

Résumé

La mucoviscidose est une maladie monogénique, caractérisée par des mutations survenant au niveau du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Le clonage en 1989 du gène CFTR a permis d'envisager de traiter cette maladie par thérapie génique. Cela 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, c'est l'épithélium respiratoire qui constitue aujourd'hui le tissu cible pour le transfert de gènes. Le principe de la thérapie génique est évidemment très séduisant et un certain nombre d'essais cliniques ont d'ores et déjà été réalisés. La thérapie génique nécessite des outils de vectorisation efficaces et compatibles avec une utilisation répétée en clinique. Mon sujet de thèse a porté donc sur le développement, la biodistribution et l'optimisation de vecteurs synthétiques (lipides cationiques) pour le transfert de gènes dans l'épithélium respiratoire. Au cours de mes travaux, nous avons donc pu mettre au point des lipophosphoramidates KLN47 fluorescents utiles pour les études de biodistribution in vivo. Comparés au KLN47 non fluorescent, ces nouveaux composés présentent les mêmes propriétés physicochimiques, à savoir une taille relativement petite et un potentiel zêta positif. Sur lignées cellulaires, nous avons montré que les nouvelles formulations étaient aussi efficaces que le KLN47, et pas ou peu toxiques. Ensuite, sur modèle animal, les profils de biodistribution de lipoplexes pégylés et non-pégylés ont été comparés après injection systémique. Les profils de biodistribution des lipoplexes pégylés et non-pégylés étaient similaires, cependant, la pégylation des complexes a conduit à une circulation prolongée dans la circulation sanguine, alors que l'expression du transgène (Luciférase) était équivalente dans les deux cas. De plus, l'activité Luciférase était similaire à celle obtenue avec le KLN47 non fluorescent. Nous avons ainsi démontré que l'ajout des sondes lipidiques fluorescentes dans la solution liposomale du KLN47, ne modifie pas ses propriétés physicochimiques et transfectantes. L'ensemble des résultats montre que nous disposons d'outils prometteurs pour les études de biodistribution in vivo. D'autres molécules ont également été testées avec succès.

• Title

Development, formulation and biodistribution of synthetic vectors for gene transfer in the context of gene therapy of cystic fibrosis

Abstract

Cystic fibrosis is a monogenic disease characterized by mutations occurring at the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene. The cloning in 1989 of the CFTR gene has enabled to consider treating this disease by gene therapy. This consists of transferring a normal version of the CFTR gene in the affected patients' cells, using a vector. Due to the severity of pulmonary complications, it is obvious that the respiratory epithelium constitutes the target tissue for the gene transfer. The principle of gene therapy is indeed very attractive and a number of clinical trials have already been made. Gene therapy requires vectorization tools that are efficient and compatible with repeated clinical use. My thesis has focused on the development, biodistribution and optimization of synthetic vectors (cationic lipids) for gene transfer in the respiratory epithelium. During my work, we were able to develop useful fluorescent KLN47 lipophosphoramidates for in vivo biodistribution studies. Compared to non fluorescent KLN47, these new compounds exhibit the same physicochemical properties: a relatively small size and a positive zeta potential. On cell lines, we found that the new formulations were as effective as the KLN47, with little or no toxicity. Then, in animal models, the biodistribution profiles of pegylated and non-pegylated lipoplexes were compared after systemic injection. The biodistribution profiles of pegylated and non-pegylated lipoplexes were similar. However, the pegylation of the complex resulted in prolonged circulation in the bloodstream, whereas transgene expression (Luciferase) was equivalent in both cases. In addition, luciferase activity was similar to that obtained with the non-fluorescent KLN47. We have demonstrated that the addition of fluorescent lipid probes in the liposomal solution KLN47, does not change its physicochemical and transfectant properties. The overall results show that we have promising tools for in vivo biodistribution studies. Other molecules have also been tested successfully