

Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique

Patrick Kreiss, Daniel Scherman

Né au milieu des années 1980, le concept de thérapie génique est fondé sur l'administration thérapeutique d'acides nucléiques. Il a fait naître de grands espoirs et regrouper autour de lui de nombreuses équipes de recherche. Cependant, après quelque dix années, la carence en vecteurs efficaces et sûrs pour le transfert de gène *in vivo* apparaît comme la principale limitation à un réel développement clinique. Les vecteurs viraux, utilisés dans la majorité des essais cliniques, présentent une bonne efficacité de transfert de gène. Leur utilisation est toutefois souvent associée à des problèmes de réponse immunitaire, de production

par recombinaison homologe de particules virales infectieuses, ou encore de capacité trop limitée pour accueillir des transgènes de grande taille, comme par exemple l'ADNc de la dystrophine. Face à ces problèmes, une voie de recherche portant sur l'utilisation de vecteurs synthétiques associés à des ADN plasmidiques bactériens s'est développée. Non immunogènes, capables de vectoriser des ADN de taille théoriquement illimitée, les vecteurs synthétiques sont, de plus, simples à produire, à purifier et à conserver dans le respect des bonnes pratiques de fabrication. Il en est de même pour les plasmides codant pour les protéines thérapeutiques.

Les vecteurs d'expression utilisés pour la thérapie génique non virale sont les plasmides – molécules d'ADN double brin circulaires surenroulées – contenant généralement :

- une origine de réplication bactérienne, qui permet la production des plasmides dans les souches bactériennes ;
- un gène dont l'expression confère la résistance à un antibiotique, souvent la kanamycine, ce qui permet le maintien du plasmide dans les bactéries sous pression de sélection ;
- la cassette d'expression, contenant le transgène thérapeutique dont l'expression est contrôlée par un promoteur et par une séquence de terminaison de transcription.

Quel ADN vecteur d'expression utiliser pour le transfert de gènes ?

Le choix du promoteur qui gouverne l'expression du transgène revêt une importance particulière. Les promoteurs viraux, comme le promoteur précoce du virus simien SV40, ou le promoteur précoce du cytomégalovirus (pCMV) sont caractérisés par un haut niveau d'expression constitutive du transgène. Alternativement, le choix peut se porter sur des promoteurs réglables, dont l'expression peut être induite ou réprimée par une molécule chimique telle que la tétracycline, ou sur des promoteurs spécifiques d'un type cellulaire donné (pro-

moteurs spécifiques de tissu). Les promoteurs réglables sont souvent fondés sur l'utilisation des récepteurs intracellulaires des hormones stéroïdes. Lorsque ces récepteurs sont activés par leur ligand, ils migrent vers le noyau cellulaire et se lient à des éléments des promoteurs, les *enhancers*, induisant la transcription du gène correspondant. Les promoteurs spécifiques de tissu, quant à eux, présentent l'avantage de cibler l'expression du transgène, par exemple vers les cellules tumorales (promoteur de l'antigène carcinoembryonnaire, CEA, ou de l' α -foétoprotéine, AFP), vers les hépatocytes (promoteur de la phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCK), ou encore vers les cellules musculaires (*enhancer* de la créatine kinase).

Quel que soit le promoteur choisi, l'utilisation de ces plasmides comporte un risque de dissémination chez des entérobactéries commensales de l'hôte, qui deviendraient alors résistantes aux antibiotiques. Face à ce problème, des plasmides pourvus d'une origine de réplication conditionnelle ont été développés [1]. Ces vecteurs, appelés pCOR (*conditional origin of replication*), sont sélectionnés sans utilisation d'antibiotique.

Une autre stratégie, récemment publiée [2], consiste à produire, par recombinaison spécifique de site, des molécules d'ADN surenroulées ne contenant ni origine de réplication, ni gène de résistance aux antibiotiques, ni aucun autre marqueur de sélection. La conception de ces nouveaux vecteurs d'expression s'inscrit à la fois dans le but d'accroître la sécurité de ces vecteurs, et de réduire leur taille en augmentant par ce biais l'efficacité de transfert de gène *in vitro* comme *in vivo* [3].

Quel vecteur synthétique choisir pour compacter l'ADN ?

Très schématiquement, les vecteurs synthétiques ont quatre fonctions principales (figure 1):

- compacter et protéger l'ADN: les plasmides dont la taille, en solution aqueuse, varie de 100 à 500 nm selon le nombre de paires de bases et l'état de surenroulement, sont compactés et protégés par le vecteur synthétique des diverses sources de dégradation, telles que les nucléases;
- promouvoir la fixation cellulaire de l'ADN: l'ADN est un polyanion qui n'a aucune capacité à adhérer spontanément à la membrane plasmique polyanionique des cellules;
- promouvoir le passage de l'ADN à travers la membrane plasmique ou endosomique;
- promouvoir le trafic intracellulaire et la pénétration nucléaire de l'ADN, lorsque l'on cherche à transfecter des cellules quiescentes.

Ces fonctions sont remplies, partiellement pour la quatrième toutefois, par deux types de vecteurs non viraux, les lipides et les polymères cationiques.

Les lipides cationiques

Auto-associatifs, ils forment avec l'ADN des ensembles supramoléculaires appelés lipoplexes qui permettent un transfert de gène très efficace, au moins *in vitro*. Les vecteurs lipidiques sont constitués de trois domaines: une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un espaceur séparant ces deux éléments (figure 2). Le lipide cationique prototype utilisé pour le transfert de gène est le bromure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium (DOTMA), un ammonium quaternaire amphiphile [4] (figure 3). L'ADN formulé avec des lipides cationiques, comme le DOTMA, et un phospholipide neutre (le plus couramment la dioléoylphosphatidyléthanolamine ou DOPE), forme des lipoplexes capables de transfecter des cellules avec une grande efficacité, *in vitro* et en l'absence de protéines sériques.

Depuis la mise en évidence de l'efficacité transfectante des particules composées d'ADN et de DOTMA/DOPE, une grande variété de lipides cationiques a été synthétisée et testée, avec pour objectif d'augmenter l'efficacité de transfection en l'absence de sérum, ou encore, *in vivo*, de réduire la cytotoxicité des formulations et d'améliorer la biodisponibilité des particules ADN-lipide. Un certain nombre de lipides cationiques est disponible commercialement (Lipofectine, Lipofectamine, Transfectam, TransfectACE, etc.), et est utilisé en routine en recherche fondamentale. Il s'agit notamment d'analogues de structure du DOTMA, de lipides cationiques contenant du cholestérol [5], de lipopolyamines dont la tête cationique est généralement dérivée de la spermine [6] ou de polyamines d'architecture variée [7] (figure 3). Des nouvelles formulations, comme celles développées par Lehn *et al.* et

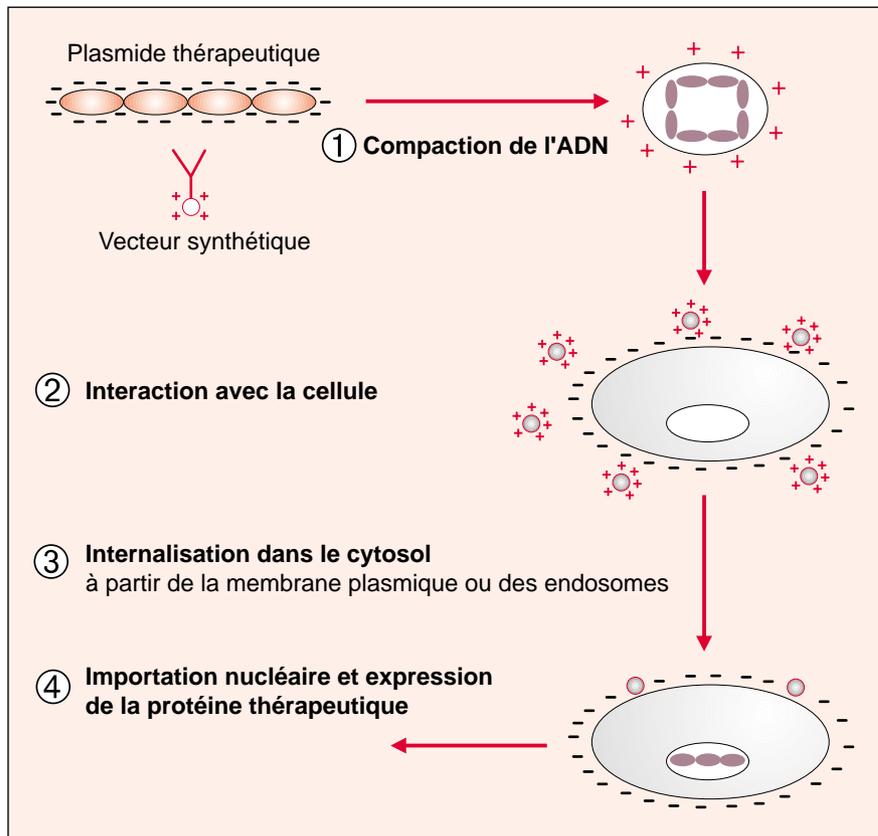


Figure 1. Principales fonctions des vecteurs synthétiques.

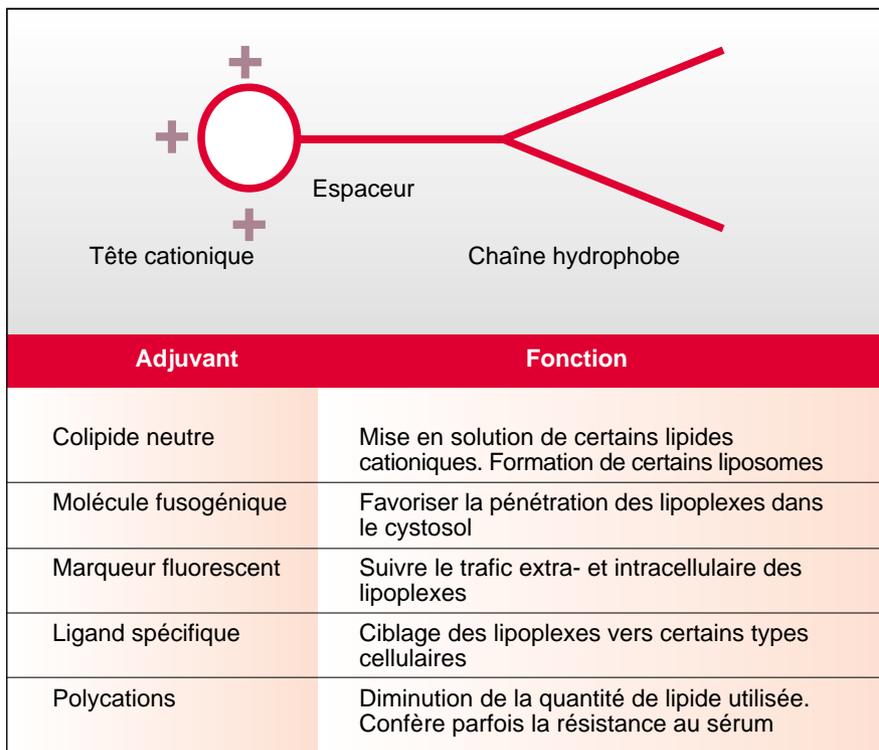


Figure 2. **Vecteurs lipidiques.**

par Zhang *et al.* [8, 9] contenant un dérivé amidine, ou celle développée par Okayama [10] avec un dérivé cholestérol contenant un groupe hydroéthylamine, démontrent chacune des avantages particuliers, comme une amélioration en termes d'efficacité de transfert de gène en présence de sérum, ou comme une réduction de la cytotoxicité.

On peut associer à l'ADN le lipide cationique, soit sous forme micellaire, soit sous forme liposomique. Dans le cas des micelles, le lipide cationique est suspendu seul, en solution aqueuse. Un chauffage (par exemple à 65 °C) et/ou une sonication peuvent être nécessaires à l'obtention des micelles. Alternativement, on peut formuler le lipide cationique en liposomes, en associant le lipide cationique avec un co-lipide neutre de type cholestérol ou DOPE. Les techniques classiques de préparation des liposomes sont alors utilisées : mélange du lipide cationique et du co-lipide dans un solvant comme le chloroforme-éthanol, évaporation du solvant dans un ballon sous vide, puis mise en suspension en rajoutant un tampon et en fournissant de

l'énergie par la sonication ou le chauffage. Cela conduit à la formation de liposomes, qui sont des vésicules renfermant un volume de solvant et formées par des bicouches membranaires, soit unilamellaires (*small unilamellar vesicle*, SUV, ou *large unilamellar vesicle*, LUV), soit multilamellaires.

Les micelles ou les vésicules sont ensuite mises en contact avec l'ADN plasmidique, dans un rapport de concentration variable. Qu'il s'agisse de micelles ou de liposomes, un paramètre crucial est le rapport entre les charges cationiques apportées par le lipide et les charges anioniques apportées par l'ADN ($R^{+/-}$). Du rapport de charge utilisé dépend directement l'efficacité de transfert de gène. Tous les expérimentateurs ont constaté qu'il existait un rapport de charge optimal pour le transfert de gène *in vitro*. A faible rapport de charge, la transfection est peu efficace. En augmentant $R^{+/-}$, le transfert de l'ADN devient plus efficace, jusqu'à ce que la toxicité cellulaire du lipide cationique contrebalance ce gain d'efficacité. Pour chaque vecteur cationique et chaque type cellu-

laire, ce rapport efficacité/toxicité varie, et est à déterminer au coup par coup par l'expérimentateur. Le concept d'un rapport de charge optimal est aussi applicable à l'utilisation des polymères cationiques tels que la polylysine ou le polyéthylénimine.

Les polymères polycationiques

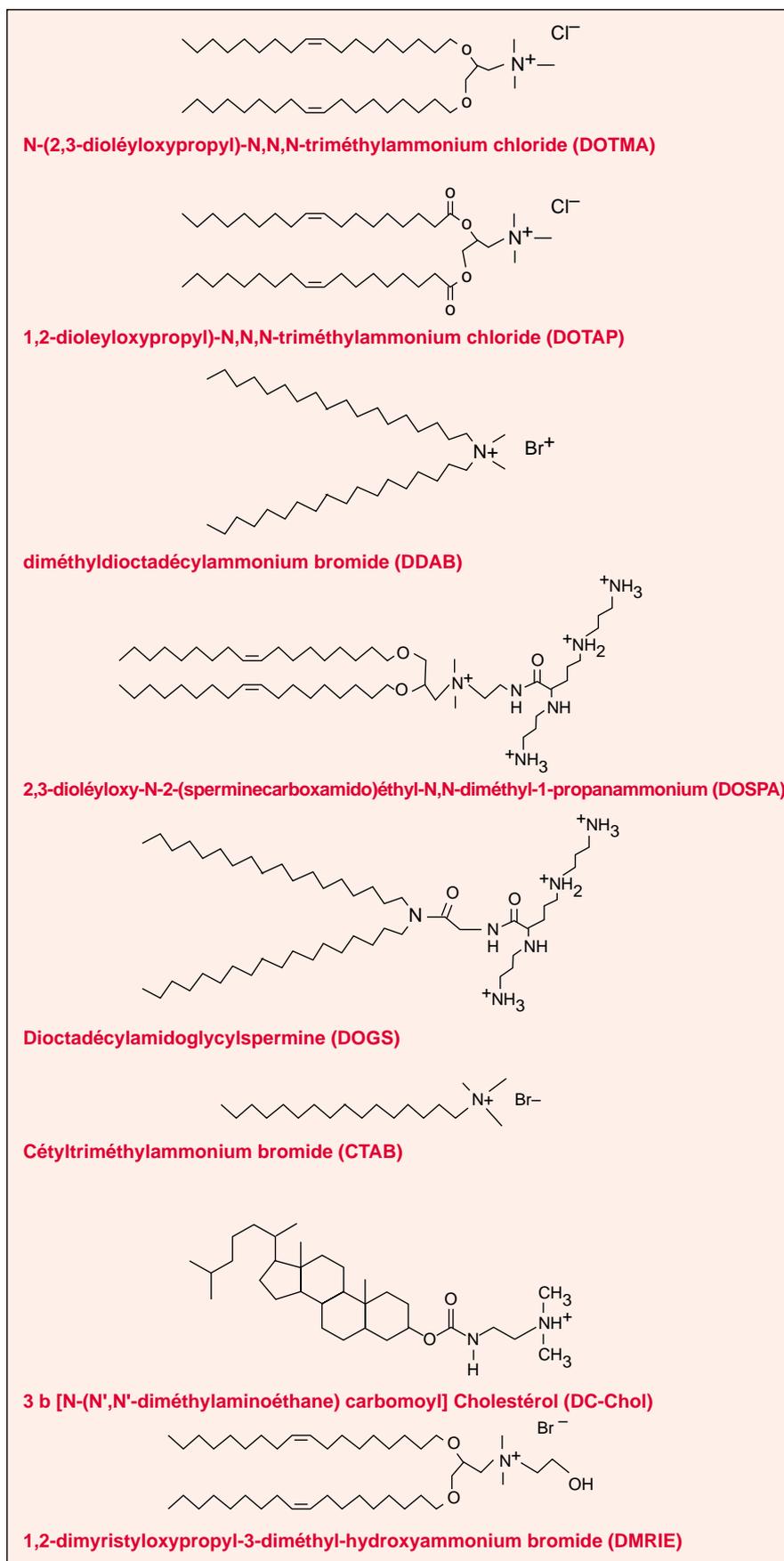
Les polymères polycationiques tels que la poly(L-lysine), la protamine, le polyéthylénimine, ou encore les dendrimères cationiques [11], s'associent à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples engendrant un processus de coopérativité, ce qui produit des particules appelées polyplexes. La poly(L-lysine) a été à l'origine le polymère cationique le plus couramment utilisé. Depuis lors, il a été montré que le polyéthylénimine (PEI) ou des dendrimères intacts ou fracturés de polyamidoamine pouvaient promouvoir avec efficacité le transfert de gène [12, 13]. Le PEI semble devoir son efficacité comme agent de transfert de gène à sa structure chimique caractéristique : un atome sur trois du PEI est un atome d'azote participant à un groupement amine protonable. Ce polymère cationique, dont les amines sont incomplètement protonées au pH physiologique, fonctionnerait dans les endosomes comme une éponge à proton aux propriétés endosomolytiques [12].

Faut-il ajouter un adjuvant à la formulation de l'ADN ?

L'amélioration des performances des vecteurs synthétiques passe également par l'ajout ou la greffe de molécules possédant des fonctions particulières (*figure 2*). Ces adjuvants peuvent remplir diverses fonctions.

Adjuvants pour la mise en solution des lipides

L'utilisation de DOPE ou de cholestérol, par exemple, est courante pour la mise en solution de lipides très hydrophobes, ou pour obtenir des liposomes. Certains lipides ne forment pas spontanément des



bicouches lipidiques, ce qui rend nécessaire l'ajout de tels colipides. Il a été montré que, par un mécanisme non élucidé, la DOPE accroissait l'efficacité de transfert de gène relayé par le Transfectam (DOGS) dans le cerveau [14], et que le cholestérol semblait améliorer le pouvoir transfectant dans le poumon de lipoplexes injectés par voie intraveineuse.

Augmentation de l'efficacité de transfection

Des molécules possédant une fonction fusiogène, c'est-à-dire capable d'induire une déstabilisation des membranes en vue de favoriser la libération intracellulaire des plasmides, peuvent être couplées à des vecteurs lipidiques [15, 16]. Dans une autre approche, des adjuvants, comme le dodécyl-2-(1'-imidazolyl) propionate ou DIP [17], sont ajoutés aux formulations lipidiques, ce qui confère aux liposomes cationiques un caractère « pH sensible », afin de promouvoir la libération des lipoplexes hors des endosomes.

La polylysine est faiblement active *per se* comme agent de transfert de gène, et a été généralement couplée à des molécules de phospholipides [18] ou à des peptides fusiogènes, afin d'augmenter l'efficacité de transfert de gène. Le couplage de la polylysine à des polymères hydrophiles tels que le poly(éthylène glycol) ou le dextran, confère aux polyplexes une meilleure solubilité et permet une réduction de la cytotoxicité [19]. Enfin, l'association de lipides cationiques et de polypeptides cationiques tels que la protamine permet d'augmenter l'efficacité de transfert de gène *in vivo* ou *in vitro* en présence de sérum [20, 21]. Ces systèmes ternaires, constitués d'ADN, de lipides et de polymères cationiques, ont été introduits par Lee et Huang [22]. Le polymère cationique, qui est souvent la protamine ou la polylysine, sert d'agent de condensation de l'ADN et permet une réduction à la

◀ Figure 3. **Structure chimique des lipides cationiques utilisés pour la transfection.**

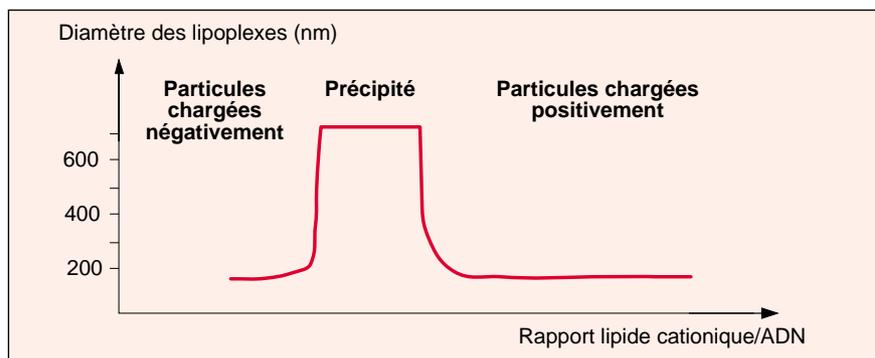


Figure 4. **Zones de stabilité colloïdale dépendantes du rapport de charge lipopolyamine/ADN (+/-).**

fois de la taille des particules obtenues et de la sensibilité de l'ADN vis-à-vis des nucléases.

Ciblage cellulaire des lipoplexes et polyplexes

Différentes molécules peuvent être utilisées pour le ciblage cellulaire. Par exemple, l'ajout de galactosides triantennés permet, *in vitro*, la fixation préférentielle des particules nucléolipidiques sur les récepteurs des asialoglycoprotéines de cellules d'hépatome HepG2 humaine : l'ajout de résidus galactosylés peut accroître l'efficacité de transfection *in vitro* d'un facteur 1000 [23]. Les polymères cationiques, tels que le PEI ou la polylysine, peuvent également être couplés à la transferrine ou à des anticorps comme les anti-CD3 qui permettent un ciblage *via* des récepteurs cellulaires particuliers [24].

Le couplage de transferrine présente, par exemple, un intérêt pour le transfert de gène ciblé vers les cellules tumorales, qui surexpriment le récepteur correspondant [25].

Compréhension des mécanismes de transfection

Le couplage de marqueurs fluorescents tels les dérivés de la rhodamine [7] permet une meilleure compréhension des mécanismes de formation des lipoplexes, du trafic intracellulaire, ou permet encore d'étudier la biodistribution des lipoplexes après transfection *in vivo* [26].

m/s n° 5, vol. 15, mai 99

Mécanismes physico-chimiques et cellulaires de l'association du vecteur à l'ADN et de la transfection

In vitro, les performances des lipoplexes ou polyplexes égalent ou même dépassent celles de certains vecteurs viraux. Cependant, cela n'est pas le cas *in vivo*, où la faible efficacité relative de transfert de gène des vecteurs synthétiques, ainsi que le manque de corrélation entre les études de transfection *in vitro* et *in vivo* réalisées avec ces formulations synthétiques, ont montré l'urgence d'acquiescer une meilleure compréhension de l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et cellulaires constituant le transfert de gène.

Comment caractériser la structure physico-chimique des lipoplexes/polyplexes ?

Les principales méthodes d'analyse des particules sont fondées sur les techniques de diffusion quasi élastique de la lumière, de microscopie électronique, de dichroïsme circulaire, ou de diffusion de rayons X. Peu de données sont aujourd'hui disponibles sur la structure des lipoplexes et des polyplexes. Brièvement, l'ADN, molécule polyanionique, interagit par des liaisons électrostatiques avec le vecteur cationique pour former une particule ADN-lipide (ou polymère) cationique d'environ 40 à 150 nm de diamètre, selon les formulations [13]. Selon la nature du vecteur cationique, l'ADN

peut être recouvert d'une double couche lipidique en une structure allongée tubulaire [27, 28], ou participer à la formation de particules sphériques où des molécules d'ADN sont intercalées entre des bicouches lipidiques avec une périodicité de 6 à 8 nm [29, 30]. L'ajout d'ADN à une solution de liposomes ou de micelles de lipides cationiques semble, de façon relativement générale, provoquer une réorganisation des lipides en une structure multilamellaire. L'ADN y est compacté et protégé des forces mécaniques ou biologiques telles que l'action des DNases extracellulaires.

Lors de la production de complexes ADN/vecteur, les quantités respectives d'ADN et de vecteur cationique, ainsi que la nature du solvant et le mode opératoire doivent être rigoureusement déterminés. Ces paramètres influent sur la structure des particules obtenues et sur l'efficacité de transfection. Ainsi, l'importance de la force ionique du solvant ou celle du mode opératoire [31] ont été récemment soulignées. De même, Pitard *et al.* [30] ont montré la présence de trois zones de stabilité colloïdale, dépendantes du rapport de charge lipopolyamine/ADN (+/-), et où les particules obtenues portent une charge globale respectivement négative, neutre ou positive (figure 4).

Comment les lipo-polyplexes pénètrent-ils dans les cellules ?

De nombreuses études ont été récemment menées pour mieux comprendre comment l'ADN pénètre dans les cellules, traverse le cytosol, et entre dans le noyau. Après interaction électrostatique des particules ADN-vecteur cationique avec les membranes cellulaires possédant une charge globale négative, l'entrée des particules dans les cellules procède vraisemblablement par endocytose. Il a en effet été montré que (1) la chloroquine et la cytochalasine B, deux inhibiteurs de l'endocytose, sont capables de moduler une transfection relayée par des liposomes cationiques ou par la polylysine [32, 33], et que (2) des lipoplexes ont été détectés dans des vésicules d'endocytose, ou endosomes, par microscopie

électronique ou microscopie de fluorescence [18, 34]. Cependant, des arguments en faveur d'un passage par fusion au niveau de la membrane plasmique ont été également présentés. En particulier, il a été montré que (1) des complexes ADN/lipides fluorescents sont capables de marquer la surface cellulaire [4]; (2) des liposomes formés de DOTMA et de DOPE fusionnent avec des liposomes chargés négativement comportant de la phosphatidylsérine, qui représentent des modèles de membranes cellulaires [35]. Quoi qu'il en soit, l'ADN pénètre « habillé » par le vecteur cationique, et son trafic intracellulaire dépendra à la fois du mode de pénétration dans les cellules et de la nature du vecteur cationique utilisé.

Trafic intracellulaire et pénétration dans le noyau cellulaire

Le trafic cytosolique et l'import nucléaire de plasmides constituent les étapes limitantes du transfert de gène par les vecteurs non viraux [34]. Il est reconnu que des molécules internalisées par endocytose se retrouvent dans des vésicules endosomiques qui s'acidifient et fusionnent avec des lysosomes, ce qui a pour conséquence la dégradation enzymatique et chimique des molécules endocytosées. Il est donc essentiel, dans le cas du transfert de gène, que l'ADN soit libéré des endosomes avant leur acidification. Ce mécanisme de libération de l'ADN pourrait se produire par la déstabilisation de la membrane endosomique par les chaînes hydrophobes des lipides cationiques ou neutres lorsque de la DOPE est utilisée [36], alternativement ou par un mécanisme d'éponge à protons [12, 28, 37] inhérent aux lipopolyamines et surtout au PEI, dont tous les groupements amines ne sont pas acidifiés au pH physiologique. En effet l'acidification des endosomes est créée par un mécanisme de pompe à protons qui s'accompagne d'un flux entrant de contre-ions chlorure, et la titration des protons par les amines non protonées résulte vraisemblablement en un choc osmotique lié à l'accumulation des ions chlorure et provoquant la déstabilisation des endosomes.

Le devenir intracellulaire des lipo-polyplexes semble différent selon l'emploi de polymères ou de lipides cationiques. Des expériences récentes de micro-injection ont montré que les polymères cationiques jouaient un rôle essentiel dans la migration cytoplasmique de l'ADN vers le noyau [38]. En revanche, l'ADN doit être libéré des lipides cationiques avant son entrée dans le noyau, car la micro-injection de lipoplexes dans le noyau ne conduit pas à l'expression du transgène [38]. Cette dissociation de l'ADN et des lipides cationiques pourrait procéder d'un échange entre l'ADN et des composants cellulaires anioniques. Toutefois, cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée. Dans tous les cas, l'expression du transgène ne semble pas nécessiter la division cellulaire, laquelle s'accompagne de la rupture de la membrane nucléaire, mais est toutefois favorisée par celle-ci.

Ainsi, si peu d'informations concernant le trafic intracellulaire et l'import nucléaire de l'ADN sont aujourd'hui disponibles, il apparaît néanmoins, à la lumière des dernières études réalisées, que ces deux étapes sont limitantes. Le développement de futurs vecteurs non viraux devra passer par une meilleure maîtrise de ces éléments, comme par exemple l'utilisation de séquences de ciblage nucléaire telles que les NLS [39, 40].

Applications du transfert de gène non viral

La faible corrélation observée ces dernières années entre les résultats issus d'études *in vitro* et *in vivo* a été à l'origine d'une généralisation de la réalisation d'essais *in vivo* pour la plupart des nouvelles formulations. L'administration des vecteurs non viraux s'effectue généralement de façon locale, essentiellement: (1) intratrachéale pour des affections telles que la mucoviscidose [8, 41]; (2) intratumorale par administration de gènes apoptotiques [42] ou responsables de la synthèse de cytokines [43]; (3) intracrânienne pour l'étude de modèles de la maladie de Parkinson par exemple [44]; ou encore (4) intra-artérielle pour les modèles de resténose [45]. L'injection systémique de lipoplexes ou polyplexes revêt, quant à elle, une

importance fondamentale pour atteindre l'ensemble du système endothélial, ou encore les métastases tumorales non résécables. Injectés dans la circulation, les lipoplexes semblent avoir un tropisme particulier pour les organes tels que le foie, les reins [46], ou encore les cellules endothéliales des capillaires du poumon, des ovaires, de l'hypophyse ou des tumeurs [47].

Le transfert de gène par voie systémique souffre cependant d'un relatif manque d'efficacité. Cela pourrait être dû au fait que les lipoplexes interagissent fortement avec des protéines du sérum, et sont internalisés par les cellules du système réticulo-endothélial. Afin de s'absoudre de ce dernier problème, des stratégies fondées sur l'utilisation de vecteurs synthétiques anioniques, ou de vecteurs cationiques recouverts de polymères hydrophiles ont été développées. Ces derniers types de vecteurs présentent une meilleure biodisponibilité, mais doivent être associés à des éléments de ciblage cellulaire pour permettre le franchissement des membranes cellulaires par endocytose relayée par un récepteur. Ces récepteurs peuvent être, dans le cas d'études en oncologie par exemple, le récepteur du folate [48], le récepteur c-kit, ou encore les récepteurs des facteurs EGF (*epidermal growth factors*) ou c-erb-2 [42].

Conclusions

Si seulement 60 essais cliniques environ ont été ou sont fondés à ce jour sur l'utilisation de vecteurs synthétiques, les derniers progrès réalisés dans la conception de nouveaux vecteurs en termes d'efficacité de transfert, de biodisponibilité, de réduction de la cytotoxicité, et de ciblage cellulaire sont encourageants. Depuis le développement de la première formulation synthétique, le DOTMA [4], la thérapie génique non virale n'a certes pas connu de révolution. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes physico-chimiques contrôlant l'association ADN-vecteur synthétique, la stabilité dans le sérum, et la capacité d'interaction et de franchissement des membranes cellulaires, a permis une évo-

lution vers la rationalisation de la conception de nouveaux vecteurs. Le vecteur synthétique idéal pour toutes les situations n'existe pas, mais ce vecteur devra être choisi en fonction de l'objectif à atteindre, selon qu'il s'agisse de transfert de gène *in vitro* ou *in vivo*, et selon le type cellulaire et le mode d'administration. Une alternative intéressante à l'utilisation de vecteurs synthétiques est l'emploi de méthodes physiques pour la transfection. Certaines techniques, comme celle dite du *gene gun*, permettent d'augmenter l'efficacité de transfert de gène dans le muscle et dans différents tissus [49-51]. Plusieurs essais cliniques de phase I faisant usage de cette technique sont actuellement en cours. Le tissu musculaire et les tumeurs sont également des cibles intéressantes pour le transfert de gènes utilisant les champs électriques: l'électrotransfert semble être une méthode de choix pour certaines applications de la thérapie génique [52-56] ■

Remerciements

Les auteurs remercient Michel Bessodes, Béatrice Cameron, J. Crouzet, Jean Herscovi, Bruno Pitard, Fabienne Soubrier et Pierre Wils pour leur participation à la réalisation de ce dossier technique.

Patrick Kreiss

Chercheur post-doctoral
École nationale supérieure de chimie de Paris, 11, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris, France.

Daniel Scherman

Directeur de recherche au Cnrs
Unité mixte 133 de vectorologie moléculaire et cellulaire, Cnrs-Rhône-Poulenc-Rorer, CRVA, 13, quai Jules-Guesde, BP 14, 94403 Vitry-sur-Seine, France et École nationale supérieure de chimie de Paris, 11, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris, France.

RÉFÉRENCES

- Soubrier F, Cameron B, Manse B, *et al.* pCOR: a new design of plasmid vectors for non viral gene therapy. *Gene Ther* 1999 (sous presse).
- Kreiss P, Cameron B, Darquet A, Scherman D, Crouzet J. Production of a new DNA vehicle for gene transfer using site-specific recombination. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998; 49: 560-7.
- Darquet A, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther* 1997; 4: 1341-9.
- Felgner P, Gadek T, Holm M, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7.
- Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 280-5.
- Behr J, Demeneix B, Loeffler J, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6982-6.
- Byk G, Dubertret C, Escriou V, *et al.* Synthesis, activity, and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer. *J Med Chem* 1998; 41: 229-35.
- Oudrhiri N, Vigneron J, Peuchmaur M, Leclerc T, Lehn J, Lehn P. Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1651-6.
- Zhang G, Gurtu V, Smith T, Nelson P, Kain S. A cationic lipid for rapid and efficient delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 126-9.
- Okayama R, Noji M, Nakanishi M. Cationic cholesterol with a hydroxyethylamino head group promotes significantly liposome-mediated gene transfection. *FEBS Lett* 1997; 408: 232-4.
- Haensler J, Szoka FJ. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 1993; 4: 372-9.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297-301.
- Tang M, Szoka F. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 1997; 4: 823-32.
- Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, *et al.* Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther* 1996; 3: 405-11.
- Mizuguchi H, Nakagawa T, Nakanishi M, Imazu S, Nakagawa S, Mayumi T. Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 402-7.
- Abe A, Miyanojara A, Friedmann T. Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *J Virol* 1998; 72: 6159-63.
- Liang E, Hughes J. Characterization of a pH-sensitive surfactant, dodecyl-2-(1'-imidazolyl) propionate (DIP), and preliminary studies in liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1369: 39-50.
- Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1189: 195-203.
- Toncheva V, Wolfert M, Dash P, *et al.* Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1380: 354-68.
- Li S, Rizzo M, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998; 5: 930-7.
- Schwartz B, Ivanov M, Pitard B, *et al.* *Gene Ther* 1999 (sous presse).
- Lee R, Huang L. Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carrier Sys* 1997; 14: 173-206.
- Remy J, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr J. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1744-8.
- Kircheis R, Kichler A, Wallner G, *et al.* Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 1997; 4: 409-18.
- Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel M. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4255-9.
- Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, Byk G, Scherman D, Wils P. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368: 276-88.
- Sternberg B, Sorgi F, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett* 1994; 356: 361-6.
- Labat-Moleur F, Steffan A, Brisson C, *et al.* An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; 3: 1010-7.
- Radler J, Koltover I, Salditt T, Safinya C. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 1997; 275: 810-4.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, *et al.* Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14412-7.
- Boussif O, Zanta M, Behr J. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* 1996; 3: 1074-80.

RÉFÉRENCES

32. Legendre J, Szoka FJ. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharmacol Res* 1992; 9: 1235-42.
33. Watanabe Y, Nomoto H, Takezawa R, Miyoshi N, Akaike T. Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposomes: an application for immunization. *J Biochem (Tokyo)* 1994; 116: 1220-6.
34. Zabner J, Fasbender A, Moninger T, Poellinger K, Welsh M. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 18997-9007.
35. Duzgunes N, Goldstein J, Friend D, Felgner P. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1989; 28: 9179-84.
36. El OA, Thiry M, Pector V, Fuks R, Ruyschaert J, Vandenbranden M. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett* 1997; 414: 187-92.
37. Behr J. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem* 1994; 5: 382-9.
38. Pollard H, Remy J, Loussouarn G, Demolombe S, Behr J, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 7507-11.
39. Sebestyen M, Ludtke J, Bassik M, et al. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 80-5.
40. Ciolina C, Byk G, Blanche F, Thuillier V, Scherman D, Wils, P. Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjug Chem* 1999; 10: 49-55.
41. Griesenbach U, Chonn A, Cassady R, et al. Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Ther* 1998; 5: 181-8.
42. Dachs G, Dougherty G, Stratford I, Chaplin, D. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997; 9: 313-25.
43. Namiki Y, Takahashi T, Ohno T. Gene transduction for disseminated intraperitoneal tumor using cationic liposomes containing non-histone chromatin proteins: cationic liposomal gene therapy of carcinomatosa. *Gene Ther* 1998; 5: 240-6.
44. Yang K, Clifton G, Hayes R. Gene therapy for central nervous system injury: the use of cationic liposomes: an invited review. *J Neurotrauma* 1997; 14: 281-97.
45. Kaneda Y, Morishita R, Dzau V. Prevention of restenosis by gene therapy. *Ann NY Acad Sci* 1997; 811: 299-308.
46. Lai L, Moeckel G, Lien Y. Kidney-targeted liposome-mediated gene transfer in mice. *Gene Ther* 1997; 4: 426-31.
47. McLean J, Fox E, Baluk P, et al. Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am J Physiol* 1997; 273: H387-404.
48. Lee R, Huang L. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem* 1996; 271: 8481-7.
49. Sun W, Burkholder J, Sun J, et al. *In vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2889-93.
50. Yang N, Sun W. Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med* 1995; 1: 481-3.
51. Tanelian D, Barry M, Johnston S, Le T, Smith, G. Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea. *Bio-techniques* 1997; 23: 484-8.
52. Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotech* 1998; 16: 867-70.
53. Mir L, Bureau M, Rangara R, Schwartz B, Scherman D. Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *CR Acad Sci Paris Life Sci* 1998; 321: 893-99.
54. Rols M, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 168-71.
55. Mathiesen I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Ther* 1999; 6: 508-14.
56. Mir LM, Bureau M, Gehl J, et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4262-7.

TIRÉS À PART

D. Scherman.