

Français

Développement, formulation et biodistribution de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose

L'utilisation des acides nucléiques est une approche thérapeutique très prometteuse en nanomédecine, notamment dans le but de pallier un défaut génétique. La thérapie génique de la mucoviscidose, à savoir le transfert d'une copie normale du gène CFTR dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire des patients, nécessite des outils de vectorisation particulièrement efficaces et adaptés à une exploitation en clinique humaine. Si les virus recombinants sont très performants, leur immunogénicité et leur potentiel oncogénique sont autant d'inconvénients majeurs que ne présentent pas les vecteurs synthétiques, et notamment les lipides cationiques. Le sujet de ma thèse a concerné le développement et l'optimisation de lipides cationiques pour le transfert de gènes à destination de l'épithélium respiratoire. Au cours de mes travaux, nous avons 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 nouveau 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 administration intraveineuse (IV). La transfection effective des cellules épithéliales pulmonaires par voie IV a, en outre, été confirmée en utilisant un plasmide codant CFTR, sur un modèle murin de la mucoviscidose. Nous nous sommes également intéressés aux différentes atteintes physiologiques provoquées par l'administration systémique de lipoplexes, ainsi qu'à l'utilisation d'un plasmide optimisé pour permettre une expression du transgène soutenue. Une réponse inflammatoire aiguë ainsi qu'une cytolyse hépatique sont systématiquement observées dans les premiers jours suivant l'administration 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 phénomènes ne durent que quelques jours, alors que les durées d'expression du transgène obtenues peuvent aller jusqu'à plus de 40 jours en utilisant un plasmide performant. Des réadministrations efficaces de lipoplexes sont 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. Ces résultats marquent un réel progrès dans l'optimisation structurale des vecteurs développés au laboratoire ainsi que dans leur formulation, et nous encourageant 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.

Anglais

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

The use of nucleic acids is a promising therapeutic approach in nanomedicine, in particular with the aim of remedying a genetic defect. Gene therapy for cystic fibrosis, namely the transfer of a normal copy of the *CFTR* gene into the epithelial cells of the respiratory tract of patients, requires particularly effective vectoring tools suitable for use in human clinics. If recombinant viruses are very efficient, their immunogenicity and oncogenic potential are all major drawbacks that synthetic vectors, and in particular cationic lipids, do not have. The subject of my thesis concerned the development and optimization of cationic lipids for gene transfer to the respiratory epithelium.

In this work, we were able to demonstrate that the use of phytanyl aliphatic chains, on the latest generation arsenolipids, allowed the formation of reverse hexagonal phases, a supramolecular organization known to destabilize endocytosis vesicles and thus to promote cytosolic delivery of nucleic acids. Compared to its analogues, this new compound was particularly effective and not very toxic *in vitro* but also in mice, where a higher and more sustained expression of the transgene was observed in pulmonary epithelial cells after intravenous (IV) administration.

We also investigated the various physiological damages caused by systemic administration of lipoplexes. We also used a plasmid optimized to allow sustained expression of the transgene. Acute inflammatory responses as well as a hepatic cytolysis were systematically observed in the first days after administration of the complexes, regardless of the presence of CG immunostimulatory motifs on the plasmid, the duration of transgene expression, or even the nature of the lipid. These phenomena last only a few days, while transgene could be expressed for more than 40 days using the codon-optimized plasmid. Efficient re-administration of lipoplexes was possible, but required sufficient time between each injection, emphasizing the importance of using nucleic acid constructs that give strong and stable transgene expressions. Intratracheal administration of judiciously prepared complexes also showed transgene expression kinetics (bioluminescence) of more than 100 days after a single administration. These results mark real progress in the structural optimization of vectors developed by our group as well as in their formulation, and encourage us to further exploit their potential for the transfer of genes to the lung.