

RESUME

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive causée par des mutations du gène CFTR. La découverte en 1989 de ce gène a permis d'envisager de traiter cette maladie génétique récessive par thérapie génique, ce qui consiste à transférer à l'aide d'un vecteur, une version normale du gène CFTR dans les cellules atteintes des patients. En raison de la gravité des complications pulmonaires mais aussi de la prise en charge précoce, le tissu cible actuel pour le transfert de gènes est l'épithélium respiratoire, au niveau duquel les vecteurs peuvent être administrés directement in situ. Il s'agit donc d'une stratégie de thérapie génique somatique additive effectuée directement in vivo.

Les premiers essais cliniques dans ce domaine utilisèrent des vecteurs viraux dérivés d'adénovirus. Ils ont démontré, au niveau moléculaire et cellulaire, la faisabilité de l'approche, mais ils ont généralement aussi mis en évidence la survenue de réactions inflammatoires et immunologiques, qui sont évidemment préjudiciables pour des administrations répétées. La vectorologie adénovirale est cependant loin d'être sans ressource face à ces difficultés. Des vecteurs viraux de type AAV (adeno-associated virus) ont ainsi été développés. Les résultats des premiers essais cliniques avec des vecteurs AAV ont été très prometteurs, mais, malheureusement, un essai incluant un grand nombre de patients n'a pas confirmé ces observations. Les vecteurs lentiviraux, qui ont été développés plus récemment, n'ont pas encore été utilisés chez des patients atteints de mucoviscidose. Les expérimentations pré-cliniques ont montré que ces vecteurs ont des propriétés très favorables (grande efficacité, effet à long terme, faisabilité d'administrations répétées...). Diverses questions (production à très grande échelle, risque de mutagenèse insertionnelle et risque oncogénique) restent cependant sans réponses. Les essais cliniques futurs confirmeront ou non les espoirs placés dans les vecteurs lentiviraux. Si ces virus recombinants sont très performants, leur immunogénicité et leur potentiel insertionnel et oncogénique sont autant d'inconvénients majeurs que ne présentent pas les vecteurs synthétiques, et notamment les lipides cationiques.

Ainsi, comme une alternative à ces vecteurs viraux recombinants, un ensemble de vecteurs non-viraux ont été développés. Les essais cliniques menés dans le cadre de la mucoviscidose ont principalement utilisés des lipides cationiques. Ils ont permis de mettre en évidence une efficacité modeste et transitoire mais également une très faible toxicité et innocuité. Les recherches visent donc à développer de meilleures formulations, aussi bien en ce qui concerne les vecteurs chimiques eux-mêmes que les plasmides transportés.

Au sein de notre équipe ("Thérapie génique et cellulaire" - unité INSERM U1078), en étroite collaboration avec l'équipe "Phosphore et Vectorisation" de l'UMR CNRS 6521 à Brest et l'équipe de l'UMR CNRS 6226 de l'ENSC Rennes, j'ai travaillé au fil des années sur le développement et l'optimisation de lipides cationiques originaux afin de les rendre de plus en plus performants pour la délivrance de gènes d'intérêt. Lorsque notre collaboration a commencé, peu de vecteurs synthétiques phosphorylés avaient jusqu'alors été synthétisés et testés. Pourtant, les connaissances structurales et fonctionnelles des phospholipides membranaires naturels, ainsi que l'utilisation de colipides zwitterioniques phosphores DOPE et DOPC, laissaient supposer que les phospholipides d'inspiration biologique pourraient être d'excellents candidats pour le transfert de gènes. Ainsi, à partir d'une formule initiale mimant les phospholipides membranaires, plusieurs variations structurales ont été apportées et les efficacités de transfection des composés synthétisés ont ensuite été évaluées in vitro et in vivo. Plusieurs générations de vecteurs sont ainsi identifiables. Tout d'abord, celle des phosphonolipides monocationiques, composés d'une tête polaire ammonium reliée par un bras espaceur phosphonate à deux chaînes lipophiles (oléyle ($C_{18}H_{35}$), tétradécyle ($C_{14}H_{29}$) ou stéaryle ($C_{18}H_{37}$)). Dans un second temps, des variations au niveau de la tête polaire ont été apportées, telles que l'utilisation de polyamines, de différents ammonium quaternaires ou encore d'une fonction guanidinium. L'un de ses composés, le GLB73, montra une efficacité de transfection significative in vitro sur différents types cellulaires d'origine hématopoïétique, ainsi qu'après administration intraveineuse chez la souris. Les études de biodistribution menées en parallèle ont montré que les lipoplexes s'accumulaient notamment au niveau pulmonaire après injection systémique. La seconde génération fut caractérisée par le remplacement du cation ammonium par un arsonium ou un phosphonium, ainsi que par des variations sur la longueur de la chaîne carbonée du bras espaceur. Ce choix faisait suite à des études montrant que la substitution du groupement ammonium de deux agents antitumoraux (l'edelfosine et la miltefosine), par des fonctions phosphonium et arsonium, permettait de diminuer la toxicité des produits sans en modifier l'efficacité thérapeutique. Cette propriété fut également retrouvée concernant les nouveaux lipides cationiques synthétisés, ces derniers ayant également une plus grande efficacité de transfection. Dans le but d'améliorer les performances des phospholipides, l'introduction d'un nouvel espaceur phosphorylé a été réalisée. L'idée était de remplacer la liaison phosphonate par une liaison phosphoramide, susceptible d'être clivée lors de l'acidification des endosomes et ainsi favoriser la sortie de l'ADN libre à proximité du noyau. En plus des têtes polaires ammonium, phosphonium et arsonium évoquées précédemment, des têtes cationiques hétérocycliques (imidazolium, thiazolium et pyridinium) furent également testées. Bien que ces molécules s'avèrent insensibles à la gamme de pH retrouvée au niveau endosomal, les différents composés de cette famille montrèrent à nouveau une nette amélioration de l'efficacité de transfection in vitro et in vivo par rapport aux dérivés phosphonates. Ces composés permirent, entre autre, de transférer de façon efficace le gène CFTR

dans des cultures primaires établies à partir de polypes nasaux issus de patients mucoviscidosiques. Le niveau de toxicité induite s'est avéré être lié à la nature de la tête polaire, les composés possédant un ammonium étant beaucoup plus toxiques que ceux possédant un phosphonium, eux-mêmes plus toxiques que les composés arsonium. Parmi cette nouvelle génération de lipides appelés lipophosphoramidates, le KLN47, possédant deux chaînes oléiques a donné d'excellents résultats de transfection pour une toxicité limitée, et s'est depuis imposé comme un vecteur de référence au laboratoire et sur la plateforme IBiSA "SynNanoVect". Nos travaux se sont ensuite centrés sur la nature de la chaîne grasse des lipophosphoramidates. Des composés portant des chaînes aliphatiques à 18 carbones, possédant de 0 à 3 insaturations, ont ainsi été synthétisés et testés afin de savoir si ces variations pourraient conférer des caractéristiques physicochimiques propices au trafic intracellulaire des complexes (fluidité, fusogénicité, ...). Des études de physicochimie ont notamment été réalisées avec le composé BSV4, possédant des chaînes linoléiques (double insaturations). Bien qu'étant très toxique *in vitro*, ce composé se montrait particulièrement efficace pour transfecter *in vivo* le tissu pulmonaire murin après administration intraveineuse. Les études montrèrent que le BSV4 présentait davantage de fluidité mais était pourtant moins fusogène que le KLN47. D'autres têtes polaires ont été greffées sur la structure des lipophosphoramidates, telles que des têtes dicationiques associant un ammonium ou un imidazolium avec un ammonium, un phosphonium ou un arsonium. Cette stratégie avait pour but d'augmenter le nombre de charges positives permanentes par molécule et ainsi diminuer la quantité de matériel lipidique nécessaire pour condenser et délivrer une même quantité d'acides nucléiques. Les résultats donnèrent des efficacités de transfection *in vitro* intéressantes, le composé portant un ammonium central et un phosphonium terminal se montrant plus efficace et moins toxique que tous les autres composés (y compris les composés monocationiques). Dernièrement, nous avons aussi pu mettre en évidence que l'utilisation de chaînes aliphatiques phytanyles, sur les arsénolipides de dernière génération, permettait la formation de phases hexagonales inverses, une organisation supramoléculaire connue pour déstabiliser les vésicules d'endocytose et ainsi favoriser la délivrance cytosolique des acides nucléiques. Comparé à ses analogues, ce composé est particulièrement efficace et peu toxique *in vitro*, sur différentes lignées de cellules épithéliales bronchiques, mais également *in vivo* chez la souris, permettant d'augmenter et de rallonger l'expression du transgène dans les cellules épithéliales pulmonaires après injection systémique. La transfection effective des cellules épithéliales pulmonaires par voie IV a, en outre, été confirmée en utilisant un plasmide portant le gène CFTR, sur un modèle murin de la mucoviscidose.

Parallèlement, nous nous sommes également intéressés aux différentes atteintes provoquées par l'administration de ces lipoplexes, ainsi qu'à l'utilisation d'un plasmide optimisé pour permettre une expression soutenue du transgène. Une réponse inflammatoire aiguë modérée ainsi qu'une cytolysse hépatique sont systématiquement observées dans les soixante-douze heures suivant l'administration systémique des complexes, indépendamment de la présence de motifs immunostimulateurs C-G sur le plasmide utilisé, de la durée d'expression du transgène, ou encore de la nature du lipide. Ces réponses sont complètement réversibles, alors que les durées d'expression du transgène obtenues peuvent aller jusqu'à plus de 40 jours. Des réadministrations efficaces de lipoplexes sont également possibles, mais nécessitent un délai suffisant entre chaque injection, soulignant l'importance d'utiliser une construction d'acides nucléiques permettant une expression du transgène d'intérêt forte et stable dans le temps. L'administration intratrachéale de complexes judicieusement préparés a par ailleurs montré, par imagerie de bioluminescence, des cinétiques d'expression visibles jusqu'à plus de 100 jours après une seule administration. En collaboration avec l'équipe d'Oxford, nous avons également pu évaluer l'efficacité nos formulations au sein d'une cage de nébulisation sur un modèle de souris CFTR^{-/-}. Nos résultats montrent une activité luciférase significative détectable dans les broyats de poumons des souris traitées jusqu'à 28 jours post-aérosol. Ces formulations permettent donc une transfection des poumons de souris au moyen d'une procédure d'aérosolisation pertinente pour la clinique.

Ces résultats marquent un réel progrès dans l'optimisation structurale des vecteurs développés au sein de notre équipe ainsi que dans leur formulation, et nous encouragent à exploiter encore davantage leurs potentiels pour le transfert de gènes à destination du poumon, en se rapprochant encore plus des réalités cliniques d'un traitement adapté à la mucoviscidose, notamment sur la connaissance de paramètres intervenant lors de l'aérosolisation. Pour ce faire, des études de biodistribution et d'efficacité selon la formulation de ces complexes multimodulaires et de leur voie d'administration seront poursuivies, tout en s'assurant de leur innocuité.

Mots clefs : Transfection, Vecteurs synthétiques, Formulation, Mucoviscidose, CFTR, Bioluminescence, Innocuité.