, dans nos conditions, principalement de type électrostatique. La présence d'autres polyélectrolytes dans le tampon peut être à l'origine de phénomènes d'échange pouvant mener à la libération d'ADN nu dans le milieu à partir des complexes (Neu et al., 2005). Or l'incorporation de complexes PEI/ADN_p dans le processus de construction d'une multicouche, va les exposer à de fortes concentrations de polyanions en solution (cf mat & met 2.3.1). La stabilité des complexes en présence de polyanions a donc été testée par des expériences d'électromobilité en gel d'agarose. Les polyanions testés sont le poly(acide glutamique) (PGA), le poly(styrene sulfonate) (PSS) et l'acide hyaluronique (HA), qui entrent dans la composition des films modèles que nous allons étudier.

Des complexes de PEI/ADN_p à N/P = 12 (préparés dans un tampon NaCl 0,15 M, Hepes 20 mM pH = 7,4) sont incubés pendant 10 min en présence d'une concentration croissante en polyanion, puis soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Il apparaît que PGA et PSS déplacent le complexe même à faible concentration (fig 3-4 A et B). La concentration seuil est respectivement de 40 µg/ml pour PSS et de 80 µg/ml pour PGA. Pour PGA à 40 µg/ml, l'ADN est partiellement décomplexé ce qui retarde sa migration dans le gel mais permet déjà un marquage par le bromure d'éthidium. HA ne provoque jamais le déplacement du complexe même à forte concentration (800 µg/ml) (fig.3-4C). L'interaction forte de PGA et PSS avec les complexes pourrait donc mener à la libération d'ADN des complexes adsorbés en surface d'une multicouche soit lors de l'adsorption des complexes soit lors de l'adsorption d'une nouvelle couche de polyanion au dessus de la couche de complexes.

Les résultats obtenus avec HA nous ont amenés à nous interroger sur son interaction avec le complexe. Y a-t-il interaction entre HA et PEI ? Si oui, cette interaction mène-t-elle au recouvrement du complexe par du HA ? Pour répondre à ces questions, des mesures du potentiel zeta de complexes PEI/ADN_p (N/P = 12) incubés en présence d'une quantité croissante de HA ont été réalisées. Les complexes incubés avec HA présentent une charge nettement négative (fig. 3-5). La charge de surface atteint un plateau après 6,5 µg/ml de HA dans la solution. Ha interagit donc avec les complexes et ceci mène au recouvrement des complexes par une couche supplémentaire de polyélectrolyte. Ce phénomène peut être

comparé à celui de la construction de multicouches sur une surface. Les complexes (PEI/ADN_p) peuvent donc être facilement inclus dans des multicouches à base de HA.

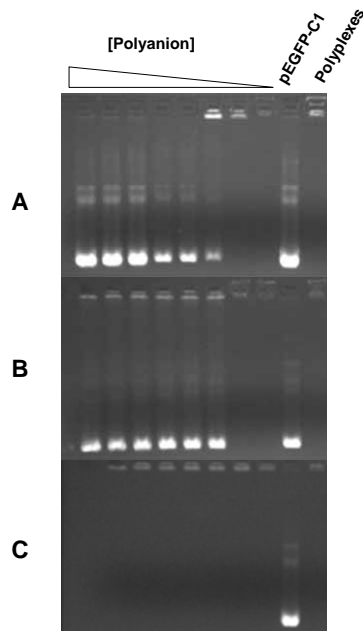


Figure 3-4: Interaction des polyanions avec les complexes (PEI/ADN_p).

Des complexes (PEI/ADN_p) N/P = 12 ont été incubés 10 min en présence d'une quantité décroissante (800, 400, 200, 100, 80, 40, 20 et 4 µg/ml) de PGA (A), PSS (B) et HA (C), puis soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1%.

PGA et PSS déplacent les complexes même à faible concentration. Ha ne déplace jamais les complexes.

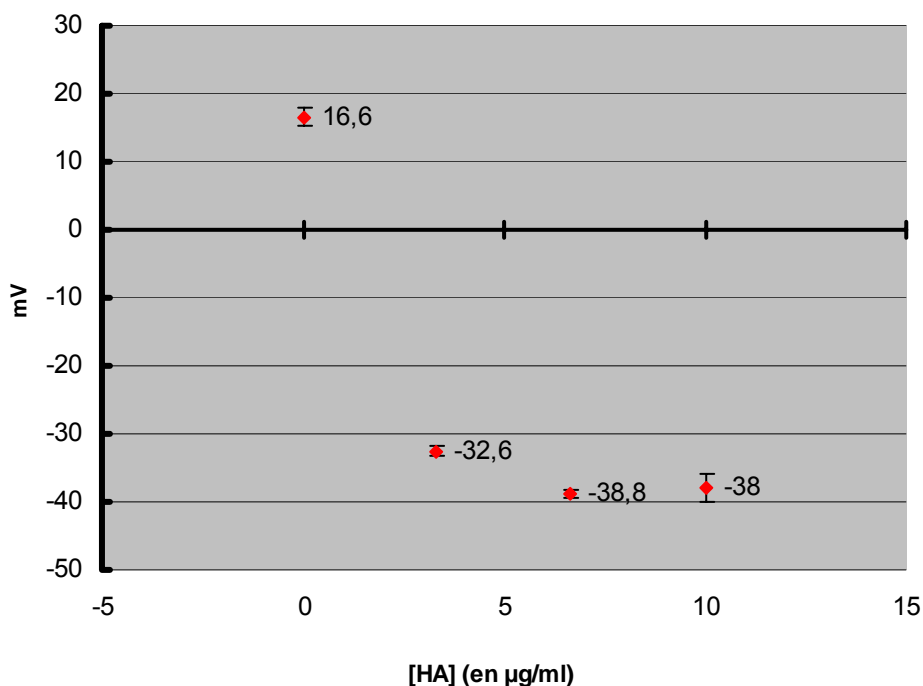


Figure 3-5 : Potentiel zeta de complexes PEI/ADN_p (N/P = 12) incubés en présence de concentration croissante de HA. En présence de HA les complexes deviennent nettement négatifs. Ce phénomène est lié à l'adsorption de HA à la surface des complexes.

La stabilité des complexes recouverts de HA envers d'autres polyanions (PGA et PSS) a été évaluée par des expériences d'électromobilité en gel d'agarose. Les complexes incubés avec des concentrations croissantes de HA (10 à 1000 µg/ml) ont été mélangés avec une solution de PGA à 200 µg/ml avant d'être soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (fig 3-6A). Même en présence de concentrations fortes de HA, PGA déplace toujours le complexe menant à la libération d'ADN_p dans le milieu. Pour déterminer une quantité limite de PGA déplaçant le complexe en présence de HA, la même expérience a été réalisée en faisant varier la quantité de PGA (200 à 10 µg/ml), la concentration de HA étant fixe (1mg/ml) (fig 3-6B). Le même profil de décomplexation est observable pour l'interaction du PGA avec le complexe PEI/ADN_p, avec un déplacement du complexe dès 50 µg/ml. En solution, HA ne présente aucun potentiel de stabilisation de l'assemblage (PEI/ADN_p) envers d'autres polyanions et les complexes (PEI/ADN)/HA réagissent comme des complexes (PEI/ADN).

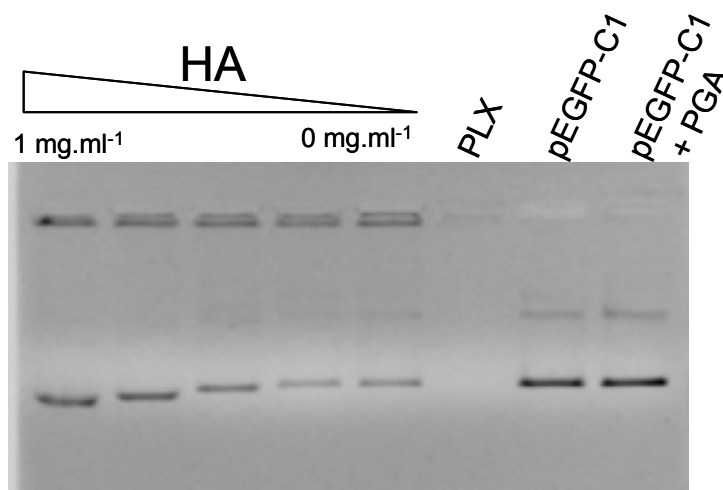


Figure 3-6A: Stabilité de complexes PEI/ADN_p recouverts par HA.

Des complexes (PEI/ADN_p) recouverts par HA à différentes concentrations (1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,01 mg/ml) ont été mélangés avec du PGA (200 µg/ml) et soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 %.

Les complexes (PEI/ADN_p) recouverts par HA sont déplacés par PGA quelle que soit la concentration de HA utilisée pour recouvrir les complexes.

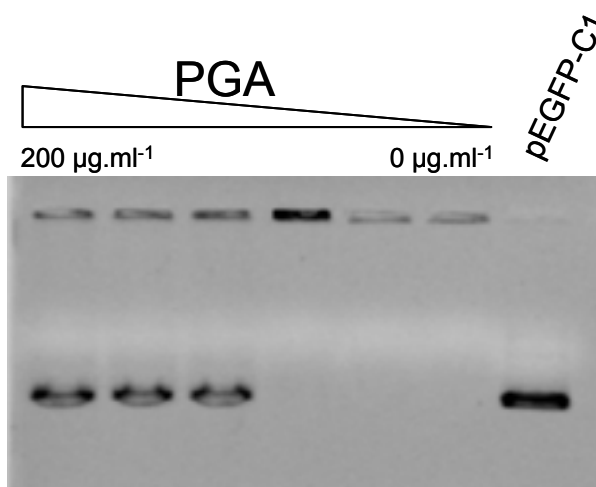


Figure 3-6B : Stabilité de complexes PEI/ADN_p recouvert par HA. Des complexes (PEI/ADN_p) incubés avec HA (1 mg/ml), sont mélangés avec des quantité croissantes de PGA (10, 20, 50, 100 et 200 µg/ml) et soumis a une électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Le déplacement du complexe recouvert de HA intervient à la même concentration de HA que pour les complexes sans HA.

2 Caractérisation des complexes (PEI/ADN_p) adsorbés à la surface d'une multicouche :

2.1 Mise en évidence de l'adsorption des complexes :

La caractérisation des complexes nous a permis de déterminer que l'adsorption peut intervenir sur des surfaces chargées négativement. Nous avons donc testé l'adsorption des complexes sur des surfaces de type (PLL/PGA)_n, (PAH/PSS)_n et (CHI/HA)_n présentant une charge de surface négative quelque soit le nombre de couche (Ladam et al., 2000 ; Richert et al., 2004 ; Lavalle et al., 2002). L'adsorption a été objectivée par spectroscopie par guide d'onde optique, par spectroscopie infra-rouge, par microscopie confocale et par dosage de l'ADN au sein des architectures.

2.1.1 Par OWLS :

La mise en évidence de l'adsorption des complexes a été réalisée dans un premier temps par spectroscopie par guide d'onde optique. L'analyse a porté sur des architectures de type (PLL/PGA)_n.

L'adsorption de complexes formés à $N/P = 5$ mène à une augmentation de la masse optique calculée (fig. 3-7). La masse optique étant proportionnelle à la masse réelle déposée (voir mat & met), l'adsorption de complexes mène à une augmentation de la masse de la multicouche. Le même phénomène peut être observé avec des complexes formés à un $N/P = 10$. Néanmoins la variation du signal est plus faible. Ceci ne peut être interprété ici comme une diminution de la quantité de matériel déposé du fait que le calcul de la masse optique d'une multicouche considère celle-ci comme une monocouche homogène et isotrope, d'autant plus que les complexes ont des tailles variables. Ceci est corroboré par le fait que le signal augmente lorsqu'on adsorbe du PEI seul par rapport au signal induit par l'adsorption de complexes à un $N/P = 10$. Cette situation est comparable à l'adsorption de complexes formés à un $N/P = \infty$ puisque lors de la formation des complexes une partie du PEI reste à l'état libre non complexé et que cette proportion augmente avec le N/P (Clamme et al. 2003).

Ces expériences nous montrent donc que du matériel se dépose après adsorption d'une solution de complexes (PEI/ADN_p) contenant également du PEI libre. Les variations de signal en fonction du N/P utilisé pour la formation des complexes semble être en accord avec le dépôt de complexes et non de PEI libre seulement.

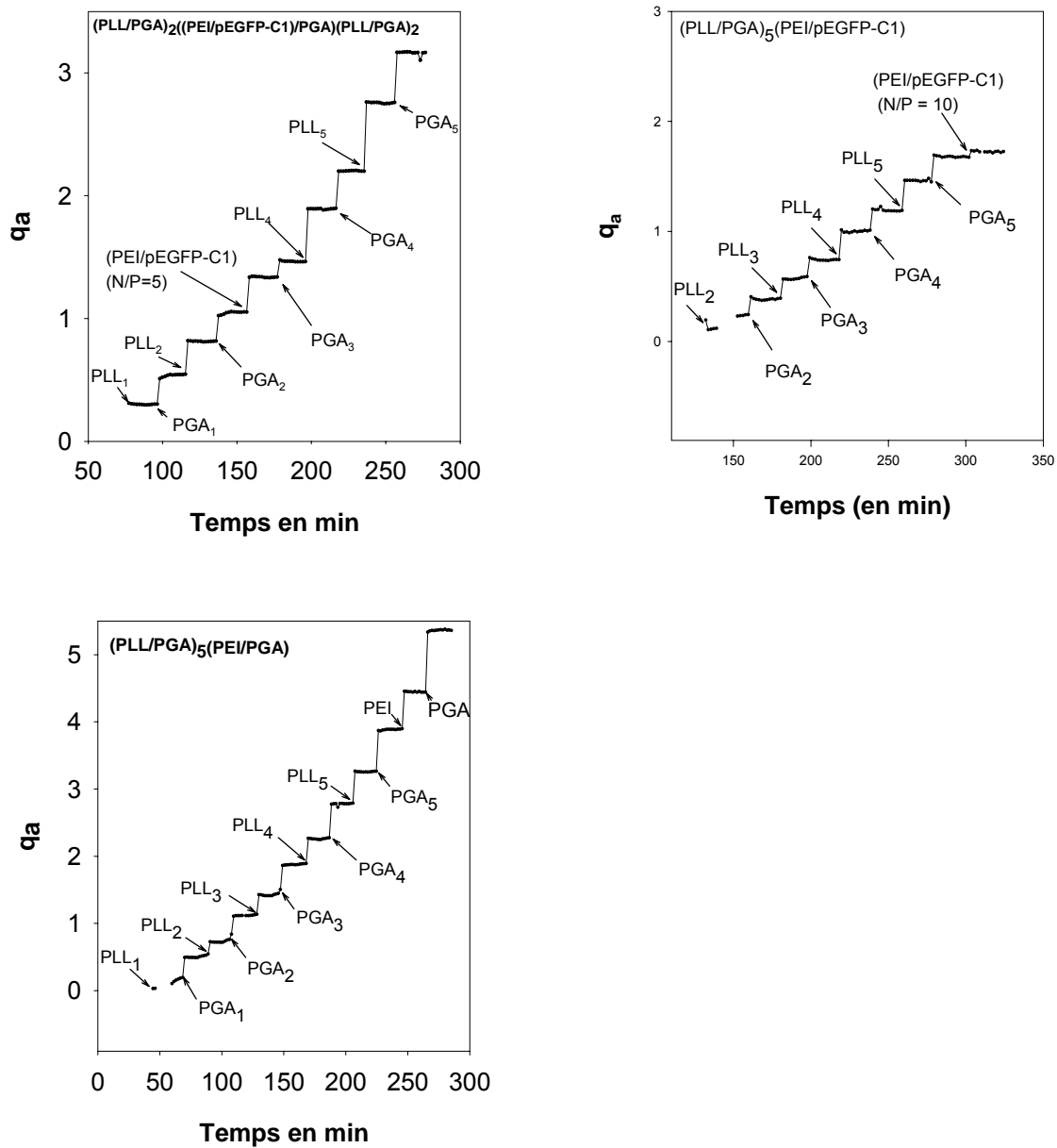


Figure 3-7: Evolution de la masse optique déterminée en guide d'onde sur différentes architectures fonctionnalisées avec des complexes de (PEI/ADN_p)

2.1.2 Par FTIR :

L'analyse du type de matériel déposé sur ces architectures a été réalisée par spectroscopie infra rouge en mode réflexion totalement atténuée. Des complexes de (PEI/ADN_p) ont été adsorbés à la surface de films de type (PLL/PGA)₆ et analysés par FTIR. L'analyse du spectre d'absorbance de cette multicouche après soustraction du spectre de la multicouche non fonctionnalisée (PLL/PGA)₆, montre des pics caractéristiques de l'ADN (fig.3-8). En effet on peut observer une bande d'absorption à 1220 cm⁻¹ caractéristique des groupements phosphate de la chaîne de l'ADN. En fait lors de l'analyse d'ADN le pic d'absorbance de ces groupements se situe à 1235 cm⁻¹. La déviation de ce pic vers des valeurs proches de 1220 cm⁻¹ étant liée à la complexation de l'ADN avec des polyanions (Zhou et al., 2004A, 2004B ; Choosakoonkriang et al., 2001 ; Sukhorukov et al., 1996).

La présence d'acide nucléique est révélée par la bande à 1640 cm⁻¹ caractéristique de la thymine, à 1602 cm⁻¹ caractéristique de l'adénine et d'une bande à 1480cm⁻¹ caractéristique de la cytosine. La bande caractéristique de la guanine à 1680 cm⁻¹ n'est pas visible du fait de l'interférence dans cette zone de l'absorption par les liaisons amides provenant de PLL.

Pour l'ensemble de ces pics les valeurs d'absorbance sont faibles. Or l'absorbance est liée à la quantité de matériel déposé. Les faibles valeurs obtenues ici montre donc que la quantité d'ADN effectivement adsorbée est faible après le dépôt d'une seule couche.

Néanmoins il ressort de ces expériences que le matériel déposé après adsorption d'une solution de complexes (PEI/ADN) sur une multicouche de type (PLL/PGA)₆ est constitué d'ADN et que cet ADN se trouve sous forme complexé. Or nous avons pu voir que le PGA libre déplace le complexe (PEI/ADN) et entraîne la libération d'ADN nu dans le milieu. Lors de leur adsorption sur la multicouche les complexes sont en contact direct avec du PGA. Il semble donc que le PGA adsorbé à la surface d'une multicouche de polyélectrolyte ne puisse diffuser suffisamment pour déplacer le complexe, du moins en totalité. La structure des complexes peut donc être conservée sur ce genre d'architecture.

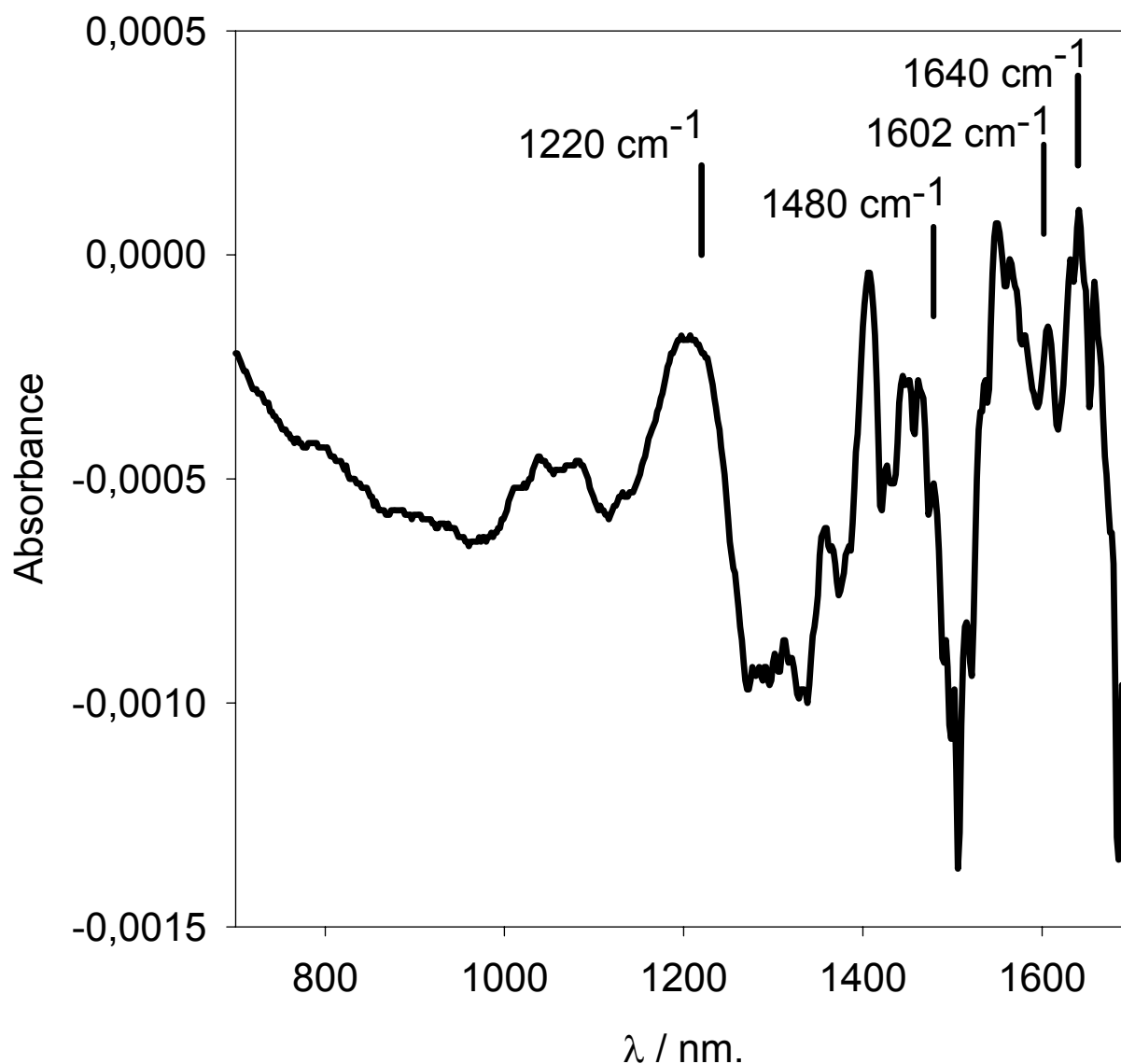


Figure 3-8 : Spectre infra rouge en mode réflexion totalement atténuée de complexes de (PEI/ADN_p) formés à N/P = 12 déposés sur une multicouche de type (PLL/PGA)₆. Le spectre représente la différence entre le spectre d'une multicouche de type (PLL/PGA)₆(PEI/ADN_p) et le spectre d'une multicouche (PLL/PGA)₆.

2.1.3 Par microscopie confocale :

Afin de mettre en évidence l'adsorption des complexes sur différents types de multicouches, une étude par microscopie confocale a été réalisée en utilisant de l'ADN plasmidique marqué par de la fluoréscéine isothiocyanate (FITC). Le marquage a été réalisé de manière covalente avec le kit "Label IT[®] fluorescein labeling kit" (Mirus) en suivant le protocole du fabricant. Après marquage, L'ADN a été purifié par précipitation dans l'éthanol pour éliminer toute trace de FITC libre. L'ADN plasmidique a été marqué avant d'être utilisé

pour préparer des complexes. Les complexes ainsi marqués ont été adsorbés sur différents types de multicouches : (PLL/PGA)₆, (PAH/PSS)₆ et (CHI/HA)₁₀ selon un protocole standard.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 3-9, après adsorption de la solution de complexes fluorescents, des particules de taille variable sont visibles sur les trois types d'architecture testés. L'adsorption des complexes est donc possible sur n'importe quelle surface chargée négativement. Ces images confirment que l'ADN est adsorbé à la surface des multicouches mais également que celui-ci est complexé. En effet l'adsorption d'ADN nu sur une multicouche de polyélectrolyte est homogène et le marquage fluorescent est alors homogène sur l'ensemble de la surface (fig. 3-9d). La taille des complexes mesurée est d'ordre micrométrique. Mais celle-ci est très variable. Il semblerait donc qu'on puisse observer sur ces surfaces des complexes natifs mais également des complexes agrégés dont la proportion ne semble pas varier en fonction du type de surface.

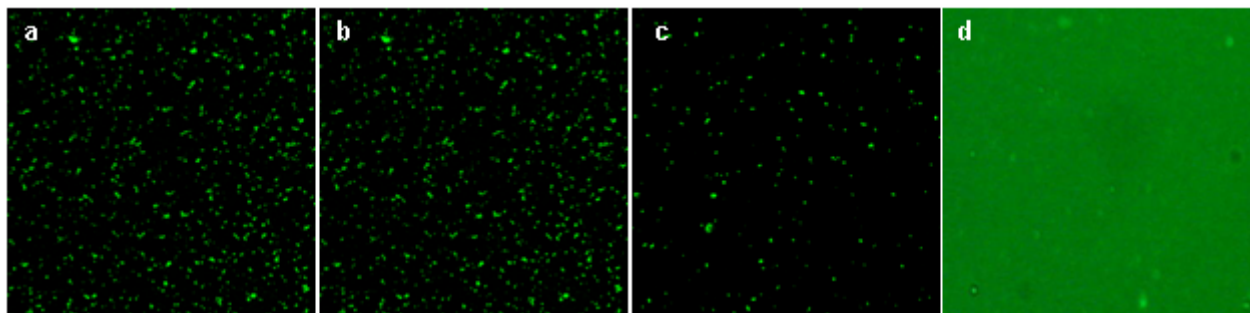


Figure 3-9 : Image en microscopie confocale de complexes de (PEI/ADN_p^{FITC}) adsorbés sur différents types de multicouches (grossissement X 40). Images de 230 μm X 230 μm.

- (a) (PLL/PGA)₁₂
- (b) (PAH/PSS)₆
- (c) (CHI/HA)₁₂
- (d) (PAH/PSS)₆(PAH/pEGFP-C1^{FITC})

A partir des images ainsi obtenues une évaluation du nombre de particules visibles a été réalisée. L'évaluation a été réalisée sur trois échantillons différents pour chaque architecture, en prenant quatre zones non chevauchantes sur chaque échantillon. Il apparaît que le nombre de particules par cm² est sensiblement le même pour les trois types de surface : $2,08 \pm 0,02 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$ pour (PLL/PGA)₆ ; $2,6 \pm 0,01 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$ pour (PAH/PSS)₆ ; $1,7 \pm 0,08 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$ pour (CH/HA)₁₀. La nature des polyélectrolytes constituant la multicouche ne semble modifier que légèrement l'adsorption initiale des complexes.

2.2 Stabilité des complexes au cours du temps :

La capacité de transfection *in vitro* et *in vivo* est fortement liée à la quantité d'ADN utilisée quelque soit le vecteur. La quantité d'ADN effectivement déposée au niveau d'une seule couche de complexe a donc été quantifiée. La quantité semblant relativement faible, nous avons décidé d'utiliser une technique de dosage par mesure de la fluorescence en utilisant un ADN plasmidique (pEGFP-C1) marqué à la fluorescéine. Le dosage a été effectué sur l'ADN adsorbé à la surface des multicouches. La mesure se faisant en milieu liquide, le dosage a été réalisé après dissolution de la multicouche dans un tampon NaCl 5M et contrôle de celle-ci par ellipsométrie.

Après dépôt des complexes (N/P = 12) en surface de la multicouche, la quantité d'ADN déposée est d'environ 30 ng/cm² (fig.3-10), calculée à partir d'une courbe étalon établie dans les mêmes conditions (5M NaCl) par mesure de la fluorescence de quantités définies d'ADN^{FITC} complexé. Les valeurs sont sensiblement les mêmes pour les deux types d'architecture testées (PLL/PGA)₆ et (CHI/HA)₁₀. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en microscopie confocale.

Dans un deuxième temps nous avons évalué la stabilité des complexes adsorbés sur ces surfaces en fonction du temps. Des multicouches de type (PLL/PGA)₆PLX et (CHI/HA)₁₀PLX ont donc été incubées pendant des temps variables dans un milieu de culture complet (RPMI1640 + 10 % sérum de veau fœtal) avant d'être soumises à un dosage de l'ADN. Il apparaît que la quantité d'ADN sur des multicouches de type (PLL/PGA)₆ reste constante au cours du temps pendant les 6 jours observés. Par contre la quantité d'ADN varie sur des films de type (CHI/HA)₁₀. On observe une chute de l'ordre de 50 % de la quantité d'ADN dans les deux premiers jours. Par la suite la quantité reste constante (fig.3-10).

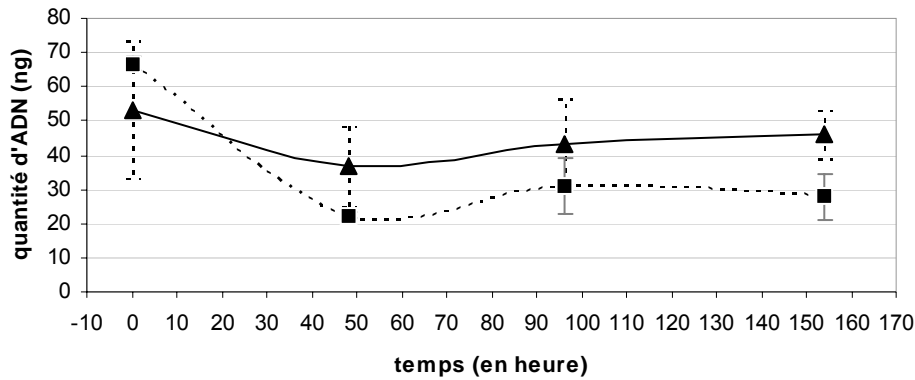


Figure 3-10 : Dosage de la quantité d'ADN_p présent à la surface des films au cours du temps (▲) film de type (PLL/PGA)₆PLX (■) film de type (CH/HA)₁₀PLX

Cette différence de stabilité est-elle due à une libération des complexes ou bien à une différence de comportement de la multicouche en présence de milieu de culture ? Afin de répondre à cette question une étude en microscopie confocale a été réalisée sur des multicouches de type (CHI/HA)₂₀. Ces multicouches ont été construites avec du chitosan marqué à la FITC (CHI^{FITC}). Ces multicouches ont été incubées dans du milieu de culture pendant des temps variables puis observées en microscopie confocale pour évaluer leur morphologie.

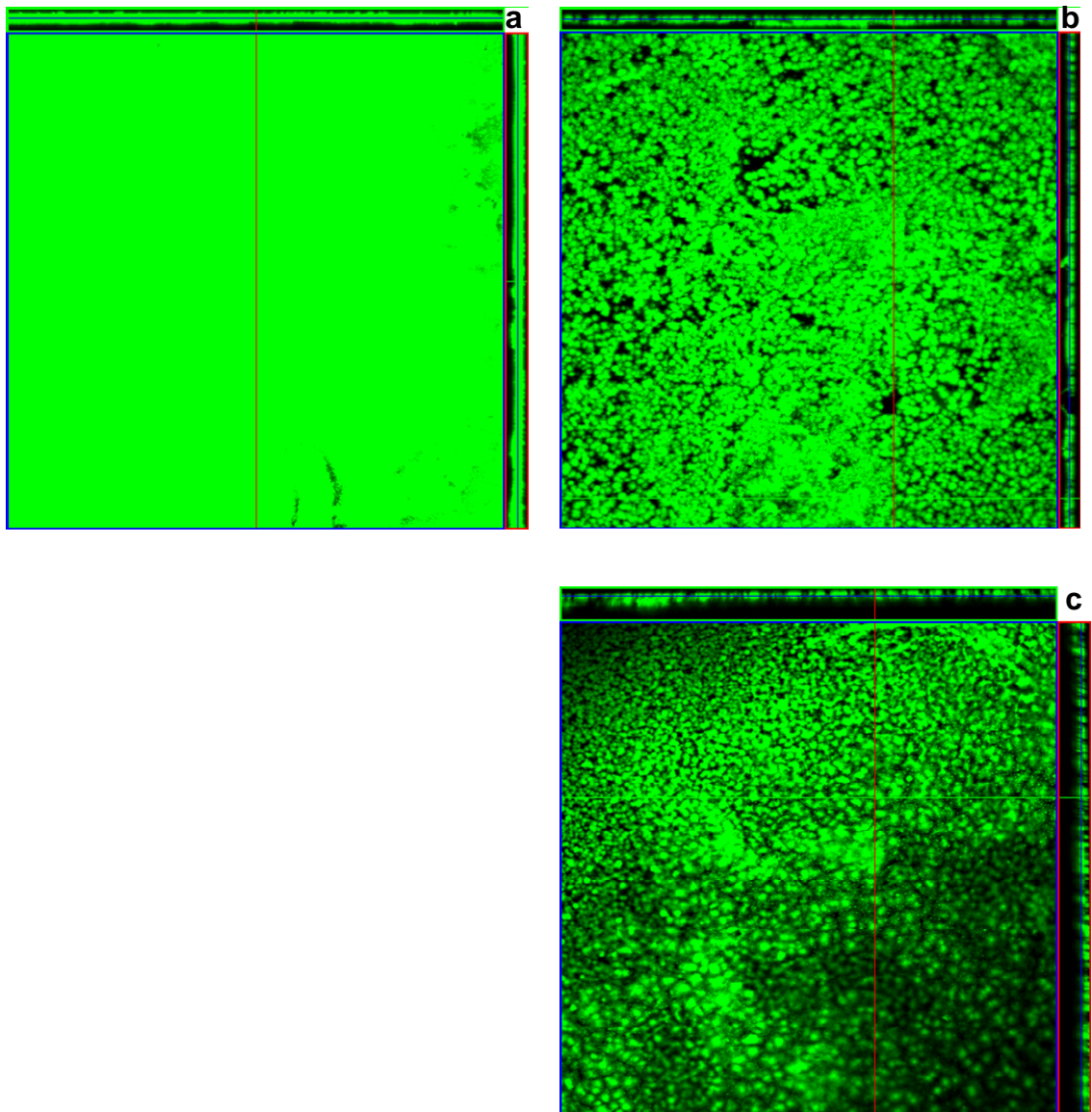


Figure 3-11 : Film de type (CHI/HA)₂₀ en microscopie confocale
(A) Film dans un tampon NaCl 0,15 M + Hepes 20 mM
(B) Film dans un milieu de culture complet (30 min)
(C) Film dans du PBS (2 heures)

Il apparaît que dès trente minutes, la multicouche change de structure et ne constitue plus un film homogène (fig.3-11b). Le même type de phénomène est observé avec des multicouches en présence de PBS (fig.3-11c). Il apparaît donc que ce ne soit pas la présence de sérum qui soit à l'origine de ce phénomène mais le taux de sel ou le pH. En effet les multicouches de type (CHI/HA)_n ne peuvent être construites qu'à un pH inférieur à 6 en raison du pKa du chitosane. Néanmoins une fois la multicouche formée, le pH peut être réajusté à un pH physiologique (7,4) sans entraîner de changement visible de la structure du

film (fig.3-11a). Il apparaît donc que ce sont les conditions de salinité du milieu qui soient à l'origine du manque de stabilité de l'architecture. Des multicouches de type (PLL/PGA)_n sont elles plus stables dans un milieu de culture.

A partir des images de microscopie confocale, nous avons pu déterminer qu'environ 60 % de la surface reste recouverte du film (CHI/HA)₂₀ après 2h d'incubation dans le milieu de culture. L'adsorption des complexes étant homogène et aléatoire, leur quantité sur le film est dépendante de la surface exposée. Les variations de la quantité d'ADN adsorbé sur une multicouche de type (CHI/HA)_n sembleraient donc plutôt provenir de la destabilisation de la multicouche.

2.3 Etude de la structure des films par microscopie à force atomique :

La morphologie des complexes de PEI/pEGFP-C1 a été étudiée par microscopie à force atomique. Deux paramètres ont été observés : la variation de morphologie en fonction du rapport N/P utilisé pour former les complexes et la variation de morphologie des complexes en fonction du type de film utilisé comme substrat.

Des complexes formés à des N/P variants de 5 à 15 ont été adsorbés sur une multicouche de type (PLL/PGA)₆ figure 3-12. Les complexes apparaissent sous forme de structures d'aspect sphéroïde. Le seul changement morphologique qu'on puisse observer est la diminution de taille de ces architectures avec l'augmentation du rapport N/P. En effet la taille des complexes a été évaluée, sur un panel de 30 polyplexes, pour des complexes de N/P = 5, 8, 12, 15, à 628 ±20, 489 ±30, 408 ±30 et 366 ±30 nm respectivement. La différence de taille calculée par rapport à celle évaluée par DLS peut être expliquée par la dessiccation des échantillons. L'ADN complexé avec un polyélectrolyte prend des formes diverses. En effet il est décrit classiquement sous trois formes : architecture toroïde, forme de bâtonnet et enfin forme sphérique. L'évolution de la forme des complexes semble être liée au degré de complexation de l'ADN (Golan et al., 1999). Les formes sphéroïdes, globulaires, se forment lors d'interactions fortes entre le polymère et l'ADN à des N/P élevés. Le même type d'architecture a été observé en AFM sur des complexes de chitosane/ADN (Liu W et al., 2005), de PLL/ADN (Trubetskoy et al., 1999) et de PEI/ADN (Brus et al., 2004).

La morphologie des complexes adsorbés sur des multicouches de type (CHI/HA)₁₀ et (PAH/PSS)₆ a été également analysées par AFM afin de connaître l'influence éventuelle du substrat (figure 3-13). Les complexes gardent un morphologie sphéroïde quelque soit le

support sur lequel ils sont adsorbés. La taille des complexes reste dans la même fourchette de taille que celle calculée sur les multicouches de type (PLL/PGA)₆. Le substrat d'adsorption des complexes ne modifie pas les caractéristiques morphologiques des complexes.

Il est également intéressant de noter que la distribution des complexes est inhomogène et qu'aucun agrégat n'a pu être observé.

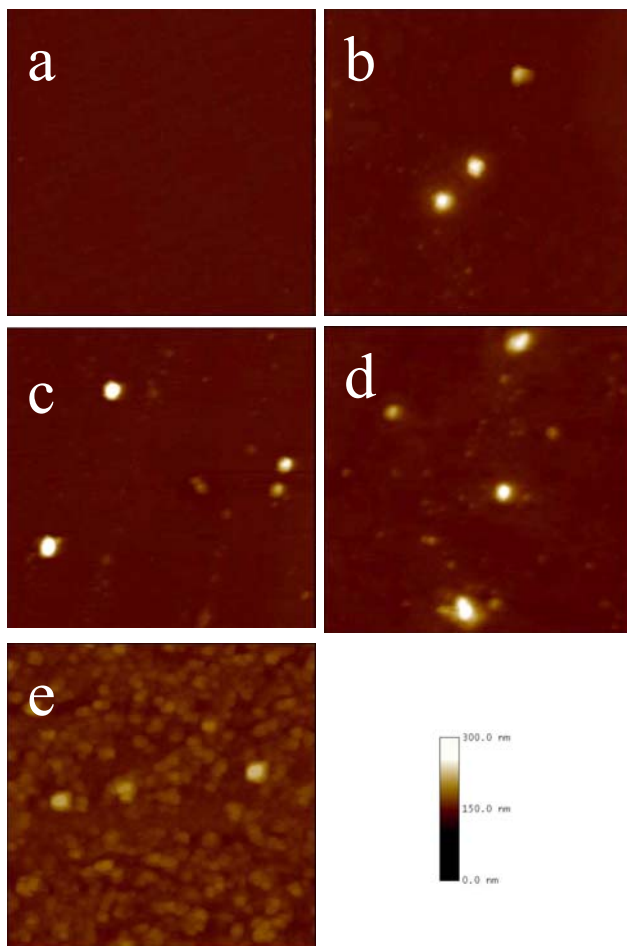
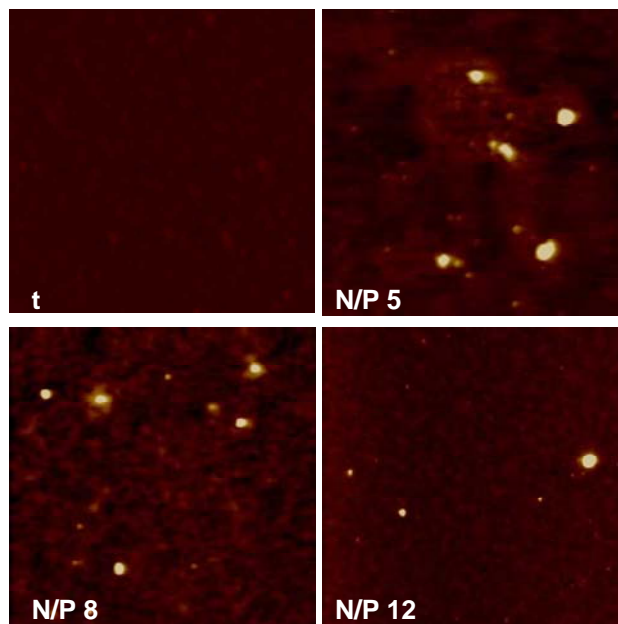


Figure 3-12 : Images en microscopie à force atomique de films de type (PLL/PGA)₆PLX. La figure (a) montre la surface de référence (PLL/PGA)₆. Les figures (b) à (e) représentent des architectures de type (PLL/PGA)₆PLX dont les complexes ont été formés à N/P variable, respectivement : 5, 8, 12, 15. (image 5 x 5 μm)

(A) (CHI/HA)₁₀PLX



(B) (PAH/PSS)₆PLX

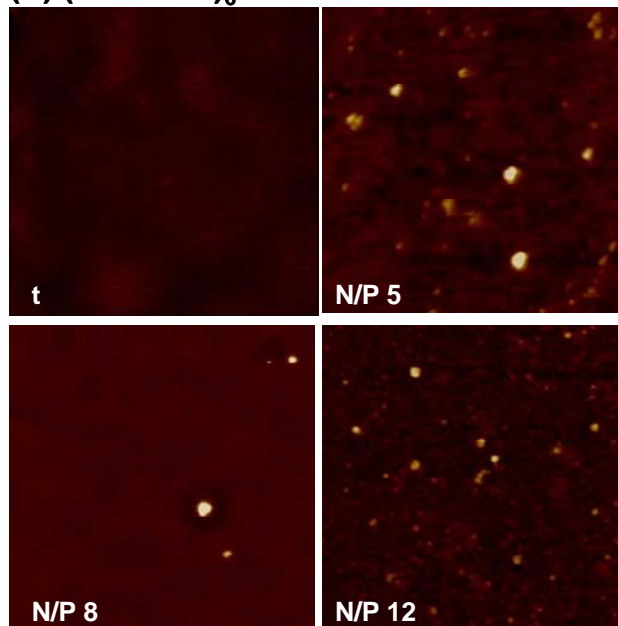


figure 3-13 : Images en microscopie à force atomique de films de type (CHI/HA)₁₀PLX (A) et (PAH/PSS)₆PLX (B). Pour chaque type de surface les films ont été réalisés avec des complexes formés à un N/P variable et comparés à la surface sans complexes (t).

3 Caractéristiques de transfection d'architectures de type (polycation/polyanion)_n(PEI/ADN_p)

Le pouvoir de transfection de complexes (PEI/ADN) adsorbés sur différents types de multicouches, (PLL/PGA)_n, (CHI/HA)_n et (PAH/PSS)_n, a été étudié pour déterminer le meilleur protocole d'adsorption des complexes. L'étude a été menée sur différents types cellulaires afin de montrer la généralisation possible du système.

3.1 Caractérisation des conditions de transfection :

Différents paramètres sont à prendre en compte pour déterminer les conditions optimales de transfection quelque soit le système utilisé. Ces paramètres sont ceux qui vont influencer les caractéristiques physico-chimiques des complexes à savoir le N/P et le taux de sel dans le milieu. La quantité d'ADN apportée aux cellules est également un facteur limitant dans le cadre de l'utilisation du PEI comme vecteur car la quantité de PEI présente au contact des cellules est proportionnelle à la quantité d'ADN et la toxicité du PEI est dose-dépendante.

Notre propos est de cerner les conditions optimales de transfection avec des complexes adsorbés sur des multicouches. Il faut donc dissocier l'effet de la multicouche sur les cellules de celui des complexes. L'étude a été menée sur des multicouches de type (PAH/PSS)₆. Des mélanocytes de type B16-F1 ont été utilisés comme modèle cellulaire. Le choix de l'architecture est issu de la relative compatibilité de celle-ci vis à vis des cellules cultivées à son contact par rapport aux autres multicouches. En effet des tests de viabilité cellulaire à la phosphatase acide montrent que les cellules prolifèrent de la même manière que sur un substrat de culture de référence, ce qui n'est pas le cas pour les autres types de multicouches.

Dans un premier temps nous avons déterminé la quantité d'ADN optimale à utiliser lors du processus d'adsorption des complexes. Pour cela au cours de la phase d'adsorption des complexes sur la multicouche, des quantités variables d'ADN_p (pEGFP-C1) ont été utilisées. Le temps d'adsorption (1 heure) et le N/P (12) n'ont pas été modifiés. Il apparaît, comme nous pouvons le voir sur la figure 12, que le taux de transfection après 24h de culture augmente avec la quantité d'ADN_p jusqu'à une quantité de 1 µg (puis celui-ci tend légèrement à diminuer jusqu'à 2 µg). Les résultats présentés ici sont normalisés en fonction de la quantité de protéines, la quantité de protéine étant proportionnelle au nombre de cellules. On peut en déduire que l'adsorption des complexes sur ce type de multicouche est dose-dépendante et atteint un plateau à 1 µg.

La variation du ratio de PEI/ADN_p (décrit par le rapport N/P) entraîne des variations de taille et de charge des complexes. 1 µg d'ADN_p a été adsorbé sur une multicouche après complexation selon un N/P variant de 5 à 20. Le taux de transfection augmente jusqu'à N/P = 12 puis atteint un plateau (figure 3-13). Le même type de variation a pu être observé avec des complexes de PEI linéaire en solution.

La concentration en sel dans le milieu au cours de la formation des complexes faisant varier leur taille, et les complexes de petites taille étant en général mieux internalisés par les cellules que les gros complexes (Goncalves *et al.*, 2004), nous avons estimé la capacité de transfection de complexes (PEI/ADN_p) formés à une concentration en NaCl de 10 mM et de 150 mM en solution et sur des multicouches. Lorsque les complexes sont formés à une concentration en sel de 10 mM, le taux de transfection chute drastiquement que cela soit en solution ou lorsque les complexes sont adsorbés sur une multicouche.

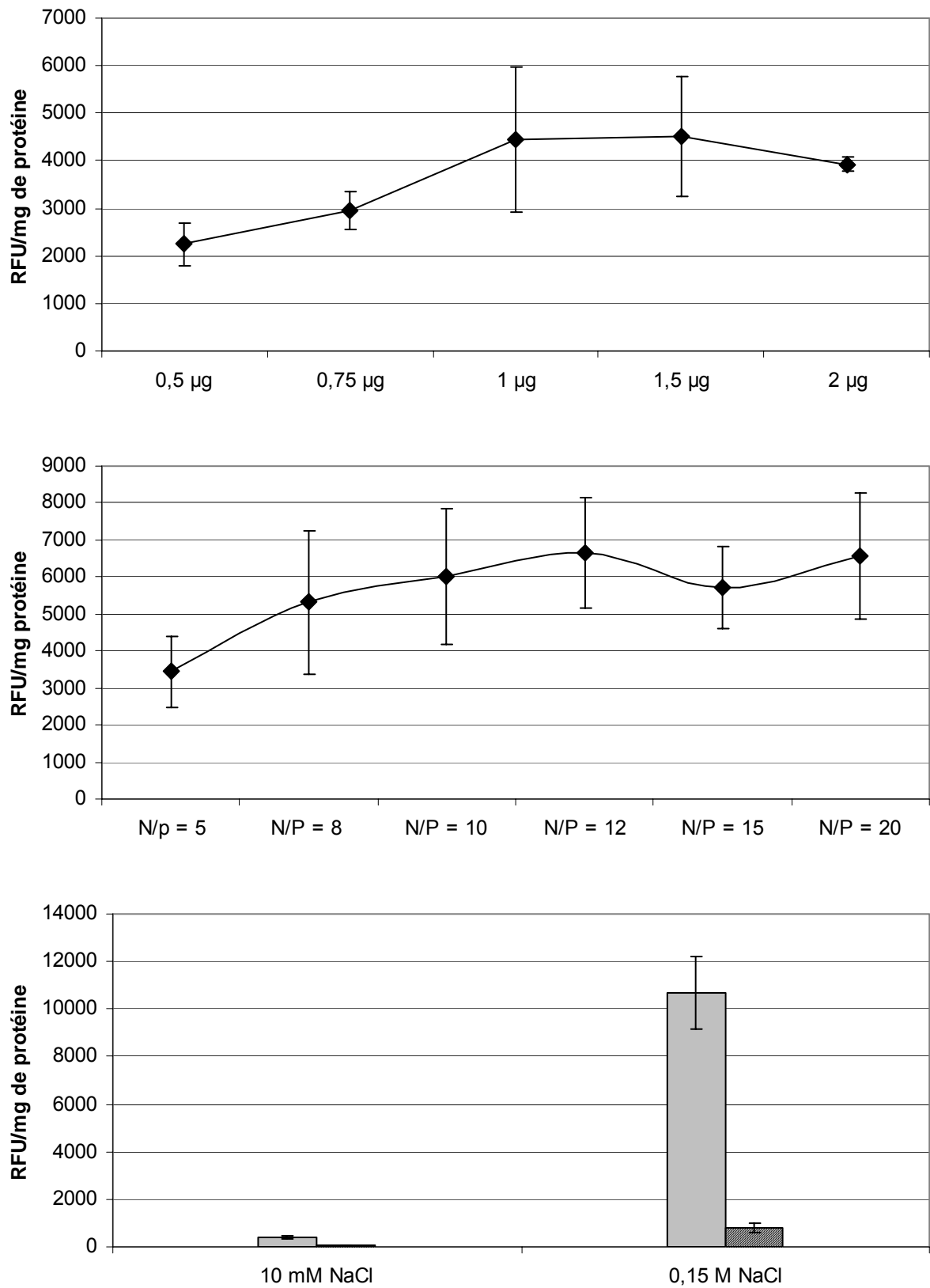


Figure 3-14 : Variations de l'efficacité de transfection par des complexes de (PEI/ADN_p) adsorbés sur des multicouches de type (PAH/PSS)₆ en fonction de la quantité d'ADN, du N/P et de la concentration en NaCl (barres pleines : complexes en solution, barres hachurées : complexes adsorbés).

Les conditions optimales de transfection sont donc obtenues lorsque les complexes sont formés en présence de 150 mM NaCl à N/P = 12 et pour une quantité d'ADN de 0,5 µg/cm².

3.2 Influence du type de multicouche

L'utilisation de multicouches de polyélectrolytes comme vecteur de transfection fait intervenir deux éléments, les complexes et la multicouche, qui auront des répercussions sur le comportement cellulaire et donc également sur la capacité de transfection du système. Précédemment, nous avons objectivé l'influence des complexes et déterminé les conditions optimales de transfection avec des complexes adsorbés. Les paramètres ainsi dégagés vont être utilisés pour comparer l'influence du type de multicouche sur le taux de transfection.

Des cellules hépatiques de type Huh-7 ont été cultivées pendant 24 heures sur des architectures de type (CHI/HA)₁₀PLX, (PLL/PGA)₆PLX, (PLL/HA)₆PLX et (PAH/PSS)₆PLX, les complexes (PLX) étant formés à N/P = 12 avec le plasmide pIV1066 (cf mat et met 1.2). Après 24h le taux de transfection a été évalué par mesure du niveau d'expression de la luciférase (fig. 3-15). Les valeurs obtenues ont été normalisées en fonction des résultats de prolifération cellulaire déterminée par l'activité de la phosphatase acide

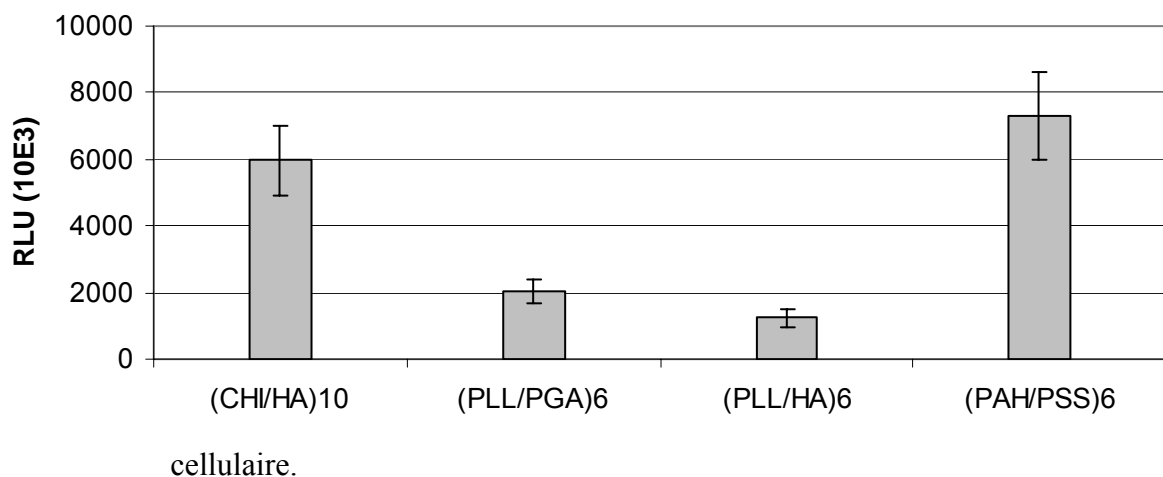


Figure 3-15 : Comparaison de l'efficacité de transfection de complexes (PEI/pIV1066) adsorbés sur différents types de multicouches. Des cellules hépatiques de type (Huh-7) ont été cultivées 24 h sur ces différentes architectures. L'efficacité de transfection est mesurée par l'activité de la luciférase (gène rapporteur du plasmide pIV1066).

Le taux de transfection est variable en fonction du type de multicouche étudié. L'influence du type de multicouche peut être mis en relation avec l'influence de celles-ci sur la physiologie cellulaire ou sur la stabilité des complexes. A ce sujet, il est intéressant de noter que le taux de transfection de multicouches de type (PLL/PGA)₆PLX est trois fois moins important que celui de multicouches de type (CHI/HA)₁₀PLX. Or la quantité de plasmide déposée est sensiblement la même sur ces deux architectures (cf 2.2). Les multicouches de type (CHI/HA)₁₀ sont moins stables dans le temps et libèrent des complexes au cours du temps. Cette libération est rapide et intervient dans les premières heures. La différence d'activité observée pourrait donc être due à la combinaison de deux modèles *i.e* une transfection en phase solide à partir des complexes adsorbés sur la multicouche et une transfection en solution à partir des complexes libérés dans l'environnement cellulaire par destabilisation de la multicouche.

Les multicouches de type (PAH/PSS)₆ sont stables dans le temps et n'entraînent pas la libération des complexes. Leur taux de transfection est néanmoins plus important que celui des multicouches de type (PLL/PGA)₆. La nature des polyélectrolytes influence l'efficacité de la transfection.

3.3 Capacité de transfection des architectures (polycation/polyanion)_npolyplexes :

3.3.1 Evaluation du taux de transfection pour différents types cellulaires :

L'évaluation de l'efficacité de transfection de complexes (PEI/ADN_p) adsorbés sur différents types d'architecture a été réalisée par cytométrie en flux. Les complexes ont été préparés avec pEGFP-C1. Les cellules transfectées peuvent être discriminées par évaluation de leur niveau de fluorescence par cytométrie en flux. Le but de cette évaluation est de montrer que les complexes adsorbés gardent un pouvoir de transfection, que le système est applicable à toutes les multicouches étudiées et que différents types cellulaires peuvent être ciblés.

La quantification a donc été réalisée sur trois types d'architecture (PLL/PGA)₆PLX, (CHI/HA)₁₀PLX et (PAH/PSS)₆PLX et plusieurs types cellulaires : Thp-1, NIH 3T3, Huh-7 et B16-F1. Comme nous pouvons le voir figure 3-15A, la transfection de différents types

cellulaires sur différents types d'architecture est possible. Ce système peut donc être choisi en fonction des applications requises et notamment du type cellulaire à transfecter. Ainsi par exemple les fibroblastes NIH 3T3 ne peuvent être cultivés sur un film de type (PLL/PGA)₆, car ils n'adhèrent pas au substrat et de ce fait meurent rapidement. Après un temps court d'exposition (24h) on peut remarquer que les taux de transfection sont plus faibles que ceux observés en solution à l'exception des cellules de type Thp-1 où quelque soit le système employé le taux, très faible, est proche de 2%. Ceci cependant suggère que l'adhésion à la multicouche n'est pas nécessaire puisque ces cellules ne reposent sur le substrat que par sédimentation. Il faut noter que lors de la transfection en solution 1 µg d'ADN sont utilisés. La quantité d'ADN en solution est donc 20 fois supérieure à celle adsorbée à la surface d'une multicouche.

A

Type cellulaire	Solution	(PLL/PGA) ₆	(CHI/HA) ₁₀	(PAH/PSS) ₆
NIH 3T3	22 ± 1,5 %	Nd	5,26 ± 0,4 %	1,6 ± 0,15 %
Thp-1	1,83 ± 0,2 %	1,97 ± 0,62 %	nd	< 1 %
Huh-7	45,8 ± 2,49 %	Nd	nd	< 1 %
B16-F1	nd	Nd	nd	2 ± 0,5 %

B

temps de contact	24 heures	96 heures
	Huh-7	< 1 %
B16-F1	2 ± 0,5 %	20 ± 1,2 %

Figure 3-16 : (A) Taux de transfection de différents systèmes en fonction du type cellulaire étudié après 24 heures de culture sur les différents types de multicouches fonctionnalisées avec des complexes (PEI/pEGFP-C1 N/P = 12). Pour la transfection en solution, les cellules ont été incubées 4 heures avec 1 µg de plasmide complexé à N/P = 12 puis cultivées 24 heures avant l'analyse.

(B) Evolution du taux de transfection en fonction du temps de contact avec les multicouches.

La capacité de transfection varie d'un système à un autre pour une cellule donnée et cette variation n'est pas comparable entre deux types cellulaires. En effet pour les cellules de type NIH 3T3, le pourcentage de cellule transfectée est nettement supérieur avec un système de type (CHI/HA)₁₀ alors que pour les cellules de type Huh-7, le système (CHI/HA)₁₀ est équivalent au système (PAH/PSS)₆ (cf figure 3-15). Ceci démontre que le type de

multicouche influence le comportement cellulaire. Le choix d'un système doit donc être dicté par le type cellulaire ciblé afin d'obtenir une efficacité maximale.

Quelque soit le type cellulaire étudié on remarque que le taux de transfection augmente avec le temps de contact (figure 3-16B). Ainsi pour des cellules de type B16-F1, le nombre de cellules transfectées sur une surface de type (PAH/PSS)₆ passe de 2 % après deux jours de culture à près de 20 % après 4 jours. Pour des cellules de type Huh-7, le pourcentage de cellules transfectées passe de 1 à 11,5 % après 4 jours de culture.

La faible toxicité du système permet de prolonger le temps de contact des cellules et la durée de disponibilité de l'ADN, ce qui n'est pas le cas en solution. Dans ces conditions, après des temps de contact longs, le système présente une efficacité significative.

3.3.2 Optimisation du taux de transfection

Comme nous l'avons vu précédemment la quantité d'ADN déposée à chaque couche est faible. Or pour de nombreux systèmes y compris ceux utilisant du PEI comme vecteur, l'efficacité de transfection est directement reliée à la quantité d'ADN apportée aux cellules. Nous avons donc testé l'inclusion de plusieurs couches de polyplexes dans l'architecture de la multicouche.

3.3.2.1 Transfection en présence de polyanions

L'adsorption séquentielle de polyplexes à différents niveaux de l'architecture nécessite au cours du processus de construction de la multicouche d'adsorber systématiquement à la surface des complexes une couche de polyanion. Or les polyanions sont susceptibles d'interagir avec les complexes. Nous avons donc évalué qualitativement dans un premier temps le pouvoir de transfection de trois types de multicouches : (PAH/PSS)₆(PLX/HA) ; (PAH/PSS)₆(PLX/PGA) et (PAH/PSS)₆(PLX/PSS). Comme nous pouvons le voir dans la figure 3-17, les architectures (PAH/PSS)₆(PLX/PGA) et (PAH/PSS)₆(PLX/PSS) ont un taux de transfection nul alors que les cellules cultivées sur une surface de type (PAH/PSS)₆(PLX/HA) sont transfectées.

Le taux de transfection de ces dernières a donc été comparé à celui d'une multicouche de type (PAH/PSS)₆PLX par mesure de fluorescence sur des cellules de type B16-F1 transfectées avec le plasmide pEGFP-C1. Des valeurs équivalentes de fluorescence ont été obtenues pour les deux types de construction ($\approx 10 \pm 1,5$ RFU/ μ g de protéine). Le HA

adsorbé à la surface des complexes n'inhibe pas la transfection. Ce polyanion peut donc être utilisé pour la construction de multicouches incluant séquentiellement plusieurs couches de polyplexes dans un environnement moléculaire susceptible de déplacer les complexes.

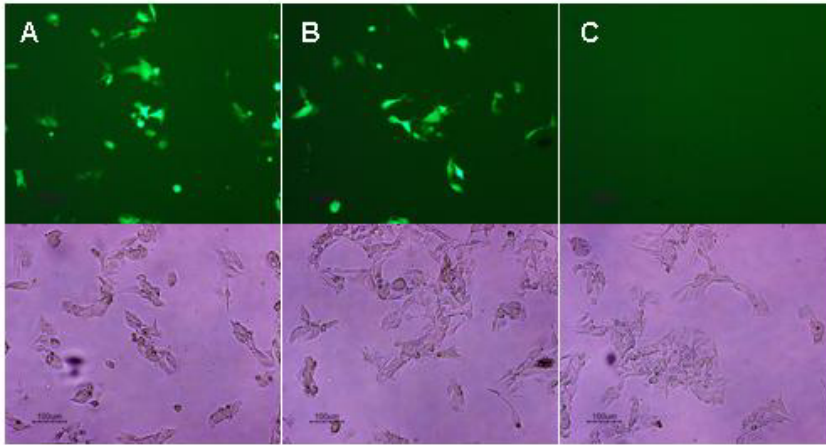


Figure 3-17 : Observation en microscopie à épifluorescence de cellules de type B16-F1 cultivées sur des films multicouche de polyélectrolytes fonctionnalisés avec des polyplexes (N/P = 12).

(A) (PAH/PSS)₆PLX

(B) (PAH/PSS)₆(PLX/HA)

(C) (PAH/PSS)₆(PLX/PGA)

3.3.2.2 Transfection en fonction du nombre de couche de complexe :

L'adsorption séquentielle de plusieurs couches de polyplexes a été réalisée sur une surface de type (PAH/PSS)₆ en utilisant les propriétés du HA pour permettre la construction de l'architecture. Des multicouches de type

(PAH/PSS)₆(PLX/HA)[(CHI/HA)PLX(HA/CHI)HA]_n ont été réalisées. Des cellules de type Huh-7 ont été cultivées sur ces surfaces avant d'être analysées par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules transfectées.

Après quatre jours de culture, le pourcentage de cellules transfectées est de 11,5 % pour n = 0, de 14,3 % pour n = 1 et de 15,7 % pour n = 2. L'efficacité de transfection augmente avec le nombre de couche et donc la quantité d'ADN déposé. Dans ce cas l'utilisation de bicouche (CHI/HA) induit vraisemblablement une destabilisation et une libération dans le milieu d'une partie des polyplexes. Ce phénomène contribue vraisemblablement à l'augmentation de la quantité de cellules transfectées.

3.3.3 Amélioration des propriétés d'adhésion cellulaire de films multicouche de type (PLL/PGA)_nPLX par utilisation de mannose couplé au PGA.

Un type de multicouche donné ne constitue pas un substrat d'adhésion cellulaire universel *in vitro*. En présence de polyplexes en surface, les cellules de type 3T3 n'adhèrent pas sur une multicouche de type (PLL/PGA)₆ et meurent rapidement (fig. 3-18a). Mais ces cellules prolifèrent sur des surfaces de type (CHI/HA)_n, qui sont constituées de polysaccharides naturels, même en présence de polyplexes. L'adhésion peut donc en partie être médiée par des interactions dépendantes des lectines. Nous avons donc testé l'utilisation du mannose afin d'augmenter l'adhésion de ces cellules sur des multicouches de type (PLL/PGA)_nPLX. Pour cela des résidus mannose ont été greffés sur PGA (cf mat & met).

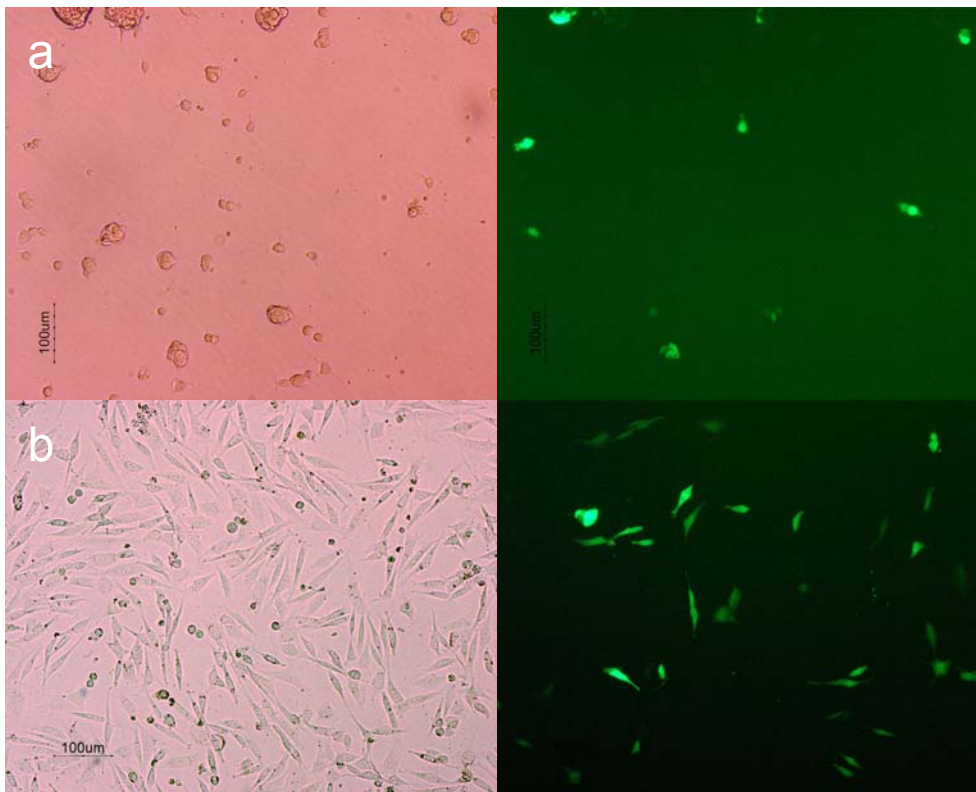


Figure 3-18 : Transfection de cellules de type NIH 3T3 par des multicouches fonctionnalisées. Des cellules de type NIH 3T3 ont été cultivées sur des architectures de type (PLL/PGA)₆PLX et (PLL/PGA)₅(PLL/PGA_{mannose})PLX. Après 24 heures de culture les cellules ont été observées par microscopie à contraste de phase pour déterminer leur morphologie et par microscopie à épifluorescence pour observer les cellules transfectées par le plasmide pEGFP-C1. Les cellules cultivées sur une architecture sans mannose (a) n'adhèrent pas à la surface alors que les cellules transfectées à partir d'une architecture contenant du mannose adhèrent et conservent une morphologie classique de fibroblaste (b).

Le polyélectrolyte modifié a été adsorbé à la surface d'une architecture de type (PLL/PGA)₅PLL. Puis des complexes (PEI/pEGFP-C1) ont été adsorbés sur ces architectures. La construction a été suivie par spectroscopie par guide d'onde optique figure 3-19.

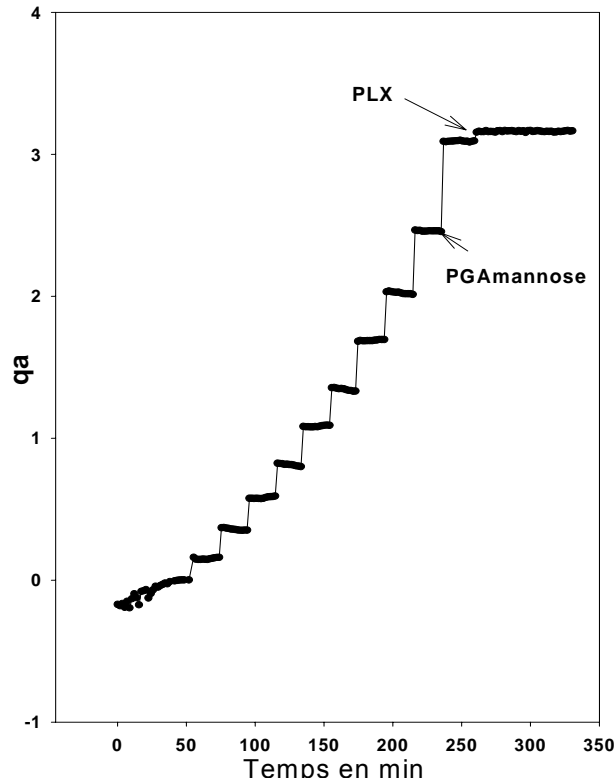


Figure 3-19 : Evolution de la masse optique déterminée en OWLS d'un film de type (PLL/PGA)₅(PLL/PGAmannose)PLX (PLX = (PEI/pEGFP-C1), N/P = 12)

Après 24 heures de culture sur cette architecture, les cellules de type NIH 3T3 sont adhérentes et présentent une morphologie caractéristique de fibroblaste figure 3-18b. Ceci démontre une bonne biocompatibilité de la surface. Le même type d'observation a pu également être réalisé avec des cellules de type CHO. Le mécanisme sous jacent n'est pas déterminé pour le moment. Ces cellules ne possèdent pas de récepteur spécifique au mannose. Ce sont donc certainement des liaisons non spécifiques du mannose avec des composés de la membrane plasmique qui permettent l'adhérence des cellules. Ce phénomène doit être couplé à un masquage de la multicouche sous jacente par les résidus mannose.

L'efficacité de transfection des architectures contenant du mannose a été évaluée par cytométrie en flux. Après 24 heures de culture, $3,4 \pm 1,022$ % de cellules NIH 3T3 et $3,16 \pm 0,41$ % de CHO sont transfectées.

4 Cytotoxicité liées aux complexes adsorbés sur une multicouche de polyelectrolyte :

Le PEI est un polymère toxique pour les cellules eucaryotes. Sa toxicité est lié à deux phénomènes : il déstabilise les membranes et provoque l'apoptose médiée par les mitochondries. C'est pourquoi au cours de protocoles classiques de transfection en phase liquide les cellules ne sont en contact avec les complexes que pendant un temps limité (quelques heures). Or dans notre protocole les cellules sont en contact étroit avec les complexes pendant plusieurs jours. Il est donc intéressant d'évaluer la cytotoxicité de ce protocole de transfection ainsi que les mécanismes afférents à celle-ci.

4.1 Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide

Dans un premier temps, des tests de prolifération cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide cellulaire ont été réalisés sur deux types cellulaires, des cellules hépatiques Huh-7 et des mélanocytes de type B16-F1. Ces cellules ont été cultivées sur deux substrats , un film (PAH/PSS)₆ et le même film fonctionnalisé par des polyplexes , (PAH/PSS)₆PLX afin de pouvoir dissocier l'action éventuelle de la multicouche.

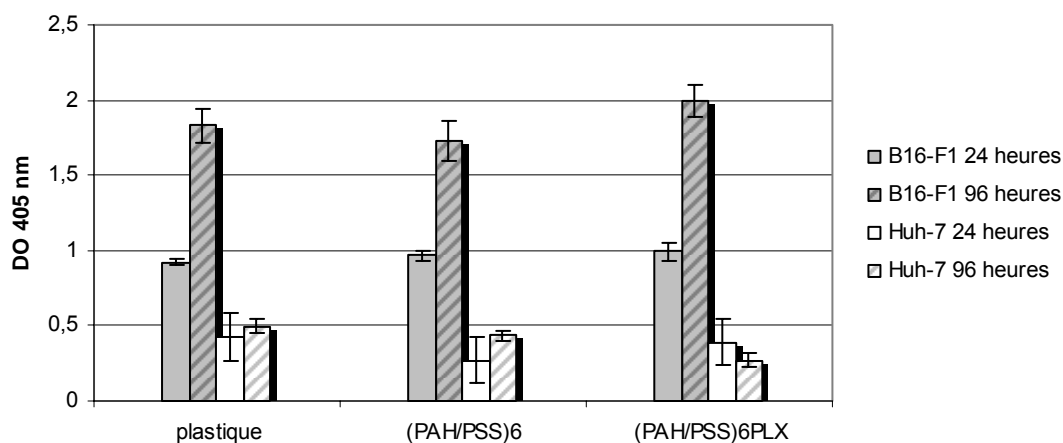


Figure 3-20 : Mesure de l'activité de la phosphatase acide sur des cellules de type Huh-7 et B16-F1 cultivées sur (PAH/PSS)₆, (PAH/PSS)₆PLX et une surface cellulaire de référence (plastique). Les mesures ont été réalisées à 1 et 4 jours de culture.

La cytotoxicité de la multicouche fonctionnalisée ou non est variable en fonction du type cellulaire et est très limitée. Pour les cellules de type B16-F1 la prolifération cellulaire est la même quelque soit le substrat de culture utilisé et le temps de contact. Pour les cellules hépatiques de type Huh-7 à 24 h la prolifération des cellules sur la multicouche (PAH/PSS)₆,

n'atteint que 60 % de la prolifération des cellules cultivées sur la surface de référence. Les cellules cultivées sur la surface fonctionnalisée atteignent 90 % de prolifération. Ainsi à un 1 jour de contact, les surfaces fonctionnalisées présentent une très faible toxicité pour ces deux types cellulaires. Après 4 jours, la prolifération des cellules de type B16-F1 est la même quelque soit la surface étudiée. Pour les cellules de type Huh-7, les cellules cultivées sur un film (PAH/PSS)₆ prolifèrent jusqu'à 90 % du témoin alors que celles cultivées sur un film fonctionnalisé ne prolifèrent qu'à 70 % par rapport au témoin de culture ce qui suggère qu'à long terme, la toxicité des multicouches fonctionnalisées est susceptible d'évoluer.

4.2 Mécanismes liés à la cytotoxicité de ces architectures :

Il existe deux mécanismes qui expliquent la toxicité du PEI : son action sur les membranes lipidiques et l'induction de l'apoptose par voie mitochondriale. La destabilisation membranaire engendrée par le PEI est variable en fonction du poids moléculaire. Les PEIs de faible poids moléculaire sont moins toxiques (Kunath *et al.*, 2003). Ce phénomène est lié à la longueur des chaînes et à la surface de contact de celles-ci avec les membranes. Cette toxicité est dépendante du temps de contact et de la dose. Or dans le système que nous étudions, les cellules restent au contact du PEI pendant 4 jours. Nous avons donc cherché à comparer ces deux phénomènes sur une population de cellules de type B16-F1, cultivée sur une période de 4 jours, sur (PAH/PSS)₆PLX, à une population cultivée sur une surface de référence. Deux types de démarche ont été suivis : objectiver la destabilisation membranaire par marquage au bromure d'éthidium et mettre en évidence l'apoptose par des expériences de fragmentation de l'ADN.

Le bromure d'éthidium est un agent intercalant fluorescent au contact de l'ADN. Il ne peut traverser les membranes plasmiques des cellules eucaryotes. Il peut donc être utilisé pour objectiver l'intégrité des membranes. Des cellules de type B16-F1 ont été cultivées pendant 4 jours sur (PAH/PSS)₆, (PAH/PSS)₆PLX et un substrat de culture cellulaire de référence. 10 min avant l'observation 10 µg/ml de BET ont été ajoutés au milieu de culture. Le nombre de cellules marquées par le BET a été quantifié. Il apparaît que quelle que soit la surface le nombre de cellules marquées par le BET est de 0,1 %. Le PEI adsorbé sous forme libre ou de complexe avec l'ADN ne semble pas avoir d'effets délétères sur les cellules cultivées sur des films fonctionnalisés.

L'apoptose se caractérise notamment par une fragmentation de l'ADN en fragments de petite taille (200 bp). Cette fragmentation peut être observée précocement par extraction de l'ADN nucléaire (Ioannou et al., 1996). Des cellules de type B16-F1 ont été cultivées pendant 1 et 4 jours sur (PAH/PSS)₆, (PAH/PSS)₆PLX et une surface de culture cellulaire de référence. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée sur chacune des populations cellulaires. L'ADN génomique a été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Après un jour de culture on peut observer dans toutes les populations cellulaires une fragmentation d'ADN (fig.3-19). Il n'y a pas de différence significative entre les trois surfaces étudiées. Ce dernier résultat montre que les différences de prolifération cellulaire observées par les tests d'activité de la phosphatase acide peuvent être reliés pour une part à une toxicité cellulaire mais surtout à un ralentissement du cycle cellulaire.

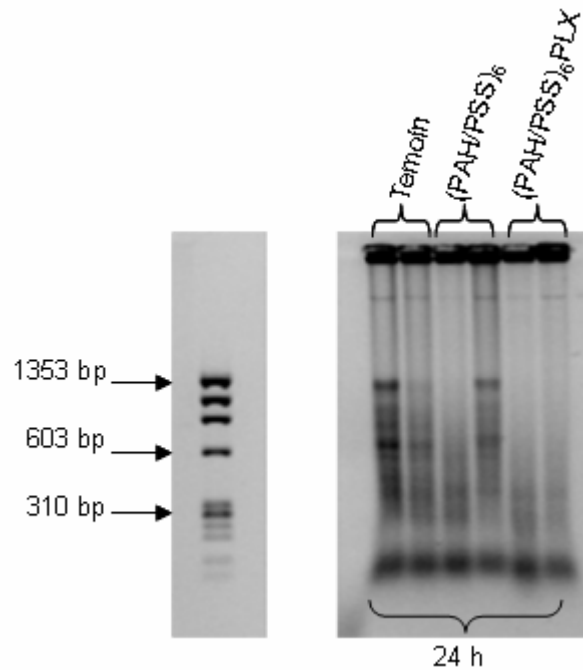


Figure 3-21 : Analyse de l'ADN génomique de cellules de type B16-F1 cultivées sur différentes surfaces par électrophorèse en gel d'agarose.

5 Endocytose des polyplexes adsorbés sur une multicouche de polyelectrolyte :

L'endocytose est *in vitro*, la première barrière au processus de transfection. Plusieurs études ont montré que des complexes liés de manière covalente à leur substrat peuvent être

endocytés par les cellules. Les hypothèses liées à ce phénomène sont soit la dégradation du substrat soit la dégradation de la liaison entre le vecteur et le ligand. Dans notre cas la liaison avec le substrat est électrostatique. L'endocytose efficace est démontrée par la transfection des cellules cultivées au contact du substrat. Néanmoins dans le cadre de l'optimisation de notre approche, il est important de connaître les voies d'endocytose spécifiques employées par les complexes.

5.1 Influence des multicouches sur l'endocytose :

Les multicouches ont-elles un effet sur l'endocytose des complexes et par voie de conséquence sur l'efficacité du processus de transfection ?

Prasad et al. (2005) ont montré que, dans le cadre de transfection en solution par des lipoplexes, l'activité d'endocytose peut être directement liée à l'efficacité de transfection. Pour ces auteurs cette corrélation explique en partie la différence d'efficacité de transfection entre différentes lignées cellulaires.

Une modification de l'activité d'endocytose peut donc être à l'origine d'une modification de l'activité de transfection. Partant de ce principe nous avons quantifié l'activité d'endocytose en phase liquide selon un protocole décrit par Li et Stahl (1993). L'activité d'endocytose est mesurée par la quantité de protéine endocytée en un temps donné. Une protéine de référence, la "horse radish peroxidase" (HRP), dont le taux est facilement mesurable a été utilisée dans ce cas.

Des cellules de type B16-F1 ont été cultivées sur trois surfaces différentes : une surface de référence constituée par une surface classique de culture cellulaire ainsi que les multicouches (PAH/PSS)₆ et (PAH/PSS)₆PLX.

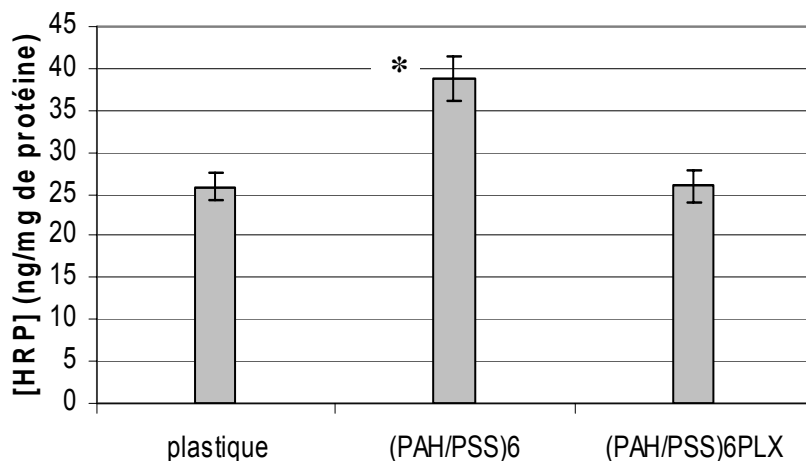


Figure 3-22 : Mesure de la quantité de HRP endocytée en deux heures par des cellules de type B16-F1 cultivées sur différents substrats. * $p < 0,05$

Les cellules cultivées sur (PAH/PSS)₆ présentent une activité d'endocytose plus importante (fig.3-22). La multicouche (PAH/PSS)₆ influence donc les cellules de type B16-F1 cultivées à son contact en particulier leur capacités d'endocytose. Les cellules cultivées sur la même surface fonctionnalisée par adsorption de complexes de type (PEI/ADN_p) ont une activité d'endocytose comparable à celle des cellules cultivées sur le substrat de référence..

5.2 Voie d'endocytose des complexes adsorbés sur une multicouche de polyélectrolyte :

La caractérisation des voies d'endocytose des complexes adsorbés en surface d'une multicouche (PAH/PSS)₆ a été réalisée par blocage spécifique des différentes voies au cours de la transfection. A ce titre ce ne sont que les voies fonctionnelles *i.e* menant à l'expression du transgène qui ont été explorées. Les agents chimiques permettant le blocage de l'endocytose étant toxiques lors d'une utilisation prolongée, nous avons dû modifier le protocole de transfection. Ainsi les cellules ne sont mises en contact que pendant 6h avec la multicouche, en présence ou non d'un agent de blocage, puis mises en culture dans des plaques 24 puits en absence de multicouche pendant 48h afin de permettre l'expression du transgène (fusion lacZ codant pour la luciférase). Le niveau d'expression du transgène est alors déterminé par mesure de l'activité de la luciférase.

Quatre agents chimiques différents ont été utilisés :

- La chlorpromazine (CP) qui inhibe les voies liées à la clathrine
- Le 5-(N,N-Diméthyl)amiloride (DMA) qui bloque la macropinocytose par inhibition des pompes Na⁺/H⁺
- La cytochalasine D (cyt D) qui provoque la dépolarisation des filaments d'actine qui touche les voies intracellulaires des compartiments acides (endosomes précoces)
- La wortmannin (W), inhibiteur de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) liée à la macropinocytose mais indépendante des voies de la clathrine.

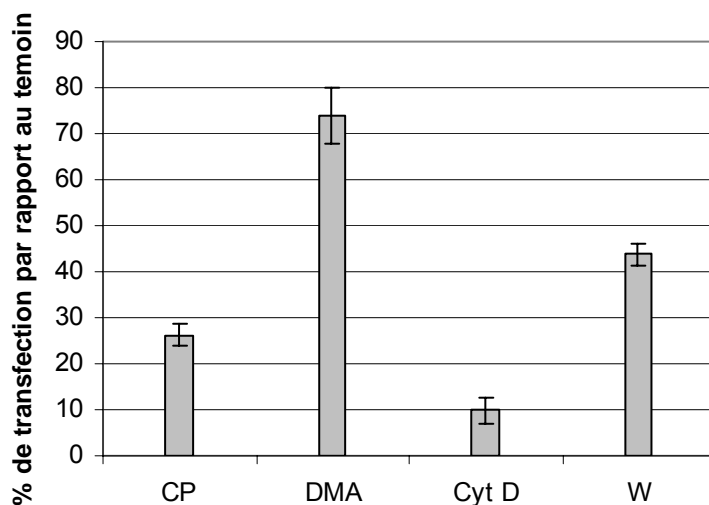


Figure 3-23 : Efficacité de la transfection par la multicouche (PAH/PSS)₆PLX sur des cellules de type B16-F1 en présence de différents inhibiteurs de l'endocytose. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité comparée à un témoin positif sans inhibiteur. (CP : chlorpromazine ; DMA : 5-(N,N-diméthyl)amiloride ; Cyt D : cytochalasine D ; W : wortmannin)

Les résultats présentés dans la fig.3-23 sont exprimés en pourcentage de transfection par rapport à une transfection sans agent de blocage.

Aucun agent de blocage n'entraîne une inhibition totale de la transfection. Il existe donc des voies secondaires qui peuvent être surexprimées. Le DMA n'inhibe qu'à 30 % la transfection. L'inhibition la plus forte est obtenue avec la cytochalasine D, mais cet agent chimique bloquant l'endocytose de manière générale, il sert de contrôle positif. L'inhibition la plus prononcée est en présence de chlorpromazine. Il semblerait donc que l'endocytose des complexes soit rattachée préférentiellement aux voies liées à la clathrine. Néanmoins l'inhibition de 50 % sous l'effet de la wortmannin montre que la macropinocytose intervient également. Mais il faut noter que les cellules répondent de manière variable à la wortmannin.

En complément à l'ensemble de ces agents chimiques, nous avons utilisé des agents bloquant les voies médiées par les "lipid rafts". Deux agents ont été utilisés, la filipin III et la methyl- β cyclodextrine. La filipin III s'est révélée toxique pour ce type cellulaire et n'a donc pas pu être utilisée pour des tests fonctionnels. En présence de methyl- β cyclodextrine, les cellules après 6h d'incubation n'adhèrent pas à la surface. Les résultats obtenus ne sont donc pas comparables au témoin puisqu'on ne peut dissocier l'effet de cet agent sur l'endocytose et l'effet de la non adhérence des cellules.

Il est intéressant de noter également que le DMSO ayant été utilisé comme solvant pour plusieurs agents chimiques, un contrôle positif a été réalisé en présence de DMSO seul dans le milieu. On observe une augmentation du taux de transfection de l'ordre de 10 %. Le DMSO perméabilise les membranes. Il semble donc qu'en dehors des processus d'endocytose, les complexes peuvent pénétrer dans la cellule par destabilisation locale de la membrane.

Les voies préférentielles d'endocytose des complexes adsorbés à la surface d'une multicouche (PAH/PSS)₆ sont, pour des cellules de type B16-F1 essentiellement les voies liées à la clathrine, mais il existe des voies secondaires pouvant être surexprimées.

6 Discussion :

Nous avons décrit dans ce chapitre une méthode de transfection médiée par le substrat basée sur l'utilisation de multicouches de polyélectrolytes. Ce type de transfection permet en principe d'augmenter l'efficacité de transfection en plaçant l'ADN sous forme de complexes directement dans le microenvironnement cellulaire. Ce type de stratégie a été développée sur des surfaces de polystyrène utilisées pour la culture cellulaire (Segura et al., 2002) et sur des membranes de PLGA avec différents types de complexes (PLL/ADN, PEI/ADN, CHI/ADN) (Shea et al., 1999). Différentes techniques d'immobilisation ont été utilisées : passive par interaction électrostatique ou dirigée par des liaisons streptavidine/biotine. Ces méthodes ont montré une efficacité au moins aussi importante que l'emploi des vecteurs en solution. Dans notre étude, trois surfaces modèles ont été utilisées, (PLL/PGA)_n, (PAH/PSS)_n et (CHI/HA)_n. Les complexes de PEI/ADN ont été adsorbés par interaction électrostatique. Tous les types cellulaires testés ont été transfectés après culture sur ces substrats même des cellules de type monocyttaire (Thp-1) cultivées en suspension qui ne sont en contact que par sédimentation. L'efficacité relative de ces architectures en terme de pourcentage de cellules transfectées, après des temps de contact courts correspondant au temps de contact lors de l'utilisation des

complexes en solution, est faible. Mais celle-ci augmente avec le temps de contact des cellules. Les taux de transfection observés après 4 jours sont alors pour certains types cellulaires similaires à ceux exprimés en solution. La quantité d'ADN adsorbée à la surface est très faible, de fait celle du vecteur également. Les techniques de transfert de gène médiée par le substrat développées aujourd'hui permettent l'expression du transgène pendant plusieurs mois *in vivo* mais utilisent des quantités importantes d'ADN (jusqu'à 100 µg) (Bonadio et al., 1999). Nous décrivons ici la possibilité de transférer avec moins d'ADN sur une période de 4 jours *in vitro* en employant des architectures stables *in vivo* sur de longues périodes. Bien sûr l'expression à long terme (plusieurs mois) devrait nécessiter le stockage d'une quantité d'ADN plus importante car le maintien de la transfection est subordonné à une disponibilité prolongée d'ADN. Généralement, l'optimisation des systèmes de transfection médiée par le substrat passe par l'augmentation de la quantité d'ADN adsorbée. Jang *et al.*, 2006 ont montré que la quantité de complexes adsorbés à la surface de membranes de PLGA est fonction de la quantité de complexe apportée au départ et du temps d'incubation avant rinçage. La quantité d'ADN utilisée au cours des processus d'adsorption est limitée par la tendance des complexes à s'agréger en solution. Ce phénomène est fonction du temps mais également de la concentration de la solution. Les complexes agrégés étant moins propices à la transfection, ce phénomène doit être évité (Sharma et al., 2005). D'ailleurs il est vraisemblable que des agrégats de complexes déposés à la surface du film soient éliminés au cours des rinçages successifs selon un processus similaire à celui de l'élimination d'agrégats de particules de polystyrène chargées (Ahn *et al.*, 2005). C'est pourquoi la limitation de la quantité d'ADN utilisé est primordiale. D'ailleurs nous avons montré que l'augmentation de cette concentration est sans effet sur l'efficacité de transfection. L'augmentation du temps d'incubation pourrait-elle mener à une augmentation de la quantité d'ADN ? Dans notre cas, le temps d'incubation est relativement court (1h). L'adsorption est un phénomène saturable. Sa vitesse au cours de la construction d'un film multicouche de polyélectrolyte est fonction de la concentration de la solution de polyélectrolyte (Ladam et al., 2000). Au cours de nos expériences d'OWLS nous avons pu observer qu'après une heure le signal ne varie plus. L'augmentation du temps d'adsorption n'est donc pas nécessaire. Ce problème peut être contourné par l'adsorption séquentielle de plusieurs couches de complexes comme nous avons pu le montrer dans des architectures de type (CHI/HA)_n où l'augmentation du nombre de couche, et par la même la concentration en ADN, favorise l'augmentation du taux de transfection. Le développement de cette stratégie, en terme de choix des polélectrolytes

constitutifs (dégradables/non dégradables), doit prendre en compte la nécessité de l'accessibilité des complexes pour les cellules.

Au cours de la formation des complexes une partie du PEI reste sous forme libre. Ce PEI peut favoriser l'échappement des endosomes des polyplexes par son pouvoir tampon s'ajoutant à celui du PEI complexé. Or dans le cadre des multicouches ce PEI sous forme libre peut s'adsorber également sur le film et être internalisé comme constituant du film mais de manière indépendante des complexes. La différence d'activité et le délai d'action observé peuvent donc être la résultante d'une modification du trafic intracellulaire des complexes.

Les multicouches de polyélectrolytes ne sont pas inertes car les cellules interagissent et internalisent leurs constituants. Les polyélectrolytes, en fonction de leur nature, ont des effets variables sur les cellules cultivées à leur contact. Un ralentissement de l'activité métabolique de fibroblastes de type L929 en présence de PLL, PEI ainsi que de PAMAM a été observé (Fischer *et al.*, 2003). Les polyélectrolytes présentent une toxicité cellulaire par destabilisation membranaire. Ce phénomène est directement lié à l'interaction de ceux-ci avec la membrane plasmique et est donc lié à leur densité de charge et également à leur poids moléculaire (Chanana *et al.* 2005). Hamamo *et al.* (1998) montrent l'effet ambivalent de complexes de polyélectrolytes sur des fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire en fonction du type de fonctions porté par les polyélectrolytes. En présence de complexes formés avec de la chitine présentant des groupements sulfate, l'acide ascorbique entraîne la prolifération cellulaire alors qu'en présence de complexes formés avec de la chitine présentant des groupements carboxyméthyle, on assiste à une inhibition de la prolifération cellulaire. Nous avons démontré ici que l'activité d'endocytose de cellules de type B16-F1 est augmentée lorsque les cellules sont cultivées sur des multicouches de type (PAH/PSS)₆. Le choix des polyélectrolytes est donc crucial en fonction du type cellulaire ciblé. D'ailleurs pour un même type cellulaire l'efficacité de transfection est différente en fonction du type de multicouche utilisé. On aurait pu soupçonner des différences d'adsorption des complexes mais le dosage de l'ADN dans les architectures étudiées ici a montré le contraire pour au moins deux d'entre elles, (PLL/PGA) et (CHI/HA), ceci ayant été confirmé par AFM pour l'ensemble des surfaces testées.

Le taux de transfection initiale est moins important dans le cas présent que le maintien de l'expression du transgène au cours du temps. La stabilité de nos architectures en fonction du temps est donc un point crucial. La stabilité des complexes va dépendre de la multicouche employée et de ses interactions avec les complexes. La stabilité des architectures est

dépendante du type de polyélectrolyte utilisé. En effet des films de type (PLL/PGA)_n sont stables sur une période de 6 jours alors que des films de type (CHI/HA)_n en présence de milieu de culture perdent jusqu'à 40 % de leur surface. Parallèlement sur des architectures de type (CHI/HA)_n, on observe une perte de 50 % de la quantité d'ADN adsorbé initialement. Dans le cadre du développement d'architectures pour une utilisation *in vivo* l'emploi de films stables dans le temps est préférable. Mais l'utilisation de films aux comportements différents peut mener à des architectures composites permettant une libération importante de complexes dans une première phase et le maintien de l'activité de transfection au cours du temps. La stabilité des complexes serait également liée au nombre de couches de polyélectrolyte. Des particules de 3 µm ne peuvent être adsorbées de manière stable sur des monocouches de polycation (Ahn et al., 2005). Dans les premières phases de la construction d'une multicouche l'adsorption des polyélectrolytes n'est pas homogène (Picart et al., 2001). Le recouvrement total de la surface n'intervient qu'après quelques cycles d'adsorption. Le nombre de cycles nécessaire est variable en fonction des polyélectrolytes utilisés. Ici nous avons travaillé avec des films ayant un nombre de couche suffisant pour permettre le recouvrement homogène de la surface et éviter les interactions avec le substrat sous jacent. Les résultats obtenus ici sont donc transposables à des applications comme par exemple le recouvrement de prothèse. La stabilité des complexes sur une surface est dépendante du N/P auquel le complexe a été formé (Jang et al., 2006). En effet, la charge de surface des complexes est dépendante du N/P et l'adsorption des complexes est sous l'influence de forces électrostatiques. Mais ce rapport influence également la taille du complexe ainsi que son devenir au sein de la cellule et donc directement l'efficacité de transfection. Dans de tels systèmes il faut donc trouver un équilibre entre les caractéristiques essentielles à la transfection et celles essentielles à la stabilité de l'architecture. La variation du ratio N/P dans notre cas montre une efficacité maximale à N/P = 12. Au delà l'efficacité de transfection est moins bonne. A un tel ratio les complexes ont une charge très nettement positive (+ 16 mV) et présentent une bonne stabilité sur 5 jours. Utiliser des complexes formés à des ratios supérieurs pourrait en augmenter la stabilité mais diminuerait la capacité de transfection et augmenterait la toxicité du système.

Nous avons choisi de complexer l'ADN avant son incorporation dans la multicouche afin de contrôler les caractéristiques des complexes. L'étude des complexes en surface a montré par AFM qu'ils forment des structures sphéroïdes et globulaires comme classiquement décrit dans la littérature (Brus et al., 2004). Leur forme ne dépend pas de la nature du film sur lequel ils sont adsorbés. De plus la variation du ratio N/P modifie la taille des complexes. Des

tailles similaires à celles évaluées en solution ont été mesurées par AFM. L'analyse par spectroscopie infra rouge a montré également que l'ADN reste complexé après l'adsorption du complexe. Les complexes de polyélectrolytes sont en effet sujets à réorganisation en présence d'autres polyélectrolytes et nous avons montré que les complexes PEI/ADN_p en solution, en présence de PGA et PSS, se réarrangent et libèrent l'ADN nu dans le milieu. Ce phénomène a été démontré pour d'autres types de complexes et est directement lié au fait que les interactions principales entre polyélectrolytes sont d'ordre électrostatique (Danielsen et al. 2005). D'ailleurs en modifiant la force ionique, l'échange de polyélectrolyte peut être modulé et ces phénomènes sont différents en fonction des polyélectrolytes utilisés. Ici l'adsorption des complexes n'est pas à l'origine de réarrangements des complexes. Les caractéristiques des complexes ne sont pas modifiées par leur adsorption à court terme. Cependant au sein d'une multicouche à croissance exponentielle comme (PLL/PGA)_n et (CHI/HA)_n, les polyélectrolytes peuvent diffuser et on peut se demander si le niveau de complexation de l'ADN restera constant à terme d'autant que le milieu est dépourvu de PEI. Par ailleurs, les complexes *in vivo* vont être en contact avec d'autres polyélectrolytes comme les glycosaminoglycannes (GAGs), constituants majeurs de la matrice extracellulaire qui constituent une barrière à la transfection. L'heparan sulfate déstabilise les complexes de PLL/ADN mais également ceux constitués de DOTAP et de PEI (Ruponen et al., 2001). L'acide hyaluronique, ne déstabilise pas les complexes formés avec du PEI linéaire de 22 kDa comme nous avons pu le démontrer, mais il interagit tout de même avec les complexes. Il est intéressant de noter ici que des complexes formés avec du PEI branché de 25 kDa sont déstabilisés par HA (Ruponen et al., 2000) alors que les complexes formés avec du PEI linéaire ne le sont pas. La différence d'activité entre heparan sulfate et acide hyaluronique est liée à la différence de densité de charge des deux molécules. L'heparan sulfate présente une densité de charge supérieure à celle de HA. Mais l'action des GAGs intervient également dans le trafic intracellulaire des complexes. Ainsi HA diminuerait l'endocytose des complexes mais favoriserait leur passage nucléaire (Ruponen et al., 2000). Dans notre système nous avons montré que le taux de transfection en présence de HA n'est pas modifié. Les GAGs, tels que l'heparan sulfate, la chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique, constituent également des ligands pour le CD44 (Leisley et al., 1995). Ce récepteur intervient dans l'endocytose des GAGs et pourrait permettre l'endocytose récepteur-dépendante d'autres molécules interagissant avec celles-ci (Bird et al., 2005). Les complexes recouverts de HA conservent leur activité et les taux de transfection sont égaux à ceux des complexes non

recouverts de HA. La stabilisation des complexes pourrait donc être augmentée par l'adsorption de HA sur la couche de complexe.

L'endocytose des complexes est une étape limitante. Nous avons montré que celle-ci n'est pas modifiée pour des cellules de type B16-F1 cultivées sur des multicouches (PAH/PSS)₆PLX. La couche de complexe semble masquer l'effet de la couche sous-jacente de PSS dont on a montré qu'elle induit une augmentation de l'endocytose. D'autre part, la taille des complexes influe sur les voies d'endocytose. Au dessous de 200 nm l'internalisation des complexes est récepteur-dépendante faisant intervenir les vésicules de clathrine alors qu'au dessus de ce diamètre ce sont plutôt des phénomènes de phagocytose ou de macropinocytose qui interviennent (Goncalves et al., 2004). L'endocytose de particules est également dépendante du type cellulaire et du niveau de confluence de la population. Ainsi les nanoparticules de moins de 100 nm sont internalisées par tous les types cellulaires alors que les particules de 1 µm ne sont plus internalisées par certains types cellulaires et moins bien internalisées par d'autres. De même les cellules à confluence répondent différemment : des cellules endothéliales (HUVEC, ECV 304) qui présentent une activité de phagocytose peuvent internaliser des particules de 1 µm même lorsque la population est à confluence alors que des cellules de type KLN 205 ne peuvent internaliser ce type de particule que lorsqu'elles sont situées au bord de la population (Zauner et al., 2001). Les voies d'endocytose liées à la clathrine sont majeures dans le cas de l'internalisation des complexes à partir de la multicouche. Goncalvez et al. 2004, ont montré l'importance de ces mêmes voies pour l'internalisation de complexes de PEI/ADN en solution.

La cytotoxicité des systèmes décrits ici est relativement faible. En effet les cellules peuvent être cultivées plusieurs jours sans effets notables sur leur degré de prolifération. La toxicité du PEI provient de deux phénomènes : la déstabilisation membranaire et l'induction de l'apoptose (Moghimi et al., 2005 ; Florea et al., 2003). La déstabilisation membranaire est un phénomène général engendré par les polyélectrolytes. L'intensité de ce phénomène est d'ailleurs directement liée à leur masse moléculaire et à leur densité de charge. La déstabilisation membranaire peut mener à la mort cellulaire par nécrose. L'absence de toxicité peut s'expliquer par la quantité relativement faible de complexes présents à la surface des architectures. L'apoptose n'est pas engendrée non plus par notre système. Néanmoins il est intéressant de noter que lors de la formation des complexes à N/P élevé, jusqu'à 86 % du PEI employé initialement demeure sous forme libre (Clamme et al., 2003). Ainsi on peut penser qu'à la surface des multicouches une grande partie de la surface est recouverte par du PEI

libre mais que localement la concentration soit inférieure au seuil de toxicité. Cependant la toxicité inhérente aux multicouches est également à prendre en compte. Des cellules de type 3T3 ne peuvent adhérer sur des multicouches de type (PLL/PGA)_n. Or les interactions entre les cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire, impliquent la mise en jeu de récepteurs et de ligands spécifiques, en particuliers des récepteurs de type lectine qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques et ont la capacité d'interagir avec les glycolipides, glycoprotéines et protéoglycanes. Les cellules de type 3T3 prolifèrent sur des surfaces constituées de HA. Des interactions de type lectine peuvent en être l'origine. L'hypothèse d'un rôle positif de ces interactions dans l'adhésion de ces cellules nous a fait envisager l'utilisation de résidus saccharidiques pour favoriser l'adhésion cellulaire. L'adjonction de résidus mannose greffés de manière covalente sur du PGA s'est révélée favorable à la prolifération et la transfection des cellules 3T3. L'adjonction d'une fonction par couplage covalent sur les polyélectrolytes n'est pas un obstacle à l'adsorption des complexes.

Enfin des multicouches de ce type ((CHI/HA)_n ; (PLL/PGA)_n) ont été implantées *in vivo*, en application sur la muqueuse buccale ou en implantation intra péritonéale ou endo-trachéale sans engendrer de réaction inflammatoire (Etienne et al., 2006 ; Vautier et al.2004) .

Le système décrit ici présente un certain nombre d'atouts, faible toxicité, caractère modulable, adaptabilité en fonction du type cellulaire ciblé, ce qui permet d'envisager son utilisation comme base d'édification d'architectures plus complexes permettant d'inclure séquentiellement les complexes pour augmenter l'efficacité temporelle du système.

7 Article 1 : “ A general approach for local gene delivery based on polyplex - functionalized polyelectrolyte multilayers”

Article soumis à publication dans Advanced Functional Material.

A general approach for local gene delivery based on polyplex - functionalized polyelectrolyte multilayers**

Florent Meyer, Youri Arntz, Christine Affolter, Didier Colin, Pierre Schaaf, Benoit Frisch, Jean-Claude Voegel, Joelle Ogier*

[*] F. Meyer, Dr. Y. Arntz, C. Affolter, Dr. D. Colin, Dr. J.C. Voegel, Prof. J. Ogier

Inserm Unité 595, Université Louis Pasteur
11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex (France)
E-mail: joelle.ogier@medecine.u-strasbg.fr
FAX : 00 33 3 90 24 33 79

Dr. D. Colin
Institut de Bactériologie
3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg (France)

Prof. P.Schaaf
Institut Charles Sadron (CNRS/ULP)
6 rue Boussingault, 67083 Strasbourg Cedex (France)

Dr. B. Frisch
Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 7514
74 route du Rhin, 67400 Illkirch (France)

[**] The authors thank Pr. V. Ball for having supervised light scattering and ellipsometry experiments. This work was supported by the “Action Concertée Incitative” (ACI) ‘Nanotechnologie’ 2004.

Abstract

Polyelectrolyte multilayers (PEMs) represent highly efficient adsorption substrates for charged particles. Additionally, they provide chemical functionalities which may be exploited to develop sophisticated functional interfaces. Here, the ability of PEMs to deliver pre-complexed DNA has been shown to be effective on various cell lines, monocytic THP-1 cells, hepato-cellular carcinoma cell line Huh-7 and NIH3T3 fibroblast cells with gene transfer systems based on the adsorption of positively charged plasmid DNA / poly(ethylenimine) (PEI) complexes on (poly-L-lysine / poly-glutamic acid)₆, (poly-(allylamine hydrochloride / poly-(sodium-4-styrene-sulfonate)₆ and (chitosan / hyaluronan)₁₀ multilayers. Gene transfer from (poly-L-lysine / poly-glutamic acid)₆ architectures could be as efficient as from the solution despite a low DNA surface density (25-30 ng/cm²). No significant DNA passive release from this architecture was observed with time over a 6 day-period when about 50% of the initially bound DNA was released from degradable (chitosan / hyaluronan)₁₀ constructs after 48 h, suggesting that different mechanisms of delivery could be exploited by using PEMs. Consistently, sequential embedding of polyplexes in mixed architectures with combined degradable and non degradable polyelectrolytes to improve transfection efficiency of the system has been validated.

Keywords: Local gene delivery system; biomaterial; polyelectrolyte multilayer; polyplex

1. Introduction

A major challenge in transfection methods where DNA molecules are deposited in particles or porous matrices has been essentially to maximize the conditions of local DNA availability, a major advantage over DNA delivery methods which expose DNA to quick degradation *in vivo* [1-2]. DNA uptake by cultured cells has been provided, for example, by complexation of DNA to nanoparticles, which by themselves do not deliver DNA if not used with transfection reagents [3-4]. Other strategies, aimed to sustain delivery of DNA, have been based on incorporating DNA into inorganic [5-6], organic matrices [7-8], or on DNA encasing in microcapsules [9-10]. As an alternative to these approaches, gene delivery from material surfaces which theoretically should combine potential advantages such as interfacial concentration of DNA avoiding repeated DNA administration, and limited toxicity, has been explored [11, 12, 13]. For instance, the feasibility of a solid-phase (dendrimer/DNA)/membrane system has been established for *in vitro* gene delivery and *in vivo* delivery to skin [14]. Gene transfer was also achieved on DNA/calcium phosphate nanocomposite surfaces developed for tissue engineering specifically for gene therapy of bone [15]. Besides, current advances in the development of thin films have inspired their application to the delivery of plasmid DNA. Recently, multilayered ultra-thin films made of non-complexed plasmid DNA and a degradable polyamine were shown to be efficient in the release of DNA and subsequent *in vitro* transfection of adherent COS-7 cells [16-17]. Importantly, these films could deliver DNA to cells in a tissue culture environment and promote significant levels of surface-localized gene expression without the need for any exogenous transfection agents.

Representing now a promising approach to the controlled administration of DNA from surfaces, polyelectrolyte multilayers (PEMs) take advantage of the intrinsic properties of their constituents to provide chemical functionalities which may be exploited to develop

sophisticated functional platforms made of the combination of multiple components. Made of synthetic or natural polyelectrolytes, these highly versatile systems have been previously applied in numerous biological and therapeutic contexts. For instance, PEMs have been engineered for the preparation of bioinert/bioactive coatings [18-20]. They have also been designed with incorporation of a variety of materials including signal molecules to control interactions of cells with surfaces [21-26], drugs [27-30] and functional particles to produce delivery platforms [31-34]. Recently, we have reported the feasibility of embedding pre-complexed DNA into synthetic and naturally degradable architectures and the ability of such architectures to deliver polyplexes to human hepato-cellular carcinoma cells [35]. In the present study, PEMs have been evaluated for delivery of polyplexes to different types of eukaryotic cells and for sequential loading of pre-complexed DNA during the multilayer buildup as the first step of development of gene delivery platforms able to sustain DNA availability.

2. Results and Discussion

Different gene transfer systems based on the adsorption of pDNA / linear PEI polyplexes on polyelectrolyte multilayers have been initially tested to evaluate their validity for transfection of different cell lines. According to the cell adhesion characteristics, PLL/PGA, PAH/PSS, and CHI/HA multilayers were used for transfection of monocytic THP-1 cells, hepato-cellular carcinoma Huh-7 cells, and NIH3T3 fibroblast cells respectively. The tests were conducted with pEGFP-C1, a mammalian vector expressing green fluorescent protein. Linear PEI and pDNA mixed at various nitrogen/phosphate (N/P) ratios were preliminary examined for their electrophoretic mobility in order to determine the range of theoretically optimal conditions of DNA complexation to use. Over the N/P ratio of 3, the

electrophoretic mobility of DNA was abolished (not shown), indicating a complete condensation which is a prerequisite for effective cellular uptake ^[36]. The size of the complexes resulting from N/P ratios of 5 to 12 averaged between 897±79,8 and 678±78,1 nm with a polydispersity of < 0.2 to 0.086, which is consistent with literature data for complexes formed in presence of salt ^[37], and their zeta potential ranged between +6.8 mV and +16.2 mV respectively, as expected from published reports for high N/P values (>2) ^[38]. According to their charge, complexes were adsorbed on anion-ending PEMs to produce three different (pEGFP-C1/PEI) complexes - functionalized PEMs, i.e. (PLL/PGA)₆ (pEGFP-C1/PEI), (PAH/PSS)₆ (pEGFP-C1/PEI), and (CHI/HA)₁₀ (pEGFP-C1/PEI). After 24 hours of culture on these substrates, cells expressing pEGFP-C1 have been detected by fluorescence for the three tested systems, suggesting the generality of the strategy provided that the constitutive polyelectrolytes are compatible with cell adhesion profile and biocompatibility requirements. A preliminary evaluation of gene transfer by fluorescence microscopy indicated that the extent of gene transfer from PEMs surface was adjustable by varying the N/P ratio just like in solution, as shown in Figure 1 for PLL/PGA architectures.

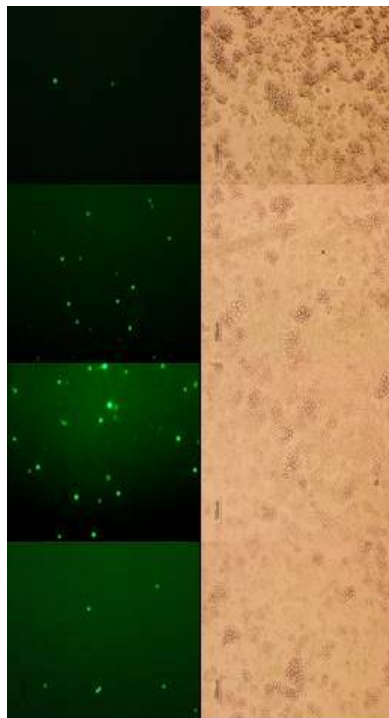


Fig.1 *In vitro* THP-1 cells transfection imaged by fluorescence microscopy. Photographs of cells after contact for 24h with (PLL/PGA)₆ (PEI/pEGFP-C1) architectures built on glass coverslips. N/P ratio was respectively, from top left to bottom left, of 5, 10, 12 and 15. Top right to bottom right: control photographs of corresponding cell cultures showing a similar cell density.

Additional AFM experiments with PLL/PGA architectures functionalized by deposit of complexes with N/P ratios of 5, 8, 12, or 15 confirmed that the N/P ratio has an effect on the size of the complexes but not on their density at the surface (Figure 2). The well defined morphology of deposited polyplexes changed with the N/P value. The main change consisted in the evolution of the polyplexes size, which was determined on a panel of 30 polyplex sections for each N/P value. For N/P = 5, 8, 12, and 15, polyplex diameter was of 628 ± 20 , 489 ± 30 , 408 ± 30 and 366 ± 30 nm respectively, the discrepancy in size with polyplexes in solution being probably due to desiccation procedure for AFM imaging. No aggregation neither significant change in terms of surface density of polyplexes was observed. Besides, comparative AFM imaging of adsorbed polyplexes on CHI/HA and PAH/PSS architectures with a given N/P ratio of 12 did not show any difference in complex size neither in complex density (not shown).

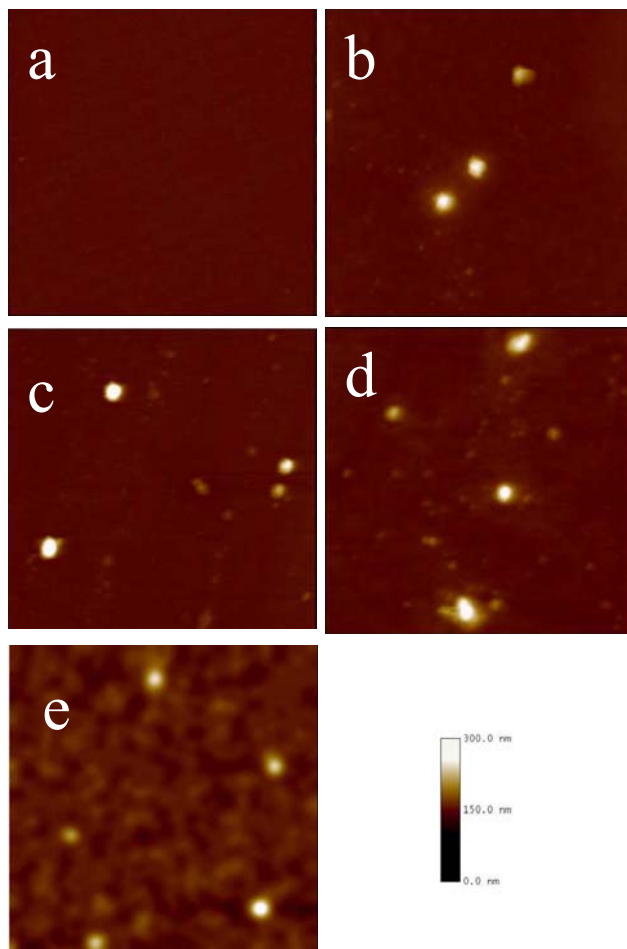


Fig. 2 AFM image evolution of polyplexes with different N/P values deposited on PLL/PGA multilayers. AFM imaging was conducted using the Nanoscope IV from Veeco under dry condition. The height and deflection images were acquired at a scan rate of 2 Hz, the images size was 10 x 10 μm with a resolution of 512 x 512 pixels. Fig 2a shows the PLL/PGA reference surface on which polyplexes with different N/P were deposited (Fig 2b, c, d and e for N/P = 5, 8, 12 and 15 respectively).

Transfection rates were determined for the N/P ratio of 12. The transfection rate of THP-1 cells with the functionalized PLL/PGA architecture after 24 hours was similar to the value obtained with the polyplex solution used to adsorb complexes on PEMs (Table 1). Transfection rates of NIH3T3 and Huh-7 cells from CHI/HA and PAH/PSS multilayers were lower than in solution. NIH3T3 transfection rate was different on CHI/HA and PAH/PSS showing that transfection rate is dependent on the PEM type and suggesting that maximal

transfection rate should be dependent upon cell adhesion conditions i.e. on interaction of cells with PEM. As previously published ^[35], the initial amount of pDNA bound to PEMs, resulting from the deposition of a 1 µg pDNA-containing polyplex solution, was comprised between 50 and 65 ng (25-30 ng/cm²). Considering the actual amounts of DNA involved at the surface compared to the amount involved in the solution, the obtained transfection levels are encouraging since gene transfer from PLL/PGA architectures after 24 hours could be as efficient as from the solution. Bengali et al. recently reported that, with adsorption of polyplexes to tissue culture polystyrene or poly(lactile-co-glycolide) disks resulting in DNA surface densities of at least 4-5 µg/cm², the transfection performance could be much higher than with control bolus delivery of a quantity of DNA equivalent to the amount of DNA immobilized to the substrate ^[11]. That surface immobilization significantly reduces the quantity of DNA required relative to bolus delivery was confirmed by Jang et al. with a quantity of surface-bound complexes of an order of magnitude less than required to achieve the highest levels of transfection by bolus delivery ^[13]. This quantity was about twice as the one immobilized here. Accordingly, one could speculate that optimized PEMs with regard to DNA density would be a powerful tool for delivery of pre-complexed DNA. In addition, transgene expression would be affected quite differently in vivo where cells are surrounded by insoluble extracellular matrices composed of a network of proteins and proteoglycans. In vitro transfection was performed here in absence of extracellular matrix proteins pre-adsorbed on the transfection substrate which could improve initial cell adhesion and transgene expression ^[13, 39].

Table 1: Transfection rate with (PEI/pEGFP-C1) complexes (N/P=12) from surface of different polyelectrolyte multilayers after 24 or 96* hours. Transfection rate was expressed as the percentage of EGFP positive cells after exclusion of self-fluorescent cells, divided by the total number of cells analyzed by flow cytometry \pm standard deviation.

	Solution	(PLL/PGA)6	(CHI/HA)10	(PAH/PSS) 6
NIH 3T3	22 \pm 1,5 %	nd	5,26 \pm 0,4 %	1,6 \pm 0,15 %
Thp-1	1,83 \pm 0,2 %	1,97 \pm 0,62 %	nd	nd
Huh-7	45,8 \pm 2,49 %	nd	nd	*11,5 \pm 1.2%

Since getting insight the mode of DNA availability with these systems would help to optimize transfection efficiency, we examined the hypothesis of the eventual release of DNA from the surface into the environment with time. To this aim, multilayers functionalized with PEI/ FITC-labeled pDNA complexes were built and the fluorescence of adsorbed DNA after different times of incubation with the cell culture medium was measured after dissociation of the multilayers in 200 μ l of 5M NaCl. The complete multilayer dissolution in presence of 5M NaCl was checked by ellipsometry and the amount of fluorescein-labeled pDNA measured by fluorometry. DNA amount was calculated using standard curves established in the same medium conditions. As shown in Figure 3, the DNA stability at the surface of functionalized architectures was variable.

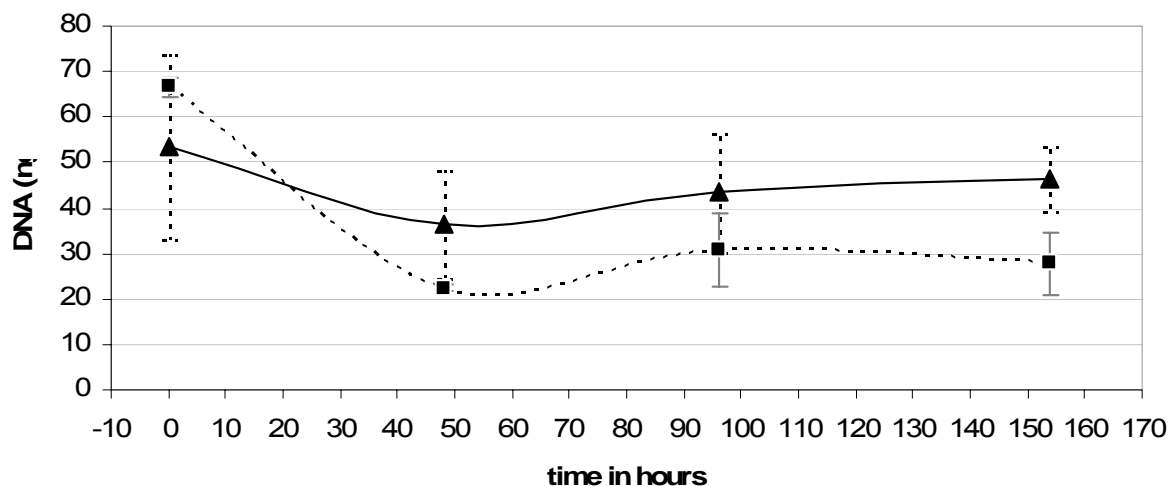


Fig.3 Normalized pDNA amount in functionalized (PLL/PGA)₆ (▲) and (CHI/HA)₁₀ (■) versus PEM incubation time with complete RPMI (n=4, ± S.D.). pDNA amount was quantified by determination of the fluorescence due to the release of FITC labeled-DNA complexes by complete dissolution of the architectures after treatment with 5M NaCl during 10 minutes.

No significant DNA release from PLL/PGA architectures was observed with time over a 6 day-period of incubation with the culture medium, indicating that DNA availability for cells was not mainly through passive release. As for functionalized CHI/HA PEMs, about 50% of the initially bound pDNA was released from (CHI/HA)₁₀ after 48 h, indicating that the stability of pDNA on CHI/HA PEMs was lower than on PLL/PGA PEMs. This relative instability of DNA might be related to the lower charge density of HA compared with PGA at pH 7.4, and to less stability of the CHI/HA architecture itself. These results support the idea that both mechanisms, active DNA uptake by cell in the case of not naturally degradable architectures and DNA release in the case of degradable ones, could be exploited in the delivery of pre-complexed DNA from PEMs depending on their composition. Similarly, Bielinska et al. reported that dendrimer/DNA complexes incorporated in support membranes could very efficiently mediate transfection either after dissociation from the solid support or

when retained on the surfaces of the membranes and that in vitro transfection was comparable to bolus controls ^[14].

Previous papers from our laboratory have reported that the embedding of bioactive molecules in PLL/PGA architectures allows their activity to be controlled in the absence of any release process and that the activity of the embedded molecules with time depended on the integration depth ^[21, 23]. Additionally, we recently reported the feasibility of DNA delivery with polyplexes embedded in degradable architectures such as CHI/HA architectures ^[35]. In order to establish a PEM system which could provide cells with controlled DNA availability and further promote a sustained DNA delivery compatible in time with clinical situations, we evaluated the sequential loading of pre-complexed DNA on PAH/PSS architectures by incorporating polyplexes in (CHI/HA)_n architectures to take advantage of both non degradable and degradable films. Typical tested architectures were (PAH/PSS)₆ [((pEGFP-C1/PEI) /HA) (CHI/HA)]_n. After 4 days of culture, the transfection rate of Huh-7 cells was 11.5 % for (PAH/PSS)₆ (pEGFP-C1/PEI), 14.3% for (PAH/PSS)₆ ((pEGFP-C1/PEI) /HA) (CHI/HA) ((pEGFP-C1/PEI) /HA) (CHI/HA) and 15.7 % for (PAH/PSS)₆ ((pEGFP-C1/PEI) /HA) /HA) (CHI/HA) ((pEGFP-C1/PEI) /HA) (CHI/HA) ((pEGFP-C1/PEI)/HA) (CHI/HA) architectures respectively, indicating that sequential deposit of polyplexes could be of interest for improvement of transfection rate from multilayered interfaces. The increased availability of the complexes with sequential polyplex loading, leading to increasing transfection rate, would be due to destabilization and/or progressive degradation by cells of CHI/HA moieties.

Strategies for molecule delivery have often been based on controlled PEM degradation in physiological environment. The integration of constituents that enable the degradation of multilayered polyelectrolyte assemblies under physiological conditions has been approached by using hydrolytically degradable polyelectrolyte ^[40] and natural polyelectrolytes that can be

cleaved by specific enzymes present in biological fluids [41-43]. Recently, Zhang et al. reported the gradual DNA release from films fabricated by layer-by-layer assembly of a synthetic degradable polyamine and a plasmid, demonstrating that sustainable DNA release from multilayer constructs was feasible [16]. Such architectures eroded upon incubation under physiological conditions, releasing the plasmid gradually into the incubation medium over a period of up to 31 h. A combined approach based on the feasibility to tune the properties of PEMs by using polyelectrolyte mixtures [44,45] or by replacing L- by D- polyaminoacids to display a transition from non-activity to full-activity of embedded molecule over a period of time depending on the composition of the architecture and embedding depth [46], would be an alternative to produce PEMs that could sustain the bioavailability of functional DNA over periods of time relevant for therapeutic situations with progressive accessibility of embedded polyplexes.

3. Conclusions

The layer-by-layer deposition of polyelectrolytes is a convenient and now well-established method for the incorporation of natural and synthetic polyelectrolytes into nanostructured assemblies. The main advantage of PEMs is their ability to construct three dimensional structures for controlled cell-surface interactions. PEMs have been previously essentially tested for their feasibility to serve as platforms for the delivery of signal molecules and pharmaceuticals and have now shown their capacity for local delivery of pre-complexed DNA to eukaryotic cells in vitro. We show here that the adsorption of polyplexes on PEMs preserves the functionality of the complexes and that the mode of availability of the complexes is dependent on the nature of the constituent polyelectrolytes. Additionnally, the

sequential embedding of pre-complexed DNA in polyelectrolyte architectures was proven to influence the transfection rate. Besides, the strategy could take advantage of multiple possibilities of functionalization typically achieved by the incorporation of bioactive molecules for tailoring cellular reactions. For instance, due to the inherent potential of PEMs for simultaneous interfacial delivery of different effector molecules, the system would be possibly optimized through additional functionalization with molecules aimed to enhance gene transfer efficiency and/or with specific cell targeting molecules to restrict DNA transfer to certain cell types.

In conclusion, this work represents a new step for future development of platforms for local gene delivery based on polyelectrolyte multilayers. Specially, the appropriate selection of constituent polyelectrolytes should allow PEMs to be specifically tailored for given tissue environment and controlled delivery process.

4. Experimental

Chemicals: Poly(L-lysine) hydrobromide (PLL, MW= 30 KDa), poly(L-glutamic acid) (PGA, MW= 54 KDa), poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW= 50 KDa), poly(sodium-4-styrene-sulfonate) (PSS, MW= 70 KDa), chitosan (CHI, MW= 100 KDa) and hyaluronan (HA, MW= 400 KDa) were purchased from Sigma and used without any further purification. Linear poly(ethylenimine) (PEI, MW=22 KDa) was from Polyplus-transfection (Illkirch, France).

Cell Culture: NIH/3T3 cells (mouse fibroblasts) were grown in DMEM containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine and 50 µg/ml gentamicin. Huh-7 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 50

µg/ml gentamicin, 0.1 mM non essential amino acids, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate. Human pro-monocytic THP-1 cells were maintained in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and antibiotics (all from Life Technologies).

PEI/plasmid DNA complexes preparation : The efficiency of gene transfer by DNA-functionalized films was examined using pEGFP-C1, a mammalian vector expressing a stable variant of GFP. pEGFP-C1 was purchased from Clontech BD Science, amplified in *Escherichia coli* DH5α strain, and purified using the “Endofree plasmid Maxi kit” from Qiagen. Complexes of polymer and plasmid DNA (pDNA) were formed by diluting plasmid and polymer separately. An appropriate volume of PEI diluted to a concentration of 10 mM of nitrogen atom in 0.15 M NaCl was added to the plasmid solution (1µg in 100 µl of 0.15 M NaCl) according to different N/P ratios, assuming that 1µg of DNA contains 3 nanomoles of anionic phosphate. The solution was vortexed and incubated for 15 min before use in control and surface-mediated transfection assays.

Polyelectrolyte multilayers preparation: For all experiments, polyelectrolyte multilayer films were prepared on glass coverslips (CML, France) pretreated with 10⁻² M SDS and 0.12 N HCl for 15 min at 100°C, and then extensively rinsed with deionised water. Glass coverslips (2 cm² in diameter) were deposited in 24 well plates (Nunc). Polyelectrolyte architectures were built by alternated immersion of the pretreated coverslips during 10 min in polyelectrolyte solutions (300 µL) at the concentration of 1 mg/mL for PLL, PGA and HA, 5 mg/mL for PAH, PSS and 0.5 mg/mL for CHI in presence of 0.15 M NaCl at pH=7.4 for PLL/PGA and PAH/PSS and pH=5 for CHI/HA respectively. PEI/DNA complex solution (300 µL containing 1µg of DNA) was added on polyanion-ending architectures for 1 hour. After each deposition the coverslips were rinsed three times during 10 min with 0.15 M NaCl.

Before use, the architectures were put in contact with 1 mL of cell culture medium without serum during 24 h.

Particle size and zeta potential measurements: The dynamic light scattering as well as the electrophoretic mobility measurements were performed on a zetasizer 3000 HS device (Malvern Instruments, UK). The dynamic light scattering experiments were performed at a constant scattering angle of 90° and the obtained autocorrelation functions were transformed into the scattered intensity distribution versus the hydrodynamic radius of the particles by means of an inverse Laplace transform. All the data are the average of 10 runs on a given sample. The electrophoretic mobility measurements were performed in the presence of 10 mM NaCl in conditions of constant current (5 mA). To calculate the zeta potential from the measured mobility we used the Schmolukowski equation which is valid in these conditions since the Debye screening length (3 nm) is small with respect to the average hydrodynamic radius of the scattering centers.

Ellipsometry experiments: After different periods of incubation with the transfection medium, PEMs were rinsed three times and submitted to 5M NaCl treatment for 10 minutes. The complete dissolution of multilayers in presence of 5M NaCl was checked using a PZ2000LE/R ellipsometer (Horiba Jobin Yvon, München, Germany).

Fluorescent labelling: The plasmid DNA (pEGFP-C1) was labelled with fluorescein using a *Label IT*® fluorescein labelling kit (Mirus) following the protocol provided by the manufacturer. Any unreacted labelling reagent was removed and pDNA was purified by ethanol precipitation. Fluorescence was determined using a versafluor fluorometer (Biorad) with an excitation filter of 485-495 nm and an emission filter of 515-525 nm. Quantification of labelled-pDNA was normalized using a standard curve obtained in the same experimental conditions (pDNA complexed with PEI at the N/P = 12 in 5M NaCl).

Cell transfection: The experiments were done with pEGFP-C1. The day of transfection, the cells were washed with PBS and seeded on architectures at a density of $5 \cdot 10^5$ cells in complete medium (1mL) supplemented with FBS. The effect of the N/P ratio on transfection efficiency was observed in an inverted light microscope (Zeiss Axiovert 10) equipped with a 10 X dry objective connected to a video camera (SSC6M3, Sony). Transfection rate was quantified by flow cytometry (FACS) by using a Facsort cytometer (Beckton Dickinson) equipped with a 15 mW argon laser tuned to 488 nm. EGFP fluorescence was recorded in the FL1 channel (emission wavelength, 530 nm). The assay vials contained 500 μ l ($2 \cdot 10^5$ cells/mL).

AFM: The AFM images of DNA complexes deposited on the different surfaces were performed in dry conditions using the commercial Nanoscope IV from Veeco (Santa Barbara CA, USA). Cantilevers used had a spring constant of 0.01 Nm^{-1} with silicon nitride tip (Model MSCT-AUHW VEECO). Both deflection and height images were recorded with a scan rate of 2 Hz, at 512 x 512 pixels resolution with an image size of 10 x 10 μ m.

References

- [1] D. Luo, W. M. Saltzman, Nat. Biotechnol. 2000, 18(1), 33.
- [2] T. Segura, M. J. Volk, L. D. Shea, J. Control. Release 2003, 93(1), 69.
- [3] D. Luo, W. M. Saltzman, Nat. Biotechnol. 2000, 18(8), 893.
- [4] D. Luo, E. Han, N. Belcheva, W. M. Saltzman, J. Control. Release 2004, 95(2), 333.
- [5] L. D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, D. J. Mooney, Nat. Biotechnol. 1999, 17(6), 551.
- [6] J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, S. Goldstein, Nat. Med. 1999, 5(7), 753.

- [7] H. Cohen-Sacks, V. Elazar, J. Gao, A. Golomb, H. Adwan, N. Korchov, R. J. Levy, M. R. Berg, G. Golomb, *J. Control. Release* 2004, 95(2), 309.
- [8] D. Trentin, J. A. Hubbell, H. Hall, Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release, *J. Control. Release* 2005, 102, 263.
- [9] G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, E. Dauty, J. P. Behr, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003, 42(23), 2666.
- [10] D. G. Shchukin, A. A. Patel, G. B. Sukhorukov, Y. M. Lvov, Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126(11), 3374.
- [11] Z. Bengali, A.K. Pannier, T. Segura, B.C. Anderson, J.H. Lang, T.A. Mustoe, L. D. Shea, *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 90(3), 290.
- [12] J.H. Jang, C.B.Rives, L.D. Shea, *Mol Ther* 2005, 12, 475.
- [13] J.H. Jang, Z. Bengali, T.L. Houchin, L.D. Shea, *J. Biomed. Mater. Res A* 2005, Dec13 (Epub ahead of print).
- [14] A. U. Bielinska, A. Yen, H. L. Wu, K. M. Zahos, R. Sun, N. D. Weiner, J. R. Jr Baker, B. J. Roessler, *Biomaterials* 2000, 21(9), 877.
- [15] H. Shen, J. Tan, W. M. Saltzman, *Nat. Mater.* 2004, 3(8), 569.
- [16] J. Zhang, L.S. Chua, D.M. Lynn, *Langmuir* 2004, 20(19), 8015.
- [17] C. M. Jewell, J. Zhang, N. J. Fredin, D. M. Lynn, *J. Control. Release* 2005, 106, 214.
- [18] T. Serizawa, M. Yamaguchi, T. Matsuyama, M. Akashi, *Biomacromolecules* 2000, 1, 306.
- [19] J. D. Mendelsohn, S. Y. Yang, J. Hiller, A. I. Hochbaum, M. F. Rubner, *Biomacromolecules* 2003,4, 96.
- [20] J. Zhang, B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.C. Voegel, P. Lavallo, *Biomaterials*, 2005, 26(16), 3353.

- [21] J. Chluba, J.C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf, J. Ogier, *Biomacromolecules* 2001, 2(3), 800.
- [22] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavallo, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Mater.* 2003, 15, 692.
- [23] O. Etienne, C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J.L. Dimarq, P. Schaaf, J. Ogier, C. Egles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3662.
- [24] C. Vodouhé, M. Schmittbuhl, F. Boulmedais, D. Bagnard, D. Vautier, P. Schaaf, C. Egles, J.C. Voegel, J. Ogier, *Biomaterials* 2005, 26, 545.
- [25] P. Schultz, D. Vautier, L. Richert, N. Jessel, Y. Haikel, P. Schaaf, J.C. Voegel, J. Ogier, C. Debry, *Biomaterials* 2005, 26, 2621.
- [26] C. Picart, R. Elkaim, L. Richert, F. Audouin, Y. Arnz, M. Da Silva Cardoso, P. Schaaf, J.C. Voegel, B. Frisch, *Adv. Funct. Mater.* 2005, 15, 83.
- [27] B. Thierry, F.M. Winnik, Y. Merhi, M. Tabrizian, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7494.
- [28] B. Thierry, F.M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, M. Tabrizian, *Biomacromolecules* 2003, 4, 1564.
- [29] N. Jessel, P. Lavallo, F. Meyer, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher, J.C. Voegel, *Adv. Mater.* 2004, 16, 1507.
- [30] B. Thierry, P. Kujawa, C. Tkaczyk, F.M. Winnik, L. Bilodeau, M. Tabrizian, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 1626.
- [31] N. Jessel, P. Schwinté, R. Donohue, P. Lavallo, F. Boulmedais, R. Darcy, B. Szalontai, J.C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Mater.* 2004, 14, 963.
- [32] N. Benkirane-Jessel, P. Schwinté, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Funct. Mater.* 2004, 14(2), 174.
- [33] L. Derbal, H. Lesot, J.C. Voegel, BALL V. Ball, *Biomacromolecules* 2004, 4, 1255.
- [34] M. Michel, D. Vautier, J.C. Voegel, P. Schaaf, V. Ball, *Langmuir* 2004, 20, 4835.

- [35] F. Meyer, V. Ball, P. Schaaf, J.C. Voegel, J. Ogier, BBA Biomembranes (in press).
- [36] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, T. Kissel, J. Control. Release 2003, 89(1), 113.
- [37] M. Ogris, P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis, E. Wagner, Gene Ther. 1998, 5(10), 1425.
- [38] S. Choosakoonkriang, B. A. Lobo, G. S. Koe, J.G. Koe, C. R. Middaugh, J. Pharm. Sci. 2003, 92(8), 1710.
- [39] M. Ruponen, S. Ronkko, P. Honkakoski, J. Pelkonen, M. Tammi, A. Urtti, J Biol Chem 2001, 36, 33875.
- [40] E. Vazquez, D. M. Dewitt, P.T. Hammond, D. M. Lynn, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 13992.
- [41] T. Serizawa, M. Yamaguchi, M. Akashi, Macromolecules 2002, 35, 8656.
- [42] T. Serizawa, M. Yamaguchi, M. Akashi, Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2003, 2(10), 1115.
- [43] O. Etienne, A. Schneider, C. Taddei, L. Richert, P. Schaaf, J.C. Voegel, C. Egles, C. Picart, Biomacromolecules 2005, 6, 726.
- [44] E. Hubsch, V. Ball, B. Senger, G. Decher, J.C. Voegel, P. Schaaf, Langmuir 2004, 20, 1980.
- [45] J. Mendez-Garza, N. Jessel, G. Ladam, S. Muller, J.P. Stoltz, P. Schaaf, J.C. Voegel, P. Lavalley, Langmuir 2005, 21, 12372.
- [46] N. Jessel, P. Lavalley, E. Hubsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haikel, J.C. Voegel, J. Ogier, P. Schaaf, Adv. Funct. Mater. 2005, 15, 648.

Chapitre 4 Enfouissement de polyplexes dans des multicouches de polyélectrolytes.

1. Résumé 2 :

L'utilisation de matrices, pour la transfection *in vivo*, est motivée par la volonté de créer un réservoir local d'ADN devant permettre sa libération progressive et une transfection maintenue dans le temps en fonction des conditions de dégradation de la matrice (Kim et al., 2003). L'incorporation de complexes (PEI/ADN_p) dans un film multicouche, par adsorption séquentielle au cours de la construction, permet de créer ce type de réservoir. Nous avons montré précédemment que les complexes de (PEI/ADN_p) gardent leur activité lorsqu'ils sont adsorbés sur une multicouche de polyélectrolytes et ceci quelque soit le type de polyélectrolyte utilisé, cette propriété permettant d'utiliser les multicouches de polyélectrolyte comme substrat de transfection. Les complexes pouvant également être recouverts par une bicouche (CHI/HA), les conditions de transfection ont pu être optimisées en augmentant la quantité de complexes directement accessibles, au sein d'une même multicouche, par adsorption séquentielle de complexes recouverts d'une simple bicouche (figure 4-1A). Ceci constitue les bases de la création d'un réservoir. Ce type de stockage d'ADN permet une activité à court terme du fait de l'espacement faible des couches de complexes. Le stockage d'ADN devant permettre le maintien d'une activité de transfection à long terme nécessite dans ce système l'incorporation de complexes sous un nombre de bicouches plus important (figure 4-1B). Ceci implique une augmentation de la concentration locale de polyélectrolytes. Cette stratégie doit être validée en terme d'accessibilité de l'ADN et de conservation de l'activité.

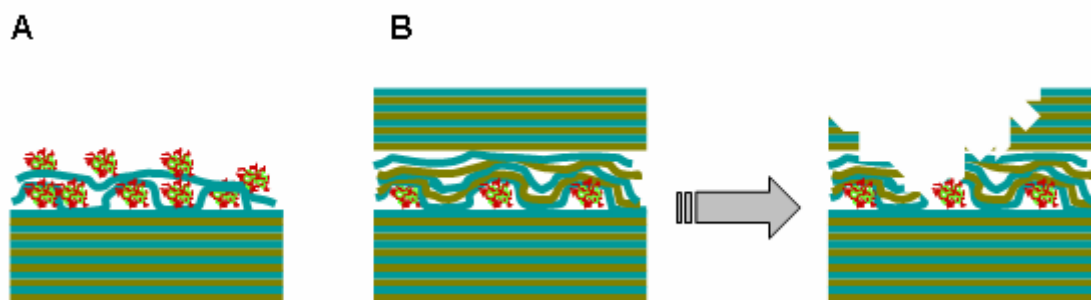


Figure 4-1 : Représentation schématique de la formation de réservoirs par des multicouches de polyélectrolytes. (A) L'adsorption séquentielle de complexes au cours de la construction de la multicouche crée un réservoir dont les complexes sont directement accessibles aux cellules. (B) L'enfouissement des complexes au sein de la multicouche crée un réservoir temporel dont les complexes sont accessibles après un temps t par dégradation du film.

Deux types d'architectures dégradables ont été choisies pour constituer ces réservoirs, des architectures de type $(PLL/PGA)_n$ et $(CHI/HA)_n$.

Dans un premier temps l'intégrité des complexes en présence de plusieurs polyanions a été évaluée en solution, puis au sein même des multicouches étudiées. L'incorporation de complexes au sein de ces deux architectures a été objectivée par microscopie confocale (fig 4-2). Deux architectures ont été examinées: $(CHI/HA)_{20}(PLX/HA)(CHI/HA)_{20}$ et $(PLL/PGA)_{12}(PLX/PGA)(PLL/PGA)_{12}$. L'ADN a été marqué à l'aide d'iodure de propidium après son incorporation sous forme de complexes au sein de la multicouche.

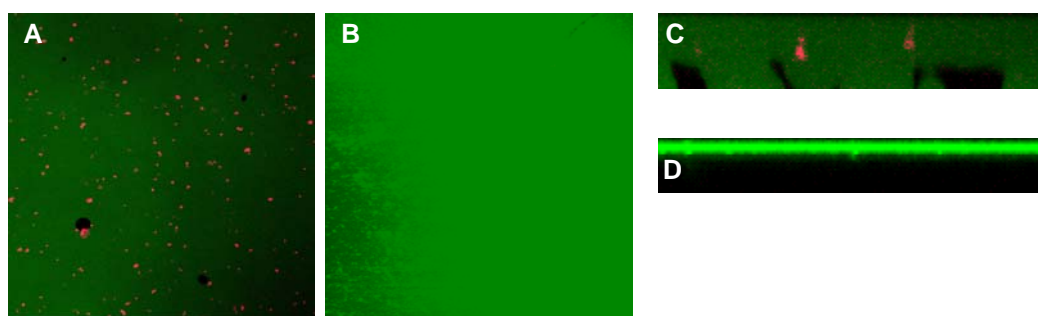


Figure 4-2 : Images en microscopie confocale de multicouches de type $(CHI/HA)_{20}(PLX/HA)(CHI/HA)_{20}$ (A,C) et $(PLL/PGA)_{12}(PLX/HA)(PLL/PGA)_{12}$ (B,D). Les multicouches ont été marquées respectivement par CHI^{FITC} et PLL^{FITC} , l'ADN a été marqué à l'iodure de propidium. A et B correspondent aux plans contenant les complexes ; C et D correspondent à des sections en Z des films.

Dans les architectures de type $(CHI/HA)_n$, l'ADN apparaît sous forme de petites particules comparables aux images de complexes adsorbés sur une multicouche. L'ADN semble donc complexé. Ces complexes se trouvent dans une zone verticale restreinte (fig 4-

2c). Il semble donc qu'au sein d'une architecture (CHI/HA)_n les polyplexes ne diffusent pas verticalement. Dans les architectures de type (PLL/PGA)_n aucun marquage de l'ADN n'est visible. L'adsorption de PGA au dessus de la couche de polyplexes mène à la libération de l'ADN dans le milieu. Cet ADN sera éliminé par les rinçages successifs au cours de la construction de la multicouche. Ce fait a été confirmé par spectroscopie infra rouge en mode totalement atténué. En effet on observe une disparition des spectres caractéristiques de l'ADN après adjonction de PGA . Les films constitués de chitosane et d'acide hyaluronique, ne sont pas très stables dans le temps. Leur stabilité peut être augmentée par réticulation chimique (Etienne et al., 2006). Sous l'effet de la réticulation la dégradation par action cellulaire après implantation *in vivo* est ralentie. Or la transfection doit passer par l'endocytose du complexe. On peut donc s'attendre à ce qu'une réticulation des films contenant des polyplexes ne permette plus la transfection ou du moins ralentisse fortement la libération du complexe. C'est pourquoi, dans le but d'élaborer un réservoir stable *in vivo*, nous avons étudié un moyen d'inclure des complexes dans des architectures de type (PLL/PGA)_n. Ayant montré précédemment que HA ne déplace pas le complexe, nous avons émis l'hypothèse qu'une couche de HA adsorbée à la surface d'une multicouche de type (polycation/polyanion)_npolyplexe devait permettre de poursuivre l'édification d'un film (PLL/PGA)_n pour enfouir les complexes. Tout d'abord, comme précédemment, une multicouche (PLL/PGA)₁₂(PLX/HA)(PLL/PGA)₁₂ a été analysée par microscopie confocale. En présence de HA, nous avons observé le même type d'image que dans les architectures de type (CHI/HA)_n (fig.4-3). Ces résultats ont été confirmés par spectroscopie infra rouge en mode totalement atténué sur des architectures (PAH/PSS)₆(PLX/HA)(PLL/PGA)₃.

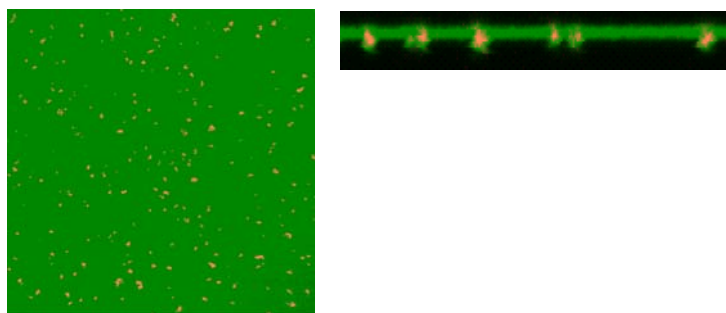


Figure 4-3 : Images en microscopie confocale d'une multicouche (PLL/PGA)₁₂(PLX/HA)(PLL/PGA)₁₂. Image de droite: grossissement X40, 230 * 230 μm . L'image de gauche est une coupe en Z de l'échantillon présenté dans l'image de droite.

Enfin le pouvoir de transfection des polyplexes enfouis dans différentes architectures, (CHI/HA)_n(PLX/HA)(CHI/HA)_n et (PAH/PSS)₆(PLX/HA)(PLL/PGA)_n, a été évalué en fonction du degré d'enfouissement des complexes, pour des cellules cultivées à leur surface

pendant une période de 4 jours. Il apparaît que, pour des structures constituées de chitosane et d'acide hyaluronique, la transfection, après 4 jours de culture, est possible jusqu'à $n = 10$ pour des cellules de type Huh-7. Lorsque les complexes sont enfouis sous un film de poly(lysine) et de poly(acide glutamique), on observe une transfection jusqu'à $n = 3$.

L'enfouissement de complexes est donc possible dans une multicouche mais celle-ci nécessite la création d'une barrière pour éviter la décomplexation de l'ADN en présence de certain polyélectrolytes. Ha peut jouer un rôle protecteur au sein de la multicouche. En effet PGA diffuse au sein de la multicouche (Picart et al., 2002) mais cette diffusion n'entraîne pas la décomplexation de l'ADN en présence de HA.

L'enfouissement des complexes va permettre d'utiliser ces structures comme des réservoirs contenant plusieurs couches de complexes. En faisant varier le type de polyélectrolyte utilisé et le niveau d'enfouissement on pourra contrôler la dégradabilité de ces architectures et l'accessibilité de l'ADN au cours du temps.

2. Article 2 : “*Polyplex-embedding in polyelectrolyte multilayers as gene delivery platform*”

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Polyplex-embedding in polyelectrolyte multilayers for gene delivery

Florent Meyer, Vincent Ball, Pierre Schaaf, Jean Claude Voegel and Joelle Ogier

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006, Volume 1758, N° 3, Pages 419-422

Pages 419 – 422 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.015>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Chapitre 5 Bifonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes

Introduction	170
1 Propriétés anti-inflammatoires de l'alpha-MSH :	171
2 Création de multicouches de polyélectrolytes à activité anti-inflammatoire par enfouissement d'alpha-MSH :	173
2.1 Résumé 3 :	173
2.2 Article 3: "Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti inflammatory agents" :	175
3 Bifonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes :	181
3.1 Introduction :	181
3.2 Caractérisation de l'architecture :	182
3.3 Caractérisation de la bifonctionnalisation :	184
3.3.1 Activation des mélanocytes par une architecture bifonctionnalisée:	184
3.3.2 Capacité de transfection des architectures bifonctionnalisées sur les mélanocytes :	187
3.3.3 Capacité de transfection des architectures bifonctionnalisées sur d'autres types cellulaires :	187
3.4 Le peptide NDP-MSH favorise-t-il la transfection ?	188
3.5 Bifonctionnalisation / compétition :	190
3.6 Conclusions :	191

La fonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes peut se faire par inclusion de protéines ou de peptides (Chluba et al., 2001 ; Jessel et al., 2004). L'accessibilité des molécules actives est dépendante du niveau d'enfouissement dans les assemblages et peut être modulée temporellement par l'utilisation de polyélectrolytes sous forme d'énantiomère D.(Jessel et al., 2005) et par la constitution de réservoirs indépendants (Garza et al., 2004 ;Mendez-Garza et al., 2005). La grande plasticité de ce procédé permet d'y inclure plusieurs molécules différentes (Onda et al., 1996).. Dans un premier temps nous avons voulu montrer que deux messages inclus au sein de la même architecture sont accessibles aux cellules cultivées à son contact. Dans cette optique nous avons testé des architectures dans lesquelles ont été inclus à la fois des polyplexes et un peptide analogue de l' α -MSH, NDP-MSH. L'inclusion du signal alpha-MSH a pour finalité le contrôle *in vivo* de la réponse inflammatoire liée à l'implantation de tout matériau. La réponse inflammatoire résultant de

l'implantation d'un biomatériau (Rothamel et al., 2005 ; Schilinger et al., 2003) doit mener à l'intégration de celui-ci au sein du tissu. Néanmoins cette réponse doit être modulée en terme d'intensité et de durée pour ne pas être délétère (Cervera-Paz et al., 2005 ; Shindo et al., 2003). L'implantation de biomatériaux peut être à l'origine de réactions inflammatoires chroniques. Cette réaction peut parfois contraindre à la dépose de prothèses par exemple et s'accompagner de fortes fièvres voir même de chocs septiques. Une interface constituée d'un système bifonctionnel pourrait donc permettre dans un premier temps de moduler la réponse inflammatoire puis de transférer les cellules au contact du matériau afin de faire produire des facteurs de croissance par exemple pour permettre une réparation tissulaire optimale.

1 Propriétés anti-inflammatoires de l'alpha-MSH :

L' α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) est un peptide de 13 résidus dérivant de l'ACTH par action de la pro-hormone convertase 2. L'ACTH dérivant de la proopiomelanocortine par action de la pro-hormone convertase 1 (Getting, 2002). La proopiomelanocortine est produite par les cellules pituitaires. Cette hormone présente dans le sérum à une concentration constante intervient dans de nombreux processus physiologiques comme la réponse immunitaire, la régulation de la prise alimentaire et donc le contrôle de la prise de poids, et la pigmentation cutanée (Wikberg et al., 2000 ; Catania et al., 2000). L'expression d' α -MSH a été décrite pour d'autres types cellulaires que les cellules pituitaires, comme les monocytes, les macrophages (Rajora et al., 1996), les astrocytes (Wong et al., 1997), les cellules gastro-intestinales (Larsson, 1981) et les kératinocytes (Lunger et al., 1993). L'action de cette hormone est médiée par les récepteurs (MCR1 à MCR5) aux mélanocortines. L'expression de ces récepteurs est spécifique de certains tissus (Salazar-Onfray et al., 2002 ; Voisey et al., 2003). L'action immunomodulatrice de l'alpha-MSH s'exerce par action centrale et par action périphérique. Au niveau périphérique, elle est liée à l'activation des récepteurs MC1R et MC3R. L'action de l' α -MSH est multiple (figure 5-1). Elle inhibe la production de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IL}1\beta$ par des cellules sanguines activées par le LPS (Luger et al., 2003). Le même type d'action a été observé pour des cellules mononuclées du sang périphérique au cours d'une infection par le HIV (Catania et al., 1998). De même, elle entraîne la production d' $\text{IL}10$ par des monocytes activés par le LPS et inhiberait l'expression de CD86 (co-activateur majeur des lymphocytes T) (Luger et al. 2003). Son implication dans l'inhibition d'iNOS après activation de cellules murines de type RAW 64.7 par du LPS ou de

l'INF γ , a également été démontrée (ref). Au niveau des cellules endothéliales, l' α -MSH inhibe l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1 et E-selectin après activation par le LPS (Scholzen et al., 2003). Ce phénomène entraînerait une baisse du recrutement des cellules immunitaires. Sur ce même type cellulaire la production d'IL-8 semble augmentée en présence d' α -MSH ce qui semble en contradiction avec une action anti-inflammatoire. Cependant la réponse migratoire des polynucléaires neutrophiles à l'IL-8 est diminuée en présence d' α -MSH et la production d'IL-8 par les cellules endothéliales pourrait jouer un rôle dans l'angiogénèse et la cicatrisation. L' α -MSH a la même action sur des cellules fibroblastiques du derme. L' α -MSH est également un antagoniste du récepteur de l'IL-1 β (Tonosaki et al., 2005). Cette action serait à l'origine de l'effet antipyrétique de l'hormone.

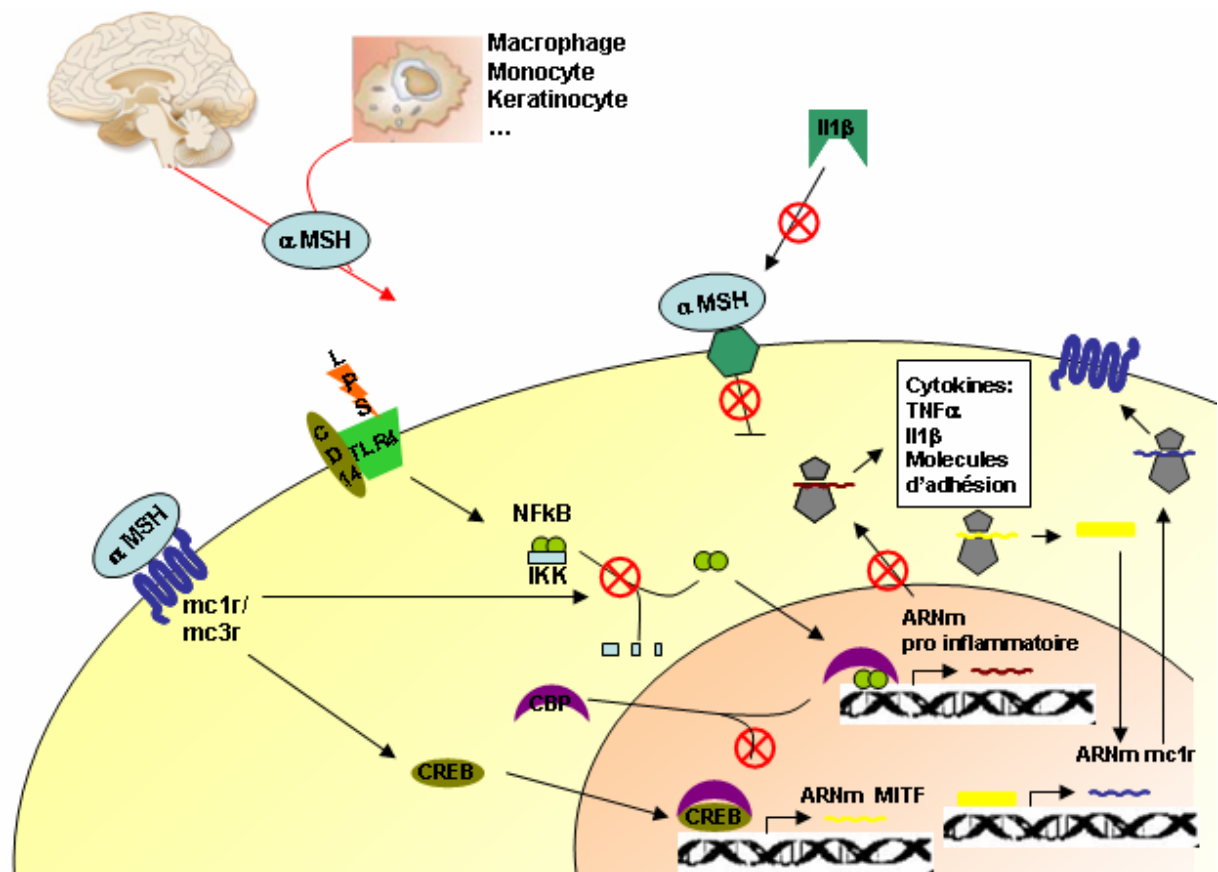


Figure 5-1 : Représentation schématique des mécanismes d'action anti-inflammatoire de l'alpha-MSH.

L'action anti-inflammatoire de l'hormone est directement liée au tripeptide N-terminal de la séquence (KPV) (Hiltz et al., 1991 ; Lipton et al., 1997). Elle ne semble pas liée directement à la fixation sur les récepteurs. Néanmoins il a été montré qu'au niveau cellulaire l' α -MSH exerce son activité en inhibant la dégradation de IKK (Ichiyama et al., 1999 ;

Kalden et al., 1999). Cette inhibition entraîne l'inhibition du facteur de transcription NF κ B. Ce facteur de transcription est à l'origine de l'expression du TNF α et d'autres cytokines après activation des voies de transduction associées aux "Toll like receptors" (TLR). L'activation du récepteur MC1R est également à l'origine de l'activation de l'expression du facteur de transcription "Microphthalmia Transcription Factor" (MITF). Ceci constitue une boucle d'activation puisque l'expression du récepteur MC1R est sous contrôle de MITF (Aoki et al., 2002). L'expression de MITF est elle-même sous le contrôle de CREB, ce facteur de transcription nécessitant comme co-facteur de transcription CBP. CBP est également le co-facteur de NF κ B. CBP est donc un facteur limitant des deux processus. C'est par ce phénomène que l'activation de MC1R inhibe NF κ B.

Les récepteurs aux mélanocortines sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur activation va mener à leur internalisation. Le récepteur peut alors être dégradé avec son ligand ou bien être recyclé et transporté à nouveau vers la membrane cytoplasmique (Scott et al., 2004).

L' α -MSH favorise également la prolifération et la pigmentation des mélanocytes. La production de mélanine par ces cellules intervient après exposition aux rayonnements ultraviolets. Elle constitue un système de protection de l'ADN (Eves et al., 2005).

Cette hormone joue donc un rôle central de régulation locale de l'inflammation. Ainsi, au cours d'arthrite chronique on observe une augmentation de la concentration d' α -MSH locale (Ceriani et al., 1994). Son expression au niveau systémique est d'ailleurs augmentée au cours de pathologies inflammatoires.

2 Création de multicouches de polyélectrolytes à activité anti-inflammatoire par enfouissement d' α -MSH :

Résumé 3 :

Dans ce travail préliminaire à la bifonctionnalisation, nous avons testé l'action anti-inflammatoire d'un dérivé de l' α -MSH après son inclusion dans des multicouches de type (PLL/PGA) $_n$, Chluba et al.(2001) ayant auparavant démontré la possibilité d'inclure ce type de peptide dans une multicouche en greffant de manière covalente un analogue de l' α -MSH à PLL. Les auteurs montrent ainsi que le peptide reste actif et peut stimuler des

mélanocytes cultivés à leur contact. Nous avons utilisé un autre analogue de l'alpha-MSH, NDP-MSH, comportant la séquence tripeptidique terminale porteuse de l'activité anti-inflammatoire (fig. 5-2). Ce peptide présente une activité 10 fois supérieure au peptide natif et une plus grande résistance aux protéases sériques ce qui lui confère une plus grande stabilité dans le temps (Sawyer et al., 1980)

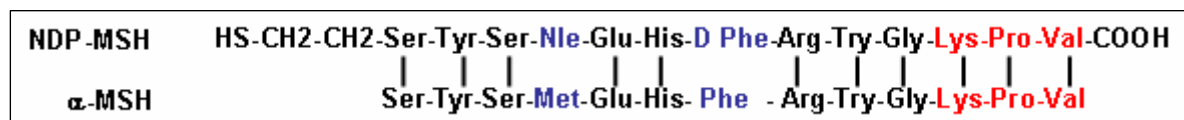


Figure 5-2 : Comparaison de la séquence du peptide NDP-MSH, utilisé pour fonctionnaliser des multicouches de polyélectrolytes, avec celle de l'alpha-MSH. Le peptide comporte la séquence C-terminale porteuse de l'activité anti-inflammatoire.

Pour pouvoir inclure celui-ci dans une multicouche nous l'avons greffé à PGA par sa partie N-terminale. Dans un premier temps l'action anti-inflammatoire du peptide greffé a été testée en solution. Le modèle utilisé est la réponse de monocytes activés par le LPS. Deux marqueurs ont été utilisés afin d'évaluer l'efficacité du peptide : la production de TNF α , cytokine pro-inflammatoire témoignant de l'activation de la voie TLR4 par le LPS et l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, dont l'expression est régulée positivement par l'alpha-MSH. Le peptide NDP-MSH, après greffage, garde la même activité *c.à.d.* diminue l'expression de TNF α et induit l'expression d'IL-10. La construction effective d'une multicouche de type (PLL/PGA α -MSH)_n a été suivie par microbalance à cristal de quartz. L'activité anti-inflammatoire de ces architectures a été testée. Quelque soit le nombre de couches de PGA α -MSH, la production de TNF α est diminuée. Cette diminution est même prolongée dans le temps si l'on se réfère à l'action du peptide en solution. En effet on observe une diminution de la production de TNF α jusqu'à 8h après induction. De même les cellules activées par le LPS, cultivées sur ces architectures, produisent de l'IL-10 en réponse à la stimulation par le peptide. Cette production est plus précoce que lorsque le peptide est en solution. Elle débute en effet 6h après le début de la culture sur ces architectures alors qu'en solution elle n'intervient que 8h après la stimulation avec le peptide.

Enfin par microscopie à force atomique, la morphologie des cellules cultivées sur ces architectures a été étudiée. Il apparaît que sur des architectures fonctionnalisées avec NDP-MSH les cellules produisent des pseudopodes. De telles formations ne sont pas visibles sur

des cellules cultivées sur des architectures non fonctionnalisées et sont la preuve de l'activation effective des cellules par le peptide.

L'architecture présentée ici permet donc le contrôle de la réponse inflammatoire au cours de ses premières phases.

2.1 Article 3: “Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents” :

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Control of Monocyte Morphology on and Response to Model Surfaces for Implants Equipped with Anti-Inflammatory Agent

N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, **F. Meyer**, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher, J.-C. Voegel

Advanced Materials, 2004, Volume 16, Issue 17, Pages 1507-1511

Pages 1507 à 1511 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

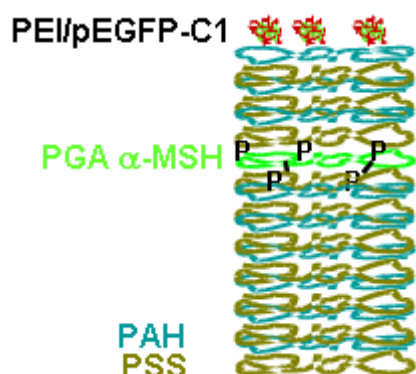
Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/109630625/HTMLSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

3 Bifonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes :

Introduction :

Le développement de biomatériaux novateurs en tant qu'objets biochimiques capables de diriger les fonctions cellulaires joue un rôle essentiel dans celui des stratégies d'ingénierie tissulaire et de médecine réparatrice. Idéalement ces biomatériaux doivent être modulables aussi bien dans le type de message qu'ils délivrent, qui doit pouvoir être multiple, mais également temporellement pour permettre le contrôle des différentes phases de processus complexes comme la cicatrisation ou la régénération tissulaire. Dans le cadre des multicouches de polyélectrolytes une première étape a été franchie par la démonstration que la fonctionnalisation est possible par l'inclusion de protéines et de peptides. La modularité temporelle est possible par la formation de films composites, constitués de différents types d'architectures présentant des comportements différents en terme de dégradation. Ainsi Mendez-Garza en 2005 ont montré que des films de types (PLL/HA)_n constituent des réservoirs qui peuvent être séparés par des films de PLGA. En jouant sur la dégradation des films de PLGA, les auteurs permettent la libération séquentielle des fluorophores enfouis dans les différents réservoirs de (PLL/HA)_n. La création de films présentant plusieurs fonctions, représentées par différentes protéines ou peptides, va permettre dans une même unité temporelle d'exercer différents messages sur l'environnement cellulaire. L'inclusion d'un peptide anti-bactérien et de facteurs de croissances, par exemple, permet un contrôle de l'environnement cellulaire au cours de phénomènes de cicatrisation.



Nous avons donc testé la bifonctionnalisation d'une architecture de type (PAH/PSS)_n. Deux messages modèles, dont l'activité au sein d'une multicouche de polyélectrolytes a été définie préalablement, ont été utilisés : NDP-MSH et des polyplexes de (PEI/ADN_p) (figure ci contre). Un modèle

cellulaire de mélanocyte (cellules B16-F1) a été utilisé. En effet les mélanocytes répondent à la stimulation par l' α -MSH par la production de mélanine qui est facilement détectable.

L'efficacité de transfection a été évaluée comme précédemment par la production d'EGFP. L'architecture modèle étudiée est $(\text{PAH/PSS})_6(\text{PAH/PGA-NDP-MSH})(\text{PAH/PSS})_3\text{PLX}$.

Nous démontrons de cette façon la potentialité de fonctionnalisation multiple au sein d'une même architecture. De plus l'emploi de polyplexes devrait permettre la conservation du message correspondant à plus long terme que de celui du peptide, ce qui pourrait constituer également une modulation temporelle des messages. Enfin, le principe de pluri-fonctionnalisation pourra également être exploité dans l'optimisation de l'efficacité de transfection des architectures.

3.1 Caractérisation de l'architecture :

L'incorporation de PGA-NDP-MSH au sein d'une architecture $(\text{PAH/PSS})_n$ a été suivie par spectroscopie par guide d'onde optique. Le PGA modifié est incorporé par adsorption, au cours de la construction, d'une solution de 200 $\mu\text{g/ml}$ sur un film se terminant par PSS. La construction de l'architecture est poursuivie par adsorption séquentielle de PAH et PSS. L'évolution de la masse optique montre que PGA-NDP-MSH s'adsorbe sur un film $(\text{PAH/PSS})_3\text{PAH}$ mais également que la construction peut être poursuivie (figure 5-4). L'OWLS n'apportant que des données sur la quantité de matériel déposé, l'intégrité du film construit au dessus de la couche de PGA-NDP-MSH a été objectivée par AFM. Les surfaces fonctionnalisées ont des caractéristiques identiques à celles d'un film $(\text{PAH/PSS})_n$ (figure 5-5). Leur aspect est homogène et leur rugosité de surface identique : 2.3 nm pour $((\text{PAH/PSS})_{10})$ et 2.38 nm pour $((\text{PAH/PSS})_6(\text{PAH/PGA-NDP-MSH})(\text{PAH/PSS})_3)$.

L'adsorption des complexes sur une architecture fonctionnalisée avec PGA-NDP-MSH est objectivée par microscopie AFM. Comme on peut le voir sur la figure 5-4, les complexes adsorbés sur ce type d'architecture présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que celles décrites pour des architectures non fonctionnalisées (cf chap 3). La présence du peptide ne modifie donc pas les caractéristiques des complexes adsorbés.

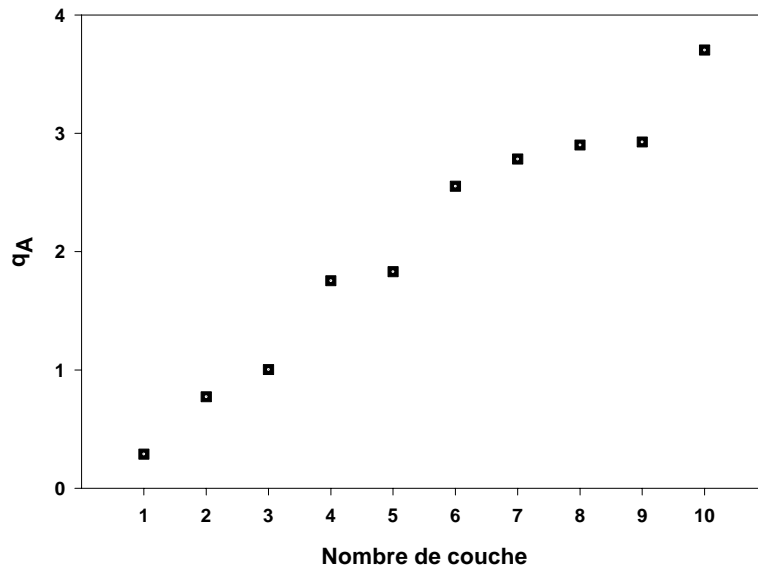


Figure 5-3 : Evolution de la masse optique, évaluée par OWLS, lors de la construction d'un film (PAH/PSS)₃(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS).

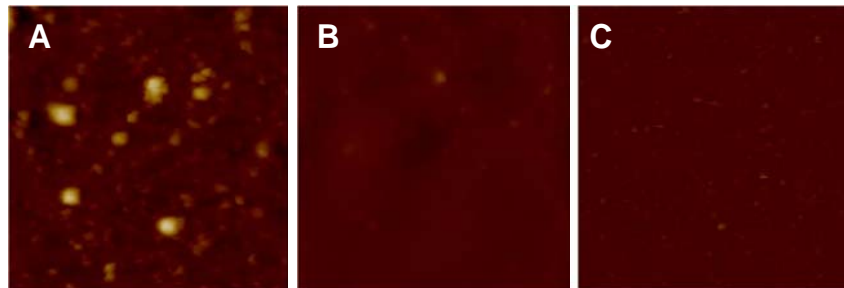


Figure 5-4 : Images AFM des films bifonctionnalisés (5 X 5 μm)

(A) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX

(B) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃

(C) (PAH/PSS)₁₀

Les complexes (PLX) ont été formés selon un ratio N/P = 12.

3.2 Caractérisation de la bifonctionnalisation :

3.2.1 Activation des mélanocytes par une architecture bifonctionnalisée:

L'action de cette architecture a été testée sur un modèle cellulaire de mélanocyte, les cellules B16-F1. Les mélanocytes après stimulation par de l'alpha MSH produisent de la mélanine. Cette réponse est facilement caractérisable par dosage de la mélanine intracellulaire (cf mat et met). Des cellules B16-F1 ont été cultivées sur des architectures bifonctionnalisées. Leurs réponses, en terme de production de mélanine et de transfection, ont été objectivées par microscopie (figure 5-5) et par dosage de la mélanine (figure 5-6).

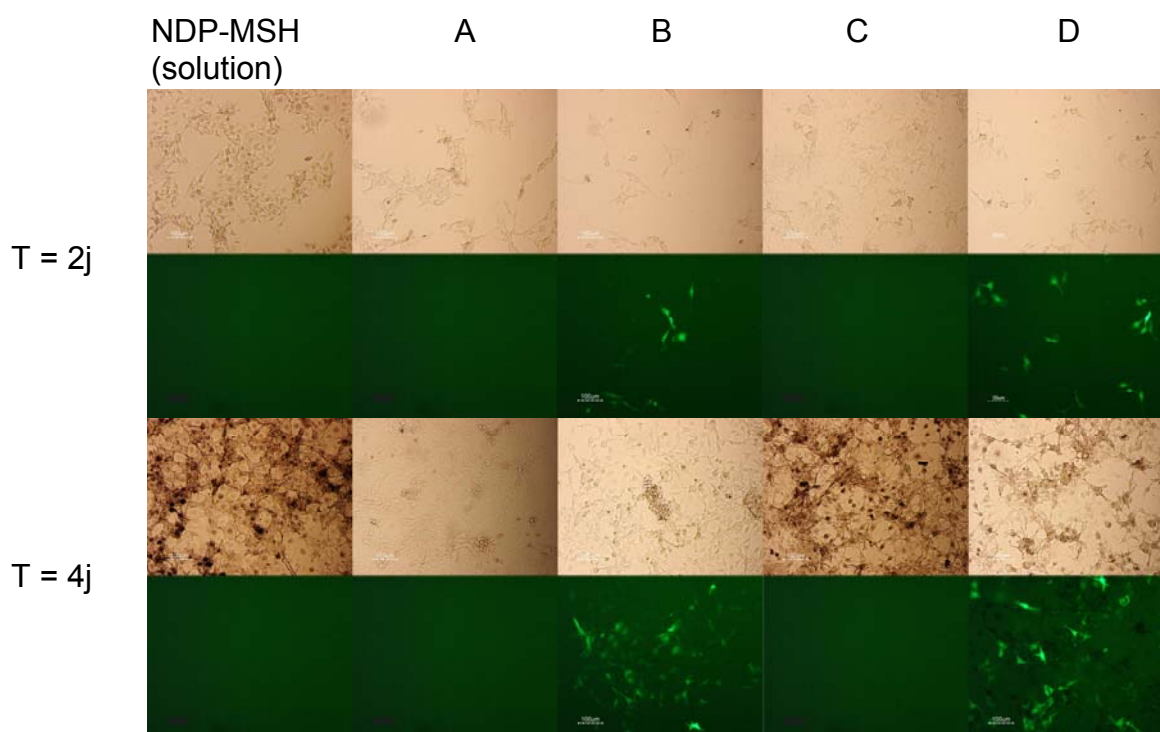


Figure 5-5 : image en microscope optique et à épi-fluorescence de cellules B16-F1 cultivées sur différentes architectures :

(A) (PAH/PSS)₆

(B) (PAH/PSS)₆PLX

(C) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃

(D) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX

Une culture activée par le peptide libre (100 µg/ml) a servi de témoin pour la production de mélanine.

Les complexes seuls n'induisent pas la production de mélanine. Les cellules cultivées sur l'architecture bifonctionnalisée (architecture D), sont transfectées dès deux jours de culture et produisent de la mélanine de manière significative dès le quatrième jour de culture (figure 5-

5). La production de mélanine semble moins importante que celle des cellules cultivées sur l'architecture C, qui ne comporte pas de complexes. Cette observation a été confirmée par le dosage de la mélanine intra-cellulaire (figure 5-6). Les cellules cultivées sur une architecture bifonctionnalisée produisent $1,01 \pm 0,27 \mu\text{g}$ de mélanine/ 10^4 cellules alors que les cellules cultivées sur l'architecture monofonctionnalisée (C) produisent $1,17 \pm 0,62 \mu\text{g}$ de mélanine/ 10^4 cellules.

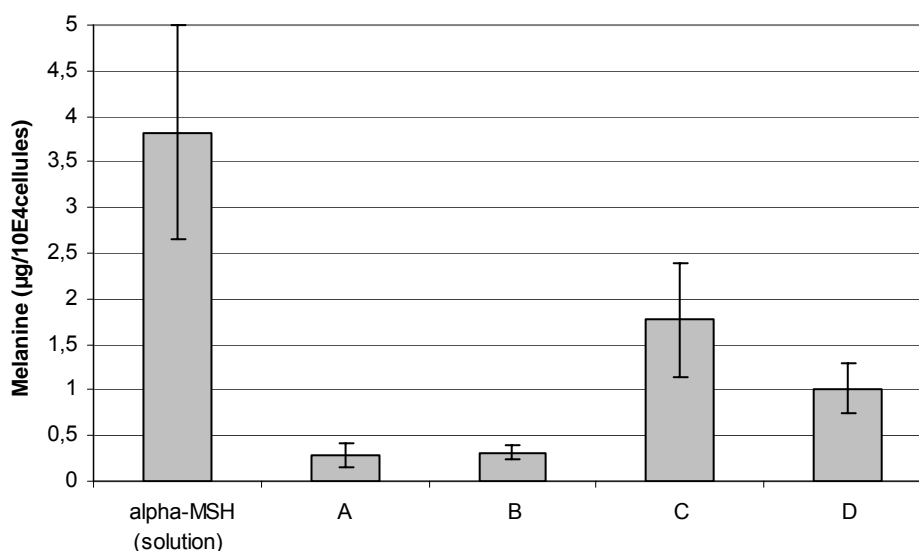


Figure 5-6 : Dosage de la quantité de mélanine intra cellulaire produite par des B16-F1 cultivées sur différentes architectures.

(A) (PAH/PSS)₆

(B) (PAH/PSS)₆PLX

(C) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃

(D) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX

Les cellules transfectées par le plasmide pEGFP-C1, exprimant l'EGFP, peuvent être isolées par triage en cytométrie en flux. Leur réponse à l'analogue de l'alpha-MSH peut donc être isolée par rapport à la réponse de la population entière (figure 5-7). Les cellules transfectées sur l'architecture D (bifonctionnalisée) produisent $51,1 \text{ pg}$ de mélanine par cellule alors que les cellules transfectées sur une architecture sans alpha MSH (B) ne produisent que 12 pg par cellule. Les cellules transfectées répondent à la stimulation induite par le peptide. Ceci est corroboré par des observations en microscopie confocale (figure 5-8). Des cellules B16-F1 ont été cultivées sur une architecture (PAH/PSS)₆(PAH/PGA-NDP-MSH^{Rho})(PAH/PSS)₃PLX dont les complexes ont été marqués à la fluorescéine. 6 h après la mise en culture des cellules on peut observer des complexes isolés situés dans le cytoplasme. Le cytoplasme de certaines cellules est marqué également par NDP-MSH^{Rho}. L'endocytose, à partir des films, des complexes marqués à la fluorescéine et l'internalisation du peptide

marqué à la rhodamine sont des événements concomitants. L'internalisation du peptide marqué également l'activation des cellules puisque ce sont les récepteurs activés qui sont internalisés avec leur ligand. Le même type d'image a été observé pour une architecture $(\text{PAH/PSS})_6(\text{PAH/PGA}^- \text{NDP-MSH}^{\text{Rho}})(\text{PAH/PSS})_8\text{PLX}$. Le film $(\text{PAH/PSS})_8$ ne constitue pas une barrière à l'endocytose du peptide.

La différence de production de mélanine observée précédemment n'est donc pas le fait de la présence de deux populations cellulaires, l'une transfectée et l'autre stimulée par le peptide. Sur l'architecture D, la production de mélanine est donc légèrement inhibée.

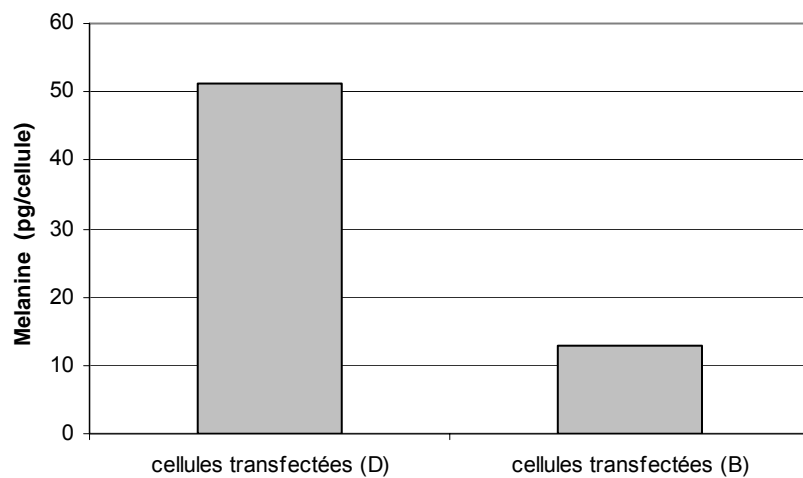


Figure 5-7 : Dosage de la quantité de mélanine produite par les cellules transfectées.

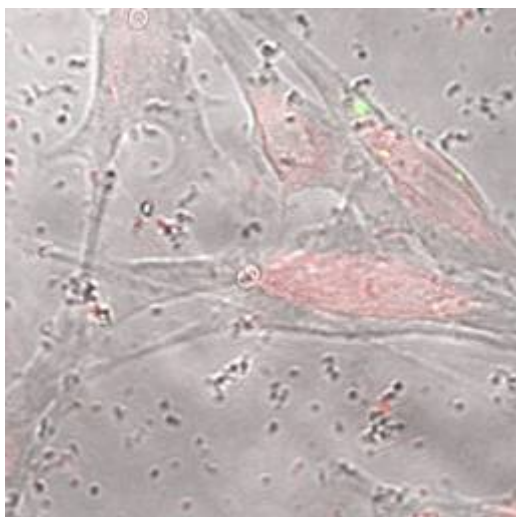


Figure 5-8 : Image de cellules B16-F1 cultivées sur une architecture bifonctionnée par $\text{NDP-MSH}^{\text{RHO}}$ et des complexes $(\text{PEI/pEGFP-C1}^{\text{FITC}})$ après 6h de culture.

3.2.2 Capacité de transfection des architectures bifonctionnalisées sur les mélanocytes :

Le nombre de cellules transfectées a été évalué par cytométrie en flux après quatre jours de culture. **18,27 à 43,31%** (moyenne $27,231 \pm 8,81\%$) des cellules cultivées sur (PAH/PSS)₁₀ PEI/pEGFP-C1 et **9,5 à 43,71%** (moyenne $23,32 \pm 12,56\%$) des cellules cultivées sur (PAH/PSS)₆ (PAH/ NDP-MSH) (PAH/PSS)₃ PEI/pEGFP-C1 sont transfectées. L'incorporation du peptide n'a donc pas d'effet notable sur l'efficacité de transfection de ces architectures.

3.2.3 Capacité de transfection des architectures bifonctionnalisées sur d'autres types cellulaires :

Le pouvoir de transfection d'architectures bifonctionnalisées a été évalué pour d'autres types cellulaires. Deux types cellulaires complémentaires ont été choisis : les Thp-1 exprimant des récepteurs aux mélanocortines (MC1r et MC3r) et les Huh-7 n'exprimant pas de récepteurs aux mélanocortines. Ces deux types cellulaires ont été cultivés sur trois types d'architectures :

(PAH/PSS)₆PLX

(PAH/PSS)₆(PAH/PGA- NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX

(PAH/PSS)₉(PAH/PGA- NDP-MSH)PLX, les complexes étant formés avec pEGFP-C1.

Le taux de transfection a été évalué, par cytométrie en flux, après 2 et 4 jours de culture.

Quelle que soit l'architecture et le temps de contact, les cellules de type Thp-1 se transfectent très mal (moins de 1% de cellule transfectée). L'adjonction du peptide ne favorise pas l'interaction avec la multicouche ni la transfection.

Pour les cellules de type Huh-7, après deux jours de culture, on observe une nette augmentation du nombre de cellules transfectées à partir des architectures bifonctionnalisées (66 % sur (PAH/PSS)₆(PAH/PGA- NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX contre 20 % pour (PAH/PSS)₆PLX). L'architecture (PAH/PSS)₉(PAH/PGA- NDP-MSH)PLX a un pouvoir de transfection pratiquement nul (figure 5-9). Après 4 jours de culture on peut observer la même tendance mais celle-ci est moins marquée. Pour les architectures monofonctionnalisées (PAH/PSS)₆PLX, on observe une stabilisation du niveau de transfection alors que pour les architectures bifonctionnalisées on observe une chute de 50 % d'activité. Cependant l'activité de ces dernières reste supérieure à celle des architectures monofonctionnalisées. En effet les

cellules cultivées sur l'architecture bifonctionnalisée sont transfectées à 30 % alors que les cellules cultivées sur une architecture sans NDP-MSH sont transfectées à 20 %. L'incorporation du peptide induit donc une augmentation de l'efficacité de transfection des complexes PEI/ADNp adsorbés sur une multicouche de type (PAH/PSS)_n.

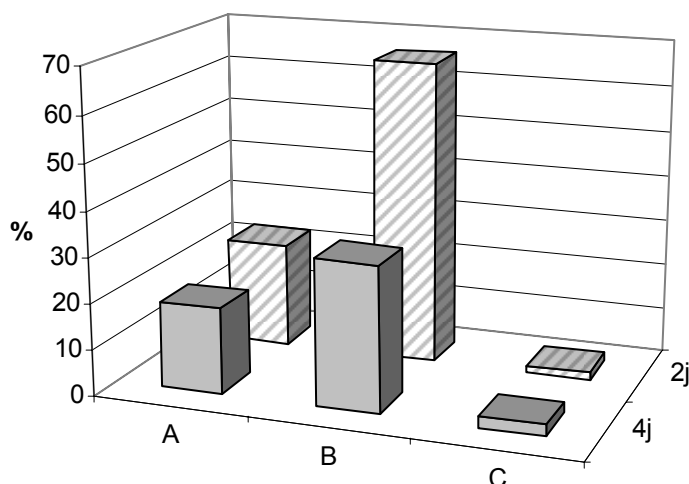


Figure 5-9 : Evolution du taux de transfection d'architectures bifonctionnalisées sur des cellules hépatocytaires (Huh-7). Le taux de transfection est exprimé en pourcentage de cellules exprimant le transgène (EGFP). Les architectures testées sont

(A) (PAH/PSS)₆PLX

(B) (PAH/PSS)₆(PAH/PGA- NDP-MSH)(PAH/PSS)₃PLX

(C) (PAH/PSS)₉(PAH/PGA- NDP-MSH)PLX

Les complexes (PLX) ont été formés à N/P = 12.

3.3 Le peptide NDP-MSH favorise-t-il la transfection ?

L'emploi d'un peptide spécifique au cours de la transfection relève en général de stratégies visant le ciblage cellulaire et l'augmentation de l'efficacité de transfection. Différents ligands spécifiques ont été décrits pour ces indications comme les folates pour les cellules cancéreuses (Verbaan et al., 2005 ; Chul Cho et al., 2005), l'insuline (Forrest et al., 2005) ou la transferrine (Bellocq et al., 2003).

L'alpha MSH est un peptide ambivalent qui a démontré des caractéristiques anti-bactériennes (Cutuli et al., 2000), une activité anti-inflammatoire (Zhong et al., 2005) et qui intervient dans de nombreux autres mécanismes tels que la pigmentation et la régulation des prises alimentaires. Son emploi à des fins de ciblage a été utilisé pour la visualisation de métastases

de mélanome malin (Tatro et al., 1992) ainsi qu'en transfection (Chluba et al., 2001). L'utilisation de ce peptide dans une multicouche de polyélectrolytes comportant également des polyplexes relève quant à elle de la volonté de bifonctionnaliser ces architectures pour orienter la réponse cellulaire et également augmenter l'efficacité de transfection. Ces architectures présentent un signal, récepteur-dépendant, et un second signal non spécifique. Elle permettent donc l'activation spécifique de certains types cellulaires, comme les mélanocytes, par incorporation d'un ligand spécifique, et la transmission d'un message ubiquitaire via la transfection.

L'incorporation d'alpha MSH dans l'architecture ne mène pas à l'augmentation de l'efficacité de transfection sur les cellules B16-F1. Pourtant l'emploi de ce peptide dans des complexes formés à partir de lipospermine permet de multiplier l'efficacité de transfection de 70 fois sur des cellules B16-F1. Ce phénomène n'est pas récepteur-dépendant puisque l'efficacité de transfection de ces complexes sur des cellules B16-G4F, ne possédant pas de récepteurs spécifiques, est multipliée par 700 (Chluba et al., 2000). Les auteurs émettent l'hypothèse d'une action membranaire non spécifique du récepteur. Certaines hormones, se fixant sur des récepteurs couplés aux protéines G, interagissent directement avec des bicouches lipidiques (Gremlich et al., 1983 ; Sargent et al., 1986). Plus récemment, il a été montré que l'alpha-MSH peut pénétrer dans une bicouche lipidique (Biaggi et al., 1996 , 1997 ; Macedo et al., 1996). La présence du peptide peut donc entraîner des déstabilisations membranaires localisées. D'ailleurs en présence de NDP-MSH l'efficacité de transfection sur des cellules de type Huh-7 est multipliée par trois après deux jours de culture. Or ces cellules ne possèdent pas de récepteurs aux mélanocortines (Voisey et al., 2003). D'autres mécanismes sont donc en jeu. Ce phénomène est moins flagrant après quatre jours de culture. Ceci peut être lié à l'épuisement des complexes en surface puisque la quantité d'ADN adsorbée est relativement faible (cf chap 3). Les complexes PEI/ADNp traversant la barrière nucléaire préférentiellement au cours de la mitose (Brunner et al., 2000 ; Ogris et al., 2002), la diminution d'activité peut être liée à l'arrêt de la prolifération cellulaire *in vitro*, par inhibition de contact lorsque la culture est à confluence. L'alpha-MSH a une action positive sur la prolifération des mélanocytes. Mais l'emploi de fortes concentrations de tyrosine dans le milieu de culture des mélanocytes, comme nous l'avons fait, peut inhiber leur prolifération (Schwahn et al., 2001). Le ralentissement de la prolifération peut expliquer en partie pourquoi on n'observe pas d'augmentation du taux de transfection. Mais si l'effet de l'alpha MSH n'est pas spécifique, il s'applique à tous les types cellulaires. Or nos expériences sur les Thp-1 ont

été sans résultat. Ces cellules n'adhèrent pas au substrat de transfection et l'enfouissement du peptide sous (PAH/PSS)₃ peut écranter son action.

La position du peptide par rapport aux complexes dans la multicouche joue également un rôle. En effet on observe une chute importante du taux de transfection lorsque les complexes sont adsorbés directement sur PGA NDP-MSH. L'adsorption des complexes est liée à la charge de surface de l'architecture. Un encombrement stérique généré par l'analogue de l' α MSH peut gêner l'adsorption des complexes.

3.4 Bifonctionnalisation / compétition :

L'incorporation d'un peptide au sein d'une architecture confère à celle-ci une fonction spécifique. Cette fonction peut être générale ou spécifique. Dans le cadre de l' α -MSH nous avons vu que ces architectures ont des propriétés anti inflammatoires.

L'adsorption des complexes sur de telles architectures donne au substrat une fonction additionnelle déterminée par le transgène inséré dans le plasmide. Ainsi nous avons créé une architecture ambivalente possédant deux fonctions dont l'activité est spécifique à un type cellulaire. Les mélanocytes cultivés à leur contact sont transfectés mais produisent également de la mélanine en réponse à la stimulation par l' α -MSH. Les mêmes cellules répondent aux deux stimuli. Mais l'action de l' α MSH semble inhibée par la transfection puisque les cellules transfectées produisent moins de mélanine. Cette inhibition peut intervenir à deux niveaux soit extracellulaire, soit intracellulaire. Les voies de transduction du signal intracellulaire peuvent posséder des facteurs communs. La voie d'activation liée à TLR4 présente en commun avec la voie d'activation liée à MC1r un co-facteur de transcription (Aoki et al., 2002). L'activation concomitante des deux voies peut mener à une compétition pour le facteur commun et à l'inhibition de l'une voire des deux voies. Dans une architecture de type multicouche les signaux sont présents au niveau de couches différentes. Une couche de peptide ou de protéine peut faire écran à une couche sous-jacente. Chluba et al. (2003) ont montré que l'activation des mélanocytes sur des architectures fonctionnalisées par de l' α -MSH passe par la formation de pseudopodes permettant de sonder la multicouche. Ce phénomène a été montré pour des films (PLL/PGA)_n et (PAH/PSS)_n. La surface étudiée ici, recouverte partiellement de PEI sous forme de complexes ou libre, constitue peut être un filtre empêchant l'ensemble des cellules d'accéder au peptide sous-jacent. Enfin il faut noter que les cellules de type B16-F1 présentent à leur surface peu de récepteurs spécifiques à

l'alpha-MSH (10 000 / cellules) (Siegrist et al., 1989). Ceci est faible comparé au taux d'expression d'autres récepteurs utilisés pour le targeting comme le récepteur des folates ($2,5 \cdot 10^5$ /cellule) (Sharma et al., 1994). La répartition des récepteurs n'est peut être pas homogène dans les renflements de la membrane cytoplasmique formant les pseudopodes.

Enfin l'activation d'une voie peut mener à l'inactivation du récepteur. Le système des films multicouche permet une stimulation des cellules sur de longues périodes. Or Wong et al. (1996) ont montré que l'activation des récepteurs MC1R par l'alpha-MSH entraînait une inhibition prolongée de l'expression des récepteurs chez les B16-F1. L'inhibition prolongée, alliée à la stimulation continue, peut donc conduire à une diminution prolongée de l'activité.

3.5 Conclusions :

L'étude présentée ici décrit un premier exemple de film multicouche contenant plusieurs fonctions et met en évidence des paramètres-clef à considérer. Tout d'abord le choix des voies de signalisation à activer doit être réfléchi au moment du choix du peptide et du transgène, afin de ne pas produire d'action antagoniste. De plus il faut prendre garde à l'incorporation des complexes en présence de résidus peptidiques, car les caractéristiques biochimiques de ces derniers peuvent interférer avec l'adsorption des complexes sur la multicouche. Il faut donc trouver un équilibre entre l'enfouissement nécessaire des peptides et la préservation de leur accessibilité. Enfin l'incorporation de peptides à distance des complexes, constitue une piste pour l'amélioration de l'efficacité de transfection des films multicouches sans modifier les complexes. Le principe de film multicouche démontre ici sa grande souplesse d'utilisation.

Conclusions et perspectives

Dans ce travail de thèse j'ai pu démontrer l'utilisation possible de films multicouches de polyélectrolytes pour le transfert de gène *in vitro*. Ces structures pourraient en effet servir de réservoir pour des complexes formés de PEI et d'ADN plasmidique dont l'accessibilité serait dépendante des polyélectrolytes employés et de leur dégradabilité.

Le choix de ce type de stratégie s'est basé sur la simplicité de mise en œuvre de ces architectures et surtout sur leur extrême modularité. Précédemment à ce travail, des travaux réalisés au sein de mon laboratoire d'accueil mais également dans d'autres unités de recherche, sur la fonctionnalisation de ces architectures, ont montré la possibilité d'agir sur le comportement cellulaire ds cellules cultivées à leur contact, par inclusion de peptides ou de protéines, ainsi qu'une bonne biocompatibilité *in vivo*. L'inclusion d'ADN représente une étape supplémentaire qui va permettre d'agir sur les tissus à plus long terme. En effet l'ADN est une molécule stable dans le temps. Le message fonctionnel peut donc être délivré sur de plus longues périodes que par l'intermédiaire de protéines ou de peptides qui peuvent être dénaturés. D'ailleurs plusieurs équipes travaillant sur les multicouches de polyélectrolytes ont publié des travaux sur le sujet au cours de ce travail montrant l'intérêt croissant de cette approche. Ces publications sont évoquées dans la première partie. Cette évolution fait partie d'un courant général qui a vu naître les GAMs dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Mais ce travail s'inscrit surtout dans l'optique de produire un système de transfection locale. En effet, la transfection localisée au niveau d'un tissu permet de contourner un certain nombre de barrières à la transfection par voie systémique. Ces techniques permettent un meilleur ciblage des tissus concernés par la transfection, une plus faible cytotoxicité et de ce fait la possibilité d'augmenter la charge d'ADN administré et donc également l'efficacité de transfection. Ce travail s'inscrit donc dans la volonté de développer un système de transfection locale efficace pour des applications *in vivo*.

Mon travail s'est articulé en trois phases, qui correspondent à une évolution raisonnée devant mener à la compréhension des mécanismes qui interviennent lors de l'incorporation de l'ADN au sein de l'architecture, mais également de la mécanique de transfection cellulaire. Nous avons décidé d'inclure l'ADN sous forme de complexes avec un polyélectrolyte. En effet, l'ADN nu n'est que faiblement efficace dans les protocoles de transfection. C'est pourquoi, l'inclusion de complexes dont les caractéristiques sont connues présente un

avantage certain. Le choix du vecteur s'est porté sur le PEI 22 kDa linéaire en tenant compte des données de la littérature qui font état d'une bonne efficacité et d'une toxicité limitée. De plus ce polyélectrolyte est couramment utilisé pour la formation de films multicouches. Notre choix s'est donc porté sur l'inclusion de complexes de PEI/ADN dans des multicouches de polyélectrolytes. Le choix de cette stratégie a généré de multiples questions : comment ces complexes peuvent-ils être inclus dans l'architecture ? Conservent-ils leurs caractéristiques et leur activité ? Comment la nature des composants du film peut-elle influencer sur la capacité de transfection ?

Dans un premier temps nous avons donc étudié le système le plus simple *i.e* l'adsorption des complexes à la surface de multicouches de polyélectrolytes. Cette étape a été validée avant d'envisager d'enfouir les complexes, ce système simple devant servir d'unité de base à répéter pour constituer des réservoirs. Nous avons montré que ces surfaces utilisées comme substrats de culture cellulaire ont un pouvoir de transfection et que celui-ci évolue dans le temps. En effet pour la majorité des types cellulaires étudiés, l'efficacité de transfection est faible après 24 h (inférieure à 10 %) mais évolue pour atteindre des taux de transfection jusqu'à 10 fois supérieurs au taux initiaux après 4 jours de culture. Les caractéristiques des complexes ne sont pas modifiées quelles que soit l'architecture, et leur adsorption est stable dans le temps. Néanmoins les multicouches influencent le comportement cellulaire et la transfection également. L'optimisation des capacités de transfection a été réalisée par augmentation de la quantité d'ADN adsorbée, par adsorption séquentielle de plusieurs couches de complexes, et par adjonction d'un peptide (NDP-MSH) au sein de la multicouche, la. Cette dernière méthode a permis d'obtenir jusqu'à 70 % de cellules transfectées sur une population de Huh-7 après deux jours de culture. Les mécanismes sous-jacents qui ne sont pas spécifiques des récepteurs aux mélanocortines sont à élucider afin d'optimiser les architectures.

Fort des premiers résultats, nous avons réalisé et analysé l'enfouissement des complexes. Nous avons dû faire face à un problème majeur lors de cette étape constitué par le caractère dynamique de tout complexe de polyélectrolyte. En effet l'étude des complexes a montré que ces structures sont dynamiques et que des phénomènes d'échange peuvent intervenir en présence d'autres polyélectrolytes. De l'étude systématique de l'interaction des polyanions utilisés dans nos architectures, il est apparu que seul l'acide hyaluronique ne modifie pas la structure du complexe PEI/ADNp mais qu'il s'adsorbe tout de même à sa

surface. Dans un premier temps nous avons donc validé la possibilité d'enfouir ces complexes dans des architectures de type $(\text{CHI/HA})_n$, la seule architecture précédemment étudiée contenant HA. Les complexes gardent leur activité lorsqu'ils sont enfouis sous une multicouche de type $(\text{CHI/HA})_n$. Le nombre de bicouches seuil à partir duquel on n'observe plus de transfection dans les temps courts est de 10. Au delà les complexes ne sont plus accessibles aux cellules et la dégradation de la multicouche par les cellules n'est pas suffisante aux temps courts pour rendre ces derniers accessibles. Mais l'instabilité de telles architectures fait craindre une perte d'efficacité par dégradation rapide dans des applications *in vivo*. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer les conditions permettant l'inclusion de ces complexes dans des architectures composées de (PLL/PGA) car ce sont des films plus stables. L'incorporation directe des complexes étant impossible du fait du déplacement de l'ADN de ces derniers par PGA, nous avons émis l'hypothèse que l'inclusion dans une structure mixte contenant HA est possible. Ainsi des architectures de type $(\text{PAH/PSS})_6(\text{PLX/HA})(\text{PLL/PGA})_n$ ont été testées. Par spectroscopie infra rouge et par microscopie confocale, l'intégrité des complexes a été validée. Mais surtout ces architectures peuvent transférer des cellules cultivées à leur contact jusqu'à $n = 3$. Ainsi ces structures peuvent constituer des réservoirs permettant de rendre accessible à la transfection les complexes enfouis en fonction de la vitesse de dégradation des multicouches. Il apparaît d'ailleurs que des systèmes composites peuvent être élaborés. Les systèmes de type $(\text{CHI/HA})_n$ permettent ainsi une libération précoce de l'ADN dans le milieu, tandis que des architectures de type $(\text{PLL/PGA})_n$ par dégradation progressive permettent une accessibilité prolongée des complexes au cours du temps.

L'attractivité de notre méthode de transfection, ne repose pas que sur le fait de pouvoir constituer des réservoirs. En effet cette propriété a déjà été démontrée pour de nombreuses matrices comme des matrices de collagène ou de fibrine. Les films multicouches sont de formidables boîtes à outils moléculaires dans lesquelles différentes fonctions peuvent être incluses. Ainsi Garza et al. (2004), ont montré la possibilité de constituer des réservoirs distincts au sein d'une architecture unique en utilisant des structures composites constituées de films ayant des caractéristiques différentes. L'incorporation de fonctions particulières permet dans le cadre de systèmes de transfection de contourner certaines barrières comme l'internalisation des complexes ou leur ciblage pour une population cellulaire donnée. La troisième partie de ce travail a donc permis d'explorer les capacités de bifonctionnalisation d'une multicouche de polyélectrolyte par l'emploi combiné d'un peptide et de complexes de

PEI/ADN. Le peptide que nous avons employé est un analogue de l'alpha-MSH qui procure à la multicouche une activité anti-inflammatoire. Les cellules cultivées sur ces architectures répondent aux deux stimuli. L'action de la multicouche est donc double, une action rapide provenant des peptides et une action à plus long terme provenant de la transfection des cellules et de l'action para et autocrine des protéines ainsi exprimées par les cellules. Les peptides utilisés afin de pouvoir augmenter l'efficacité de transfection ou de cibler une population cellulaire peuvent être inclus sans modifier les caractéristiques des complexes et vont permettre une action au cours du temps en fonction de leur profondeur d'enfouissement par rapport à une couche de complexe donnée.

L'emploi de films multicouches de polyélectrolytes pour le transfert de gène est une voie innovante permettant d'avoir un outil modulable qui peut être adapté à de nombreuses situations cliniques du fait de sa simplicité de mise en œuvre. L'étude présentée ici est une première étape qui nous a permis de déterminer les paramètres critiques permettant d'intégrer des complexes dans une architecture de polyélectrolyte. Les stratégies employées pour l'enfouissement des complexes pourraient être transposées à d'autres types de complexes. Ainsi l'emploi d'autres vecteurs de transfection, adaptés à une situation donnée ou présentant de meilleures caractéristiques de transfection est envisageable. D'ailleurs au sein de notre équipe deux projets développés parallèlement ont utilisé les multicouches comme matrice de transfection locale en employant un vecteur viral (adenovirus) et des cyclodextrines cationiques. Ces deux stratégies ont été validées *in vitro*.

Néanmoins le comportement à long terme de ces architectures n'a pu être exploré dans cette approche exclusivement *in vitro*. C'est pourquoi cette étude doit être complétée par l'emploi de modèles animaux pour pouvoir explorer le comportement *in vivo* des architectures fonctionnalisées et comparer l'efficacité, en terme de quantité de transfection et de durée d'action, de notre approche par rapport à des systèmes déjà bien caractérisés (matrices de PLGA ou de collagène). En effet l'efficacité d'une méthode *in vitro* n'est pas transposable *in vivo*. De plus les multicouches de polyélectrolytes sont des systèmes dynamiques, leur comportement à long terme doit être étudié afin d'assurer l'intégrité des complexes sur de longues périodes. L'optimisation de l'efficacité de transfection *in vitro* passera par la modification des méthodes de construction des films, la modification éventuelle du vecteur par des séquences de localisation nucléaires par exemple ou par l'emploi d'autres types de

vecteurs de transfection. L'emploi d'autres vecteurs peut constituer une voie intéressante, notamment pour cibler des cellules post-mitotiques comme les neurones.

L'emploi de cette technique de transfection en phase solide, de par son extrême modularité trouvera des applications tant cliniques qu'industrielles. Ainsi la multifonctionnalisation permet la transmission de messages différents dans le temps, pour contrôler toutes les phases d'une régénération tissulaire par exemple, passant du contrôle de l'inflammation, au chimiotactisme cellulaire et la production de facteurs de croissance spécifiques au tissu lésé. La connaissance plus fine des mécanismes biophysico-chimiques, intervenant au sein de la multicouche et affectant les polyplexes, et biologiques, intervenant au cours des phénomènes de transfection, devrait permettre de répondre avec précision à un problème clinique donné.

Références Bibliographiques

- Ahn CH, Chae SY, Bae YH, Kim SW. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release*. 2002 Apr 23;80(1-3):273-82.
- Ahrens, H., T.R. Baekmark, R. Merkel, J. Schmitt, K. Graf, R. Raiteri and C.A. Helm. Hydrophilic/hydrophobic nanostripes in lipopolymer monolayers. *Chemphyschem* 1(2)2000:101-106.
- Ai, H., H. Meng, I. Ichinose, S.A. Jones, D.K. Mills, Y.M. Lvov and X. Qiao. 2003. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *Journal of Neuroscience Methods* 128(1-2):1-8.
- Akasaka T, Matsuura K, Emi N, Kobayashi K. Conjugation of plasmid DNAs with lactose via diazocoupling enhances resistance to restriction enzymes and acquires binding affinity to galactose-specific lectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jul 5;260(2):323-8.
- Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*. 2005 May;7(5):657-63.
- Allen, T. Particle size measurement; Chapman and Hall.
- Advincula, R., E. Aust, W. Meyer and W. Knoll (1996). "In Situ investigations of polymer self-assembly solution adsorption by surface plasmon resonance." *Langmuir* **12**: 3536-3540.
- Aoki H, Moro O. Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sci*. 2002 Sep 20;71(18):2171-9
- Barrera, D.A. Zylstra, E. Lansbury, P.T. Langer R. Synthesis and RGD modification of a new biodegradable copolymer system : Poly(lactic acid-co-lysine). *J. Am. Chem. Soc.* 1993 , 115, 11010-11011
- Bataille, S., P. Portalier, P. Coulon and J.-P. Ternaux. 1998. Influence of acetylcholinesterase on embryonic spinal rat motoneurons growth in culture: a quantitative morphometric study. *European Journal of Neuroscience* 10(2):560-572.
- Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):6982-6.
- Belloq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug Chem*. 2003 Nov-Dec;14(6):1122-1132.

- Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J. Build-up of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-Inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam-Cyclodextrin Complexes. *Advanced Functional Materials* 2004 Feb 14(2): 174-182
- Berg MC, Yang SY, Hammond PT, Rubner MF. Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces. *Langmuir*. 2004 Feb 17;20(4):1362-8.
- Bergan D, Galbraith T, Sloane DL. Gene transfer in vitro and in vivo by cationic lipids is not significantly affected by levels of supercoiling of a reporter plasmid. *Pharm Res*. 2000 Aug;17(8):967-73.
- Biaggi MH, Pinheiro TJ, Watts A, Lamy-Freund MT. Spin label and 2H-NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers. *Eur Biophys J*. 1996;24(4):251-9.
- Biaggi MH, Riske KA, Lamy-Freund MT. Melanotropic peptides-lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone alpha-MSH to a biologically more potent analog. *Biophys Chem*. 1997 Sep 1;67(1-3):139-49.
- Bielinska AU, Yen A, Wu HL, Zahos KM, Sun R, Weiner ND, Baker JR Jr, Roessler BJ. Application of membrane-based dendrimer/DNA complexes for solid phase transfection in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2000 May;21(9):877-87.
- Binnig, G., C.F. Quate, C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 1986. 56(9):930-933.
- Binnig, G., H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel.. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters* 1982. 49:57-61.
- Bird CH, Sun J, Ung K, Karambalis D, Whisstock JC, Trapani JA, Bird PI. Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(17):7854-67.
- Blomberg P, Eskandarpour M, Xia S, Sylven C, Islam KB. Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 505–510.
- Bloomfield VA. DNA condensation. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6: 334–341.
- Boeckle S, Katharina von Gersdorff, Silke van der Piepen CC, et al. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med* 2004; 6: 1102–1110.
- Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):753-9.
- Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery. *J Mol Med*. 2000;78(6):303-11. Review.

- Boon EM, Ceres DM, Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat Biotechnol.* 2000 Oct;18(10):1096-100. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2000 Dec;18(12):1318.
- Breguet V, Gugerli R, Perneti M, von Stockar U, Marison IW. Formation of microcapsules from polyelectrolyte and covalent interactions. *Langmuir.* 2005 Oct 11;21(21):9764-72.
- Brissault B, Kichler A, Guis C, et al. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug Chem* 2003; 14: 581–587.
- Bronich T, Kabanov A, Marky L. A thermodynamic characterization of the interaction of a cationic copolymer with DNA. *J Phys Chem B* 2001; 105: 6041–6050.
- Brown MD, Schatzlein A, Brownlie A, Jack V, Wang W, Tetley L, Gray AI, Uchegbu IF. Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents. *Bioconjug Chem.* 2000 Nov-Dec;11(6):880-91
- Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm.* 2001 Oct 23;229(1-2):1-21.
- Boulmedais, F., B. Frisch, O. Etienne, P. Lavalle, C. Picart, J. Ogier, J.-C. Voegel, P. Schaaf and C. Egles. 2004. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 25(11):2003-2011.
- Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, Francois Stoltz J, Menu P. Endothelial cell--interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials.* 2005 Aug;26(22):4568-75.
- Boussif O, Delair T, Brua C, Veron L, Pavirani A, Kolbe HV. Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug Chem.* 1999 Sep-Oct;10(5):877-83
- Boussif O., Transfert de Gènes Médié par des Polymères Cationiques , Ph.D. Thèse Université Louis Pasteur, Strasbourg, 1996
- Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm.* 2001 Oct 23;229(1-2):1-21. Review.
- 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 Ther.* 2000 Mar;7(5):401-7.
- Brus C, Kleemann E, Aigner A, Czubyko F, Kissel T. Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization. *J Control Release.* 2004 Feb 20;95(1):119-31.
- Burnham, N.A., D.D. Dominguez, R.L. Mowery and R.J. Colton. Probing the surface forces of monolayer films with an atomic-force microscope. *Physical Review Letters* 1990. 64(16):1931-1934
- Carlisle R, Read M, Wolfert M, Seymour L. Self-assembling poly-L-lysine)/DNA complexes capable of integrin-mediated cellular uptake and gene expression. *Colloids and surfaces B* 1999 16 : 261-272

- Carriere M, Escriou V, Savarin A, Scherman D. Coupling of importin beta binding peptide on plasmid DNA: transfection efficiency is increased by modification of lipoplex's physicochemical properties. *BMC Biotechnol* 2003; 3: 14.
- Cartier R, Reszka R. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Therapy* 2002; 9: 157-167.
- Caruso, F., H. Lichtenfeld, E. Donath and H. Mohwald (1999). Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. *Macromolecules* 32(7): 2317-2328.
- Caruso, F. and H. Mohwald (1999). Preparation and Characterization of Ordered Nanoparticle and Polymer Composite Multilayers on Colloids. *Langmuir* 15(23): 8276-8281.
- Caruso F, Donath E, Möhwald H.. Influence of Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-Carboxyfluorescein and Rhodamine B-Labeled Particles in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry*, 1998, 102(11): 2011-2016.
- Catania A, Airaghi L, Colombo G, Lipton JM. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):304-8.
- Catania A, Airaghi L, Garofalo L, Cutuli M, Lipton JM. The neuropeptide alpha-MSH in HIV infection and other disorders in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 May 1;840:848-56. Review.
- Ceriani G, Diaz J, Murphree S, Catania A, Lipton JM. The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits experimental arthritis in rats. *Neuroimmunomodulation.* 1994 Jan;1(1):28-32.
- Cervera-Paz FJ, Linthicum FH Jr. Cochlear wall erosion after cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005 Jul;114(7):543-6.
- Chanana M, Gliozzi A, Diaspro A, Chodnevskaja I, Huewel S, Moskalenko V, Ulrichs K, Galla HJ, Krol S. Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells. *Nano Lett.* 2005 Dec;5(12):2605-12.
- Chen ZY, Yant SR, He CY, Meuse L, Shen S, Kay MA. Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol Ther.* 2001 Mar;3(3):403-10.
- Chiarelli, P., M.S. Johal, J.L. Casson, B.L. Roberts, J.M. Robinson and H.L. Wang. 2001. Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Advanced Materials* 13:1167-1170.
- Chiu SJ, Ueno NT, Lee RJ. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine. *J Control Release.* 2004 Jun 18;97(2):357-69.
- Chluba, J., J.-C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf and J. Ogier.. Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromolecules* 2001, 2(3):800-805.

- Chluba J, Lima de Souza D, Frisch B, Schuber F. Enhancement of gene delivery by an analogue of alpha-MSH in a receptor-independent fashion. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Feb 9;1510(1-2):198-208.
- Cho YW, Kim JD, Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J Pharm Pharmacol*. 2003 Jun;55(6):721-34.
- Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, Koe JG, Middaugh CR. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci*. 2003 Aug;92(8):1710-22.
- Choosakoonkriang S, Wiethoff C.M, Anchordoquy T.J, Koe G.S, Smith J.G, Middaugh C.R. Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA. *J. Biol. Chem*. 276 2001: 8037–8043.
- Chul Cho K, Hoon Jeong J, Jung Chung H, Joe CO, Wan Kim S, Gwan Park T. Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis. *J Control Release*. 2005 Nov 2;108(1):121-31.
- Chun KW, Lee JB, Kim SH, Park TG. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(16):3319-26.
- Clamme JP, Azoulay J, Mely Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*. 2003 Mar;84(3):1960-8.
- Cloninger MJ. Biological applications of dendrimers. *Curr Opin Chem Biol*. 2002 Dec;6(6):742-8.
- Cohen-Sacks H, Elazar V, Gao J, Golomb A, Adwan H, Korchoy N, Levy RJ, Berger MR, Golomb G. Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices. *J Control Release*. 2004 Mar 5;95(2):309-20.
- Colin M, Maurice M, Trugnan G, Kornprobst M, Harbottle RP, Knight A, Cooper RG, Miller AD, Capeau J, Coutelle C, Brahimi-Horn MC. Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. *Gene Ther*. 2000 Jan;7(2):139-52.
- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res*. 1997 Jun 15;35(4):513-23.
- Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Nacamuli RP, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng*. 2005 Mar-Apr;11(3-4):645-58.
- Cryan SA, Holohan A, Donohue R, Darcy R, O'Driscoll CM. Related Articles, Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *Eur J Pharm Sci*. 2004 Apr;21(5):625-33.
- Cutuli M, Cristiani S, Lipton JM, Catania A. Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *J Leukoc Biol*. 2000 Feb;67(2):233-9.

- Danielsen S, Maurstad G, Stokke BT. DNA-polycation complexation and polyplex stability in the presence of competing polyanions. *Biopolymers*. 2005 Feb 5;77(2):86-97.
- Dauty E, Remy JS, Zuber G, Behr JP. Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor. *Bioconjug Chem*. 2002 Jul-Aug;13(4):831-9.
- Dean DA, Strong DD, Zimmer WE. Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther*. 2005 Jun;12(11):881-90. Review.
- Decher, G. 1997. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277:1232-1237.
- Decher G, Schlenoff JB. Eds. ; *Multilayer Thin Films : sequential Assembly of Nanocomposite Materials ; Wiley-VCH : Weinheim Germany, 2003*
- De Feijter, J.A., J. Benjamins and F.A. Veer.. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* 1978.17(7):1759-1772.
- Denuziere, A., D. Ferrier and A. Domard. 1996. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers* 29(4):317-323.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10444-50.
- Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, et al. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3095–3101.
- Etienne O, Picart C, Taddei C, Keller P, Hubsch E, Schaaf P, Voegel JC, Haikel Y, Ogier JA, Egles C. Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study. *J Dent Res* 2006, 85: 44-48.
- Etienne O, Schneider A, Taddei C, Richert L, Schaaf P, Voegel JC, Egles C, Picart C. Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study. *Biomacromolecules*. 2005
- Etrych T, Leclercq L, Boustta M, Vert M. Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media: a model study related to the case of body fluids. *Eur J Pharm Sci*. 2005 Jun;25(2-3):281-8.
- Eves PC, Macneil S, Haycock JW. alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides*. 2005 Nov 3
- Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*. 1995 May 4;1235(2):289-95
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7413-7.

- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, et al. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003; 24: 1121–1131.
- Fischer D, Bieber T, Li Y, et al. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999; 16: 1273–1279.
- Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci.* 2002;4(3):E12.
- Forrest ML, Koerber JT, Pack DW. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjug Chem.* 2003 Sep-Oct;14(5):934-40.
- Forrest ML, Gabrielson N, Pack DW. Cyclodextrin-polyethylenimine conjugates for targeted in vitro gene delivery. *Biotechnol Bioeng.* 2005 Feb 20;89(4):416-23.
- Freeman DJ, Niven RW. Related Articles, The influence of sodium glycocholate and other additives on the in vivo transfection of plasmid DNA in the lungs. *Pharm Res.* 1996 Feb;13(2):202-9.
- Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Aug 30;179(1):280-5.
- Garza JM, Muller S, Ball V, Stoltz JF, Voegel JC, Schaaf P, Lavallo P. Multicompartiment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir*, 2004 20: 7298-7302.
- Gebhart CL, Sriadibhatla S, Vinogradov S, Lemieux P, Alakhov V, Kabanov AV. Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug Chem.* 2002 Sep-Oct;13(5):937-44.
- Gebhart CL, Kabanov AV. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release.* 2001 Jun 15;73(2-3):401-16.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1613-29. Review.
- Getting SJ. Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Oct;23(10):447-9.
- Golan R, Pietrasanta LI, Hsieh W, Hansma HG. DNA toroids: stages in condensation. *Biochemistry.* 1999 Oct 19;38(42):14069-76.
- Gong, H.; Garcia-Turiel, J.; Vasilev, K.; Vinogradova, O. I.; Interaction and Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayers *Langmuir*; 2005; 21(16); 7545-7550.
- Goss I, Shu L, Schluter AD, Rabe JP. Molecular structure of single DNA complexes with positively charged dendronized polymers. *J Am Chem Soc.* 2002 Jun 19;124(24):6860-5.

- Grant, G.G.S., D.S. Koktysh, B. Yun, R.L. Matts and N.A. Kotov. 2001. Layer-by-layer assembly of collagen thin films: Controlled thickness and biocompatibility. *Biomedical Microdevices* 3(4):301-306.
- Gremlich HU, Fringeli UP, Schwyzer R. Conformational changes of adrenocorticotropin peptides upon interaction with lipid membranes revealed by infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Biochemistry*. 1983 Aug 30;22(18):4257-64.
- Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, Zhang J. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials*. 2005 Sep 2
- Guo, T.F., S.C. Chang, S. Pyo and Y. Yang. 2002. Vertically integrated electronic circuits via a combination of self-assembled polyelectrolytes, Ink-Jet printing, and electroless metal plating processes. *Langmuir* 18:8142-8147.
- Haensler J, Szoka FC Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem*. 1993 Sep-Oct;4(5):372-9.
- Haynie DT, Zhang L, Rudra JS, Zhao W, Zhong Y, Palath N. Polypeptide multilayer films. *Biomacromolecules*. 2005 Nov-Dec;6(6):2895-913.
- Heilshorn SC, DiZio KA, Welsh ER, Tirrell DA. Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(23):4245-52.
- Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther*. 2003 Mar;10(6):453-8. Review.
- Hiltz ME, Catania A, Lipton JM. Anti-inflammatory activity of alpha-MSH(11-13) analogs: influences of alteration in stereochemistry. *Peptides*. 1991 Jul-Aug;12(4):767-71.
- Hinrichs WL, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, van de Wetering P, Hennink WE. Thermosensitive polymers as carriers for DNA delivery. *J Control Release*. 1999 Aug 5;60(2-3):249-59.
- Hoogeveen, N.G., M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer and M.R. Bohmer. 1996. Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir* 12(15):3675 -3681.
- Huang YC, Simmons C, Kaigler D, Rice KG, Mooney DJ. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther*. 2005 Mar;12(5):418-26.
- Hubsch E, Ball V, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P. Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. *Langmuir*, 2004, 20: 1980-1985
- Huglin, M.B. 1972. Light scattering from polymer solutions. M.B. Huglin E, editor. Academic Press, London, New York.
- Hui SW, Langner M, Zhao YL, Ross P, Hurley E, Chan K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J*. 1996 Aug;71(2):590-9.

- Ichiyama T, Zhao H, Catania A, Furukawa S, Lipton JM. alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation in human glioma cells and in experimental brain inflammation. *Exp Neurol.* 1999 Jun;157(2):359-65
- Ioannou YA, Chen FW. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 1996 Mar 1;24(5):992-3.
- Izquierdo A, Ono SS, Voegel JC, Schaaf P, Decher G. Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *langmuir*, 2005, 21: 7558-7567.
- Jackler G, Czeslik C, Steitz R, Royer CA. Spatial distribution of protein molecules adsorbed at a polyelectrolyte multilayer. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2005
- Jang JH, Houchin TL, Shea LD. Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev. Medical Devices.* 2005 1(1) : 127-38.
- Jarver P, Langel U. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today.* 2004 May 1;9(9):395-402. Review.
- Jeong JH, Song SH, Lim DW, et al. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J Control Release* 2001; 73: 391-399.
- Jessel, N., F. Atalar, P. Lavallo, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel and J. Ogier (2003). "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins." *Advanced Materials* 15(9): 692-695.
- Jessel N, Lavallo PH, Hubsche E, Holl V, Senger B, Haikel Y, Voegel JC, Ogier J, Schaaf P. Short time turning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers *Adv Mater*, 2004, 14: 174-182
- Jessel N, Lavallo PH, Hubsch E, Holl V, Senger B, Haikel Y, Voegel JC, Ogier J, Schaaf P. Short-time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Adv Funct Mater*, 2005, 15: 648-654.
- Jessel N., Schwinté P., Donohue R., Lavallo Ph., Boulmedais F., Darcy R., Szalontai B., Voegel J.C., Ogier J. Pyridylamino β cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv. Funct. Mat.*, 2004, 14 : 963-969.
- Jewell CM, Zhang J, Fredin NJ, Lynn DM. Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells. *J Control Release.* 2005 Aug 18;106(1-2):214-23.
- Johnston, A. P. R.; Read, E. S.; Caruso, F.; DNA Multilayer Films on Planar and Colloidal Supports: Sequential Assembly of Like-Charged Polyelectrolytes *Nano Lett.* 2005; 5(5); 953-956.
- Kabanov VA, Kabanov AV. Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 30: 49-60.

- Kalden DH, Scholzen T, Brzoska T, Luger TA. Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Oct 20;885:254-61
- Kaul G, Cucchiaroni M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2005 Aug 12;
- Kelly JM, Moir AJ, Carlson K, Yang Y, Macneil S, Haycock JW. Immobilized alpha-melanocyte stimulating hormone 10-13 (GKPV) inhibits tumor necrosis factor-alpha stimulated NF-kappaB activity. *Peptides.* 2005 Nov 3;
- Keskin DS, Tezcaner A, Korkusuz P, Korkusuz F, Hasirci V. Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(18):4023-34.
- Kichler A, Leborgne C, Marz J, Danos O, Bechinger B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1564-8. 2003 Jan 31.
- Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* 2001 Mar-Apr;3(2):135-44.
- Kidambi S, Lee I, Chan C. Controlling primary hepatocyte adhesion and spreading on protein-free polyelectrolyte multilayer films. *J Am Chem Soc.* 2004 Dec 22;126(50):16286-7.
- Kihara F, Arima H, Tsutsumi T, Hirayama F, Uekama K. In vitro and in vivo gene transfer by an optimized alpha-cyclodextrin conjugate with polyamidoamine dendrimer. *Bioconjug Chem.* 2003 Mar-Apr;14(2):342-50.
- Kilk K, El-Andaloussi S, Jarver P, Meikas A, Valkna A, Bartfai T, Kogerman P, Metsis M, Langel U. Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J Control Release.* 2005 Mar 21;103(2):511-23. Epub 2005 Jan 26.
- Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Aug;36(8):1482-91.
- Kim A, Checkla DM, Dehazya P, Chen W. Characterization of DNA-hyaluronan matrix for sustained gene transfer. *J Control Release.* 2003 Jun 5;90(1):81-95.
- Kirchheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wagner E. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 1997 May;4(5):409-18.
- Kommareddy S, Tiwari SB, Amiji MM. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol Cancer Res Treat.* 2005 Dec;4(6):615-25.

- Koppel, D. E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *J. Chem. Phys.* 1972, 57, 4814-4820.
- Kreiss P, Scherman D. Optimisation des plasmids et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique. *médecine/sciences* 1999 ; 15 : 669-76
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):4897-902.
- Kunath K, von Harpe A, Fischer D, Petersen 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. *J Control Release.* 2003 Apr 14;89(1):113-25.
- Kyte, J. 1995. *Structure in protein chemistry.* Garland Publishing, Inc., New-York & London.
- Ravi Kumar MN, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials.* 2004 May;25(10):1771-7.
- Ladam, G., P. Schaaf, F.J.G. Cuisinier, G. Decher and J.-C. Voegel. 2001. Protein adsorption onto autoassembled polyelectrolyte films. *Langmuir* 17(3):878-882.
- Ladam, G., P. Schaad, J.C. Voegel, G. Decher, P. Schaaf and F. Cuisinier. 2000. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16: 1249-1255.
- Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier FJ. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules.* 2000
- Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature.* 1998 Apr 30;392(6679 Suppl):5-10. Review
- Langer R. Drug delivery. *Drugs on target.* *Science.* 2001 Jul 6;293(5527):58-9.
- Langer R. Where a pill won't reach. *Sci Am.* 2003 Apr;288(4):50-7.
- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature.* 2004 Apr 1;428(6982):487-92. Review.
- Lapčík, L., L. Lapčík, J. De Smedt, J. Demeester and P. Chabreck.. Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews* 98(8) 1998:2663 -2684.
- Larsson LI. Adrenocorticotropin-like and alpha-melanotropin-like peptides in a subpopulation of human gastrin cell granules: bioassay, immunoassay, and immunocytochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):2990-4.

- Lavalle Ph., Gergely C., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : an « in situ » Atomic Force Microscopy study. *Macromolecules*, 2002, 35, 4458-4465.
- Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodivich H, Lukacs GL. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* 1999 Apr;6(4):482-97.
- Lee J, Macosko CW, Urry DW. Elastomeric polypentapeptides cross-linked into matrixes and fibers. *Biomacromolecules*. 2001 Spring;2(1):170-9.
- Lee H, Jeong JH, Park TG. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J Control Release*. 2002 Feb 19;79(1-3):283-91
- Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):431-7.
- Levy RJ, Goldstein SA, Bonadio J. Gene therapy for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 Aug 3;33(1-2):53-69.
- Li S et al. Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of the SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Therapy* 2001; 8: 494–497.
- Li G, Stahl PD. Structure-function relationship of the small GTPase rab5. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):24475-80.
- Lim, Y.-b.; Kim, C.-h.; Kim, K.; Kim, S. W.; Park, J.-s. Development of a Safe Gene Delivery System Using Biodegradable Polymer, Poly[-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]. *J. Am. Chem. Soc.; (Communication)*; 2000; 122(27); 6524-6525.
- Lipton JM, Catania A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today*. 1997 Mar;18(3):140-5.
- Liu Z, Li M, Cui D, Fei J. Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery. *J Control Release*. 2005 Feb 16;102(3):699-710
- Liu W, Sun S, Cao Z, Zhang X, Yao K, Lu WW, Luk KD. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2705-11.
- Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M. New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Jun;994:133-40. Review.
- Luger TA, Schauer E, Trautinger F, Krutmann J, Ansel J, Schwarz A, Schwarz T. Production of immunosuppressing melanotropins by human keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 May 31;680:567-70.
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. Related Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Jul;60(2):247-66. Review.

- Luo L, Liu J, Wang Z, Yang X, Dong S, Wang E. Fabrication of layer-by-layer deposited multilayer films containing DNA and its interaction with methyl green. *Biophys Chem.* 2001 Dec 11;94(1-2):11-22.
- Lvov Y, Haas H, Decher G, Moehwald H, Mikhailov A, Mtchedlishvily B, Morgunova E, Vainshtein B. Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus *Langmuir*; 1994; 10(11); 4232-4236.
- Lvov, Y., K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose and T. Kunitake (1999). A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. *Colloids and surfaces A* 146(1-3): 337-346.
- Lynn, D. M.; Langer, R.; Degradable Poly(-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA *J. Am. Chem. Soc.* 2000; 122(44); 10761-10768.
- Macedo Z.S, Furquim TA, Ito AS. Estimation of average depth of penetration of melanotropins in dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles. *Biophys Chem.* 1996 Mar 7;59(1-2):193-202.
- Mahato RI. Water insoluble and soluble lipids for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Apr 5;57(5):699-712. Review.
- Marudova M, Lang S, Brownsey GJ, Ring SG. Pectin-chitosan multilayer formation. *Carbohydr Res.* 2005 Sep 26;340(13):2144-9.
- Maruyama A, Watanabe H, Ferdous A, Katoh M, Ishihara T, Akaike T. Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double-stranded DNA and polylysine comb-type copolymers having hydrophilic side chains. *Bioconjug Chem.* 1998 Mar-Apr;9(2):292-9.
- 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 Ther.* 2000 Jan;7(1):53-60
- Martin, Y., D. Abraham and H. Wickramasinghe. High-resolution capacitance measurement and potentiometry by force microscopy. *Applied Physics Letters* 1988. 52(13):1103-1105.
- Megeed Z, Haider M, Li D, O'Malley BW Jr, Cappello J, Ghandehari H. In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. *J Control Release.* 2004 Feb 10;94(2-3):433-45.
- Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Apr 5;57(5):733-53.
- Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules.* 2003 Jan-Feb;4(1):96-106.

- Mendez-Garza J, Jessel N, Ladam G, Muller S, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Lavallo Ph. Polyelectrolyte multilayer and degradable polymer layers as multi-compartment films. *Langmuir*, 2005, 21: 12372-12377
- Michel M, Izquierdo A, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Ball V. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles obtained by spraying: integrity of the vesicles. *Langmuir*. 2005 Aug 16;21(17):7854-9.
- Michel M, Vautier D, Voegel JC, Schaaf P, Ball V. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles. *Langmuir*. 2004 Jun 8;20(12):4835-9.
- Midoux P, LeCam E, Coulaud D, Delain E, Pichon C. Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors. *Somat Cell Mol Genet*. 2002 Nov;27(1-6):27-47. Review.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther*. 2005 Jun;11(6):990-5.
- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R; RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002 Jun 6;346(23):1773-80.
- Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med*. 2005 Aug;7(8):992-1009.
- Ngankam AP, Mao G, Van Tassel PR. Fibronectin adsorption onto polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*. 2004 Apr 13;20(8):3362-70.
- Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y, Terada M. New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):707-10.
- Ogris M, Wagner E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat Cell Mol Genet*. 2002 Nov;27(1-6):85-95.
- Onda M, Lvov Y, Ariga K, Kunitake T. Sequential reaction and product separation on molecular films of glucoamylase and glucose oxidase assembled on an ultrafilter. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, 82(5) : 502-506
- Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Jul;4(7):581-93. Review
- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Feb 24;55(3):329-47. Review.

- Parker AL, Oupicky D, Dash PR, Seymour LW. Methodologies for monitoring nanoparticle formation by self-assembly of DNA with poly(L-lysine). *Anal Biochem.* 2002 Mar 1;302(1):75-80.
- Pector V, Backmann J, Maes D, Vandenbranden M, Ruyschaert J.M. Biophysical and structural properties of DNA.diC(14)–amidine complexes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29533–29538.
- Pei R, Cui X, Yang X, Wang E. Assembly of Alternating Polycation and DNA Multilayer Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption *Biomacromolecules* 2001; 2(2); 463-468.
- Petersen H, Fechner PM, Martin AL, Kunath K, Stolnik S, Roberts CJ, Fischer D, Davies MC, Kissel T. Polyethyleniminegraft- poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjugate Chem* 2002; 13: 845–854.
- Picart C, Lavallo Ph, Hubert P, Cuisinier F.J.G, Decher G., Schaaf P, Voegel J.-C, Buildup mechanism for poly(L-lysine) / hyaluronic acid films onto a solid surface, *Langmuir*, 2001, 17, 7414-7424.
- Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G.D., Schaaf P., Voegel J-C., Lavallo PH. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2002, 99, 12531-12535.
- Picart C, Gergely C, Arntz Y, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier FJ, Senger B Measurement of film thickness up to several hundreds of nanometers using optical waveguide lightmode spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* 2004 Oct 15;20(3):553-61.
- Pichon C, Goncalves C, Midoux P. Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Dec 3;53(1):75-94. Review.
- Plank C, Mechtler K, Szoka FC Jr, Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther.* 1996 Aug 1;7(12):1437-46.
- Porcel C, Lavallo P, Ball V, Decher G, Senger B, Voegel JC, Schaaf P. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2005 (sous presse)
- Porcel CH, Izquierdo A, Ball V, Decher G, Voegel JC, Schaaf P Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying . *langmuir*,2005, 21: 800-802
- Prasad TK, Rangaraj N, Rao NM. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. *FEBS Lett.* 2005 May 9;579(12):2635-42
- Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science.* 1991 May 24;252(5010):1164-7.
- Pun SH, Bellocq NC, Liu A, Jensen G, Machemer T, Quijano E, Schluep T, Wen S, Engler H, Heidel J, Davis ME., Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery. *Bioconjug Chem.* 2004 Jul-Aug;15(4):831-40.

- Pun SH, Davis ME., Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjug Chem.* 2002 May-Jun;13(3):630-9.
- Quick DJ, Anseth KS. Gene delivery in tissue engineering: a photopolymer platform to coencapsulate cells and plasmid DNA. *Pharm Res.* 2003 Nov;20(11):1730-7.
- Radmacher, M., M. Fritz, C. Kacher, J. Cleveland and P. Hansma. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 1996. 70(1):556-567.
- Rajora N, Ceriani G, Catania A, Star RA, Murphy MT, Lipton JM. alpha-MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line. *J Leukoc Biol.* 1996 Feb;59(2):248-53.
- Ramsden, J. J., Y. M. Lvov and G. Decher (1995). "Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption." *Thin Solid Films* 254(1-2): 246-251.
- Rebuffat A, Bernasconi A, Ceppi M, Wehrli H, Verca SB, Ibrahim M, Frey BM, Frey FJ, Rusconi S. Selective enhancement of gene transfer by steroid-mediated gene delivery. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1155-1161.
- Rebuffat AG, Nawrocki AR, Nielsen PE, Bernasconi AG, Bernal-Mendez E, Frey BM, Frey FJ. Gene delivery by a steroid-peptide nucleic acid conjugate. *FASEB J* 2002; 16: 1426-1428.
- Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr JP. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1744-8.
- Ren K, Ji J, Shen J. Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-l-lysine/DNA films. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(7):1152-9. Epub 2005 Aug 18.
- Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules.* 2004 Mar-Apr;5(2):284-94.
- Richert L, Lavalle P, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules.* 2002 Nov-Dec;3(6):1170-8.
- Richert L., Lavalle Ph., Payan E., Shereg Shu X., Prestwich G.D., Stoltz J.F., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C. Layer by layer build up of polysaccharide films : physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir.* 2004, 20: 448-458.
- Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, Bresseur R, Jacobs E. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 2002 Feb;5(2):104-14.

- Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Jun;16(3):369-78.
- Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, Muller RH, Rosenecker J. In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med.* 2000 Jul-Aug;2(4):269-78.
- Ruponen M, Ronkko S, Honkakoski P, Pelkonen J, Tammi M, Urtti A. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33875-80.
- Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer.* 2002 Aug 12;87(4):414-22.
- Salloum DS, Schlenoff JB. Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules.* 2004 May-Jun;5(3):1089-96.
- Salomaki M, Vinokurov IA, Kankare J. Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir.* 2005 Nov 22;21(24):11232-40.
- Sargent DF, Schwyzer R. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Aug;83(16):5774-8.
- Sawyer T, Sanfilippo P, Hruby V, Engel M, Heward C, Burnett T J, Hadley M. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte-stimulating hormone: A highly potent α -melanotropin with ultralong biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Oct ,77(10) :5754-5758.*
- Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Rumpold H, Ahmadi R, Sabeti S, Lang W, Wagner O, Minar E. Acute-phase response after stent implantation in the carotid artery: association with 6-month in-stent restenosis. *Radiology.* 2003 May;227(2):516-21.
- Schultz P, Vautier D, Richert L, Jessel N, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J, Debry C. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, α -MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials.* 2005 May;26(15):2621-30.
- Schwahn DJ, Xu W, Herrin AB, Bales ES, Medrano EE. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to α -melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res.* 2001 Feb;14(1):32-9.
- Schwinte P, Ball V, Szalontai B, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P. Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules.* 2002
- Schwinté, P., J.-C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf and B. Szalontai. 2001. Stabilizing effects of various polyelectrolyte multilayer films on the structure of adsorbed/embedded fibrinogen molecules: An ATRFTIR study. *Journal of Physical Chemistry B* 105:11906-11916.

- Schwinté P, Darcy R, O’Keeffe FJ. Ditopic binding of nucleotides by heptakis(6-hydroxyethylamino-6deoxy)- β -cyclodextrin. *J. Chem. Soc.* 1998, perkin Trans. 2, 805-808
- Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 2002 Nov-Dec;4(6):634-43.
- Schlenoff, J.B., S.T. Dubas and T. Farhat. 2000. Sprayed polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16:9968-9969.
- Scholzen TE, Sunderkotter C, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Fisbeck T, Armstrong CA, Ansel JC, Luger TA. Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology.* 2003 Jan;144(1):360-70.
- Scott MG, Benmerah A, Marullo S. G protein coupled receptor endocytosis. *Med Sci (Paris).* 2004 Jan;20(1):78-83.
- Segura T, Shea LD. Surface-tethered DNA complexes for enhanced gene delivery. *Bioconjug Chem.* 2002 May-Jun;13(3):621-9.
- Segura T, Volk MJ, Shea LD. Substrate-mediated DNA delivery: role of the cationic polymer structure and extent of modification. *J Control Release.* 2003 Nov 18;93(1):69-84.
- Segura T, Chung PH, Shea LD. DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach. *Biomaterials.* 2005 May;26(13):1575-84.
- Sharma VK, Thomas M, Klibanov AM. Mechanistic studies on aggregation of polyethylenimine-DNA complexes and its prevention. *Biotechnol Bioeng.* 2005 Jun 5;90(5):614-20.
- Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 1999 Jun;17(6):551-4. Erratum in: *Nat Biotechnol* 1999 Aug;17(8):817.
- Shindo S, Ogata K, Kubota K, Kojima A, Kobayashi M, Tada Y, Okuyama K. Vascular prosthetic implantation is associated with prolonged inflammation following aortic aneurysm surgery. *J Artif Organs.* 2003;6(3):173-8.
- Siegrist W, Solca F, Stutz S, Giuffre L, Carrel S, Girard J, Eberle AN. Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.* 1989 Nov 15;49(22):6352-8.
- Stelzer, E.H.K. and S. Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Optics Communications* 1994. 111:536-547.
- Sternberg B, Hong K, Zheng W, Papahadjopoulos D. Ultrastructural characterization of cationic liposome–DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1375 (1998) 23–35.

- Sukhorukov G, Montrel M.M, Petrov A, Shabarchina L, Sukhorukov B. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor application, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 913–922
- Sui, Z.; Salloum, D.; Schlenoff, J. B. Effect of Molecular Weight on the Construction of Polyelectrolyte Multilayers: Stripping versus Sticking *Langmuir*, 2003; 19(6); 2491-2495
- Sun S, Liu W, Cheng N, Zhang B, Cao Z, Yao K, Liang D, Zuo A, Guo G, Zhang J. A thermoresponsive chitosan-NIPAAm/vinyl laurate copolymer vector for gene transfection. *Bioconjug Chem.* 2005 Jul-Aug;16(4):972-80
- Sung SJ, Min SH, Cho KY, et al. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 492–500.
- Suh J, Paik HJ, Hwang BK. Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pHs. *Bioorg Chem* 1994; 22: 318–327.
- Tang MX, Redemann CT, Szoka FC Jr. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem.* 1996 Nov-Dec;7(6):703-14.
- Takeda N, Nakamura E, Yokoyama M, Okano T. Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses. *J Control Release.* 2004 Mar 5;95(2):343-55.
- Tatro JB, Wen Z, Entwistle ML, Atkins MB, Smith TJ, Reichlin S, Murphy JR. Interaction of an alpha-melanocyte-stimulating hormone-diphtheria toxin fusion protein with melanotropin receptors in human melanoma metastases. *Cancer Res.* 1992 May 1;52(9):2545-2548.
- Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules.* 2003 Nov-Dec;4(6):1564-71.
- Thompson MT, Berg MC, Tobias IS, Rubner MF, Van Vliet KJ. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(34):6836-45.
- Tiefenthaler, K. and W. Lukosz.. Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors. *Journal of the Optical Society of America B* 6 1989:209-220.
- Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther.* 2004 Dec;4(4):357-72.
- Tonosaki Y, Nishiyama K, Roubos EW, Sugiura Y. alpha-Melanophore-stimulating hormone (alpha-MSH) antagonizes interleukin-1beta-induced hyperalgesia and Fos expression in the paraventricular and arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 2005;81(3):167-73.
- Trentin D, Hubbell J, Hall H. Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release. *J Control Release.* 2005 Jan 20;102(1):263-75.

- Tryoen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res*. 2002 Jun 15;60(4):657-67.
- Trubetskoy VS, Loomis A, Hagstrom JE, Budker VG, Wolff JA. Layer-by-layer deposition of oppositely charged polyelectrolytes on the surface of condensed DNA particles. *Nucleic Acids Res*. 1999 Aug 1;27(15):3090-5.
- Tung CH, Mueller S, Weissleder R. Novel branching membrane translocational peptide as gene delivery vector. *Bioorg Med Chem*. 2002 Nov;10(11):3609-14
- Turunen MP, Hiltunen MO, Ruponen M, Virkamaki L, Szoka FC Jr, Urtti A, Yla-Herttuala S. Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes. *Gene Ther*. 1999 Jan;6(1):6-11
- Twaites BR, de Las Heras Alarcon C, Lavigne M, Saulnier A, Pennadam SS, Cunliffe D, Gorecki DC, Alexander C. Thermo-responsive polymers as gene delivery vectors: Cell viability, DNA transport and transfection studies. *J Control Release*. 2005 Oct 6
- Twaites BR, de las Heras Alarcon C, Cunliffe D, Lavigne M, Pennadam S, Smith JR, Gorecki DC, Alexander C. Thermo and pH responsive polymers as gene delivery vectors: effect of polymer architecture on DNA complexation in vitro. *J Control Release*. 2004 Jul 7;97(3):551-66.
- Ueda Y, Walsh E, Nakanishi H, Yoshida K. A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro. *Neurosci Lett*. 1994 Jan 3;165(1-2):203-7.
- Van den Beucken JJ, Vos MR, Thune PC, Hayakawa T, Fukushima T, Okahata Y, Walboomers XF, Sommerdijk NA, Nolte RJ, Jansen JA. Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(5):691-701. Epub 2005 Aug 1.
- Vautier, D., J. Hemmerle, C. Vodouhe, G. Koenig, L. Richert, C. Picart, J.C. Voegel, C. Debry, J. Chluba and J.Ogier. 2003. 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 56(3):147-158.
- Verbaan FJ, Klouwenberg PK, van Steenis JH, Snel CJ, Boerman O, Hennink WE, Storm G. Application of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes for gene transfer into human ovarian carcinoma cells. *Int J Pharm*. 2005 Nov 4;304(1-2):185-92.
- Vodouhe C, Schmittbuhl M, Boulmedais F, Bagnard D, Vautier D, Schaaf P, Egles C, Voegel JC, Ogier J. Related Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth. *Biomaterials*. 2005 Feb;26(5):545-54.
- Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets*. 2003 Oct;4(7):586-97.
- Volodkin DV, Petrov AI, Prevot M, Sukhorukov GB. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation. *Langmuir*. 2004 Apr 13;20(8):3398-406.

- Vörös, J, Ramsden J.J, Csucs G, Szendro I, De Paul S.M, Textor M, Spencer N.D. Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials* 2002. 23(17):3699-3710.
- Wada K, Arima H, Tsutsumi T, Hirayama F, Uekama K. Enhancing effects of galactosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates on gene transfer efficiency. *Biol Pharm Bull.* 2005A Mar;28(3):500-5.
- Wada K, Arima H, Tsutsumi T, Chihara Y, Hattori K, Hirayama F, Uekama K. Improvement of gene delivery mediated by mannosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates. *J Control Release.* 2005B May 18;104(2):397-413.
- Wagner E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999 Aug 20;38(3):279-289.
- Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2001; 3: 362–372.
- Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res.* 2000 Nov;42(5):393-420.
- Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohmalm J, Ulbrich K. Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjugate Chem* 1999; 10: 993–1004.
- Wong W, Minchin RF. Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle4, D-Phe7] alpha-MSH in B16 melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Nov;28(11):1223-32.
- Wong KY, Rajora N, Boccoli G, Catania A, Lipton JM. A potential mechanism of local anti-inflammatory action of alpha-melanocyte-stimulating hormone within the brain: modulation of tumor necrosis factor-alpha production by human astrocytic cells. *Neuroimmunomodulation.* 1997 Jan-Feb;4(1):37-41.
- Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem.* 1987 Apr 5;262(10):4429-32. Erratum in: *J Biol Chem* 1988 Jan 5;263(1):588.
- Yang SY, Mendelsohn JD, Rubner MF. New class of ultrathin, highly cell-adhesion-resistant polyelectrolyte multilayers with micropatterning capabilities. *Biomacromolecules.* 2003 Jul-Aug;4(4):987-94.
- Zaric V, Weltin D, Erbacher P, Remy JS, Behr JP, Stephan D. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med.* 2004 Feb;6(2):176-84.
- Zaharoff DA, Barr RC, Li CY, Yuan F. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 2002 Oct;9(19):1286-90.
- Zauner W, Farrow NA, Haines AM. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release.* 2001 Mar 12;71(1):39-51.

- Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol.* 2003 Oct;21(10):1171-8. Review.
- Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release.* 2004 Nov 24;100(2):165-80. Review.
- Zhang, J.; Chua, L. S.; Lynn, D. M.; Multilayered Thin Films that Sustain the Release of Functional DNA under Physiological Conditions *Langmuir* 2004; 20(19); 8015-8021.
- Zhang J, Senger B, Vautier D, Picart C, Schaaf P, Voegel JC, Lavallo P. Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials.* 2005; 26:3353-3361.
- Zhao Q, Temsamani J, Agrawal S. Related Articles, Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery. *Antisense Res Dev.* 1995 Fall;5(3):185-92.
- Zhao Z, Wang J, Mao HQ, Leong KW. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Apr 25;55(4):483-99. Review.
- Zhdanov RI, Podobed OV, Vlassov VV. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry.* 2002 Nov;58(1):53-64. Review.
- Zhdanov R.I., Kutsenko N.G, Podobed O.V, Buneeva O.A., Tsvetkova T.A., Guriev S.O., Lavrenova T.P, Serebrennikova G.A, Konstantinova I.D, Maslov M.A. New cationic liposomes for transfection of eukaryotic cells, *Dokl. Akad. Nauk* 362 (1998) 557–560.
- Zhong Y, Bellamkonda RV. Controlled release of anti-inflammatory agent alpha-MSH from neural implants. *J Control Release.* 2005 Sep 2;106(3):309-18
- Zhou X, Wu L, Zhou J. Fabrication of DNA microarrays on nanoengineered polymeric ultrathin film prepared by self-assembly of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir.* 2004 Sep 28;20(20):8877-85.
- Zhou Y, Li Y. Studies of interaction between poly(allylamine hydrochloride) and double helix DNA by spectral methods, *Biophys. Chem.* 107 2004A 273–281.
- Zhou Y, Li Y. Layer-by-layer self-assembly of multilayer films containing DNA and Eu³⁺: their characteristics and interactions with small molecules, *Langmuir* 20 2004B 7208–7214.
- Zinselmeyer BH, Mackay SP, Schatzlein AG, Uchegbu IF. The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm Res.* 2002 Jul;19(7):960-7