



UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE

Ecole Doctorale Science et Ingénierie

Laboratoire LAMBE– Equipe de recherche MPI

NNT : XXXXEVRYXXXX

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 12 janvier 2012

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne

Discipline ou Spécialité : Chimie et Physicochimie des polymères

par :

Emilie BERTRAND

Synthèses et caractérisations de nouveaux polymères, à base de poly(éthylènimine), non toxiques et efficaces en thérapie génique

COMPOSITION DU JURY

Président :	M. MIDOUX Patrick	DR, Université Orléans
Rapporteurs :	M. PICTON Luc	Professeur, Université de Rouen
Rapporteurs :	M. JAFFRES Paul-Alain	Professeur, Université de Brest
Directeur de thèse :	M. GUEGAN Philippe	Professeur, Université d'Evry Val d'Essonne
Membre invité :	M. CHERADAME Hervé	Professeur, Université d'Evry Val d'Essonne

A ma famille

A Vincent

Remerciements

Ce travail de thèse a commencé dans le laboratoire Matériaux polymères aux interfaces de l'université d'Evry Val d'Essonne (UMR 7581 CNRS), sous la direction du Docteur Loïc AUVRAY. Depuis janvier 2010, le laboratoire est devenu une équipe du Laboratoire d'Analyse et de Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE) dirigé par le Professeur Jeanine TORJAJADA. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, le professeur Luc PICTON et le professeur Paul-Alain JAFFRES qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que les examinateurs : les professeurs Patrick MIDOUX, Hervé CHERADAME et Philippe GUEGAN.

J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur Philippe GUEGAN, mon directeur de thèse, pour tout ce qu'il m'a appris, la liberté qu'il m'a laissée dans mon travail et la confiance qu'il m'a témoignée.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur émérite Hervé CHERADAME pour son enthousiasme qu'il a montré à ce travail ainsi que pour ces nombreux encouragements et conseils pendant cette thèse.

Je remercie chaleureusement Patrick MIDOUX qui m'a accueillie au sein du Centre Biophysique Moléculaire (CBM) pour les tests biologiques qui furent réalisés sur les nouveaux polymères créés pendant cette thèse. Je tiens à remercier Chantal PICHON, Cristine GONCALVES, Jean-Pierre GOMEZ pour leur patience pendant qu'ils m'expliquaient le fonctionnement des tests. Un merci spécial à Frédéric qui était chargé de moi pendant les séjours à Orléans. Je te remercie pour ta patience et surtout pour l'attente du zétasizer. Merci aussi à Ludvine, Julie, Anthony et Thomas pour leur présence et leur gentillesse à mon égard pendant les semaines passées à Orléans. Ce fut un réel plaisir de venir travailler avec vous tous.

Je remercie également Didier LE CERF et Luc PICTON qui m'ont accueillie au sein du Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces pour réaliser les caractérisations de masses molaires des polymères synthétisés.

Je voudrais aussi remercier Pierre LEJHN et Tony LÉGALL pour leur chaleureux accueil pendant notre visite à Brest et la présentation de leur laboratoire. Merci à Tony d'avoir pris le temps de répondre à mes questions.

Je remercie avec beaucoup d'amitié tous les membres de notre petite équipe avec qui j'ai partagé un ordinateur, une paillasse... Bref le quotidien d'un chercheur, mais aussi tout ce qui rend le quotidien plus agréable : des sourires, des franches rigolades, de bons gâteaux, surtout au chocolat, et enfin quelques soirées sympas. Un immense merci à Nathalie JARROUX, Cécile HUIIN, Olex MACIEJAK, Véronique CÉLTON, Christine GUIIS pour leur gentillesse, leurs conseils et leur aide pendant toutes ces années. Sans leur concours, je n'aurais pas pu réaliser un aussi bon travail. Sans oublier Véronique LÉGRQS pour son immense aide avec le lyophilisateur et ses discussions, et Violette HALDYS, pour l'électrospray et la

recherche de quelques produits, et enfin William BUCHMAN et Cédric PRZYBYLSKI pour leur acharnement et leur temps à caractériser mes produits par Malditoff. Même si je finis cette thèse cette année, j'espère que vous trouverez un moyen de caractériser ces polymères. Merci à toutes les personnes du LAMBE et le personnel administratif que j'ai côtoyé pendant ses années.

J'accorderais une mention très spéciale à Bazofy avec qui j'ai eu la chance de partager de riches instants scientifiques et pour m'avoir supportée depuis son stage au sein du laboratoire et surtout pendant la conférence à Brest, juste après mon opération.

Je souhaiterais vivement la remercier, ainsi que Lisday, François et Linda pour leur bonne humeur, leur enthousiasme et leur amitié. Merci d'avoir partagé avec moi, vos souvenirs et votre musique traditionnelle de Madagascar, du Venezuela et de la Réunion

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Yassine pour son sérieux, son aide, sa patience et son amitié qui m'ont beaucoup appris et apporté.

Merci aussi à Pierre Jean, Zahra, Céline, Aziz, Elodie, Christophe, Johana, Mehdi, Marthe, Manel, Sarha, Afef, Henri et Ibtisen pour les bons moments passés en leur compagnie.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenue pendant ce travail. Merci pour vos messages d'encouragement. Je ne mets pas vos noms pour ne pas en oublier. Mais je voudrai au moins dire un grand merci à Mehdi LOUKIL qui m'a permis de récupérer par cinq fois des rapports ou chapitres de mémoire corrompus. Cela m'a permis de gagner beaucoup de temps !! Je souhaiterai aussi remercier Salika pour son amitié depuis qu'on se connaît ; et qui m'a toujours soutenue.

Je tiens à remercier toute ma famille : A mes parents, Françoise et Alain BERTRAND, et ma sœur Caroline pour leur aide et leur affection. A mes grands parents André et Ginette BERTRAND, ma tante Daniëlle et ma cousine Marion qui m'ont épaulée durant toutes mes années universitaires. Et à mes autres oncles et tantes, cousins et cousines pour leurs messages de soutien même si nous nous voyons peu. Merci d'avoir cru en moi.

Je finirais par remercier de tout mon cœur Vincent GOILLANDEAU, mon copain, qui a su me supporter pendant ses quatre années de thèse. Et surtout cette dernière année où j'étais une véritable boule de nerfs. Merci d'avoir toujours été là dans les meilleurs comme dans les pires moments, pour tes encouragements, ton soutien sans faille, ta patience, ta grande confiance en moi... Merci à ta famille qui m'a aussi soutenue, pris des nouvelles de l'avancement pendant l'écriture de ce mémoire.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES ANNEXES	20
LISTE DES ABREVIATIONS.....	21
INTRODUCTION	25
CHAPITRE 1 : <i>BIBLIOGRAPHIE : GENERALITES SUR LA THERAPIE GENIQUE</i>	28
I – Introduction.....	29
II – Le transfert de gène.....	30
II-1 - Les modes d'administration en thérapie génique	30
II-2 - Le trajet de l'ADN médicament jusqu'au noyau de la cellule	32
II-2. 1 L'interaction membranaire, fusion et endocytose.....	33
II-2. 2 Endocytose : libération dans le cytosol.....	34
II-2. 3 Migration et pénétration dans le noyau.....	35
II-2. 4 Synthèse de protéines : détection de la transfection cellulaire	36
III – Les outils du transfert de gène.....	36
III-1 - Les vecteurs viraux.....	37
III-2 - Les vecteurs non viraux, synthétiques	38
III-2. 1 Les lipides cationiques.....	38
III-2. 2 Les polymères amphiphiles neutres.....	40
III-2. 3 Les polymères cationiques.....	40

III-2. 3. 1 Généralités sur la complexation des polymères cationiques et l'ADN	41
III-2. 3. 2 La poly(L-lysine) (PLL) et ses dérivés	43
III-2. 3. 3 La poly(L-histidine) et ses dérivés	46
III-2. 3. 4 La polyamine-cyclodextrine	48
III-2. 3. 5 Les poly(éthylènimine)s (PEIs) et ses dérivés	50
III- 2. 3. 5. 1 Les poly(éthylènimine)s	50
III-2. 3. 5. 1. 1 – Etude physico-chimique des PEIs	51
III-2. 3. 5. 1. 2 – Complexation et taille des polyplexes	51
III-2. 3. 5. 1. 3 – Transfection	52
III-2. 3. 5. 1. 4 – Toxicité	53
III- 2. 3. 5. 2 Les modifications des PEIs	54
III-2. 3. 5. 2. 1 – Les PEIs modifiées poly(éthyl oxazolone)	55
III-2. 3. 5. 2. 2 – Les Poly(éthylènimine)-co-poly(éthylène glycol) PEIs-PEG	57
III-2. 3. 5. 2. 3 – Les PEIs-cyclodextrines	58
III-2. 3. 5. 2. 4 – Les PEIs acétylées	61
III-2. 3. 5. 2. 5 – Les PEIs-alkylée-carboxyle	63
III-2. 3. 5. 2. 6 – Les PEIs-sucres	66
III-2. 3. 5. 2. 7 – Les PEIs-sucres modifiées	69
III-2. 3. 5. 2. 8 – Les PEIs-lipides	72
III-2. 3. 5. 2. 9 – Les PEIs-polycaprolactones (PEI-PCL)	73
IV – Résumé des modifications des PEIs représentatives pour la transfection	77
V – Conclusion	82
CHAPITRE 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES	84
I – Préparation des synthons et des vecteurs synthétiques	85
I-1 – Caractéristiques des produits utilisés	85
I-2 – Synthèse des synthons précurseurs	86
I-2. 1 Synthèse de la poly(éthylènimine) linéaire	86
I-2. 3 Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle	87
I-2. 4 Synthèse de la l-histidine méthyle ester-N-acryloyle	88
I-2. 5 Synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle	89
I-2. 6 Synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle	90

I-2. 7 Synthèse de la L-arginine-N-acryloyle.....	91
I-3 - Réactions modèles.....	92
I-3. 1 Analyse de la stabilité de la spermine à différents pH.....	92
I-3. 2 Analyse de la réaction de Michaël entre la spermine et l'histidine-N-acryloyle.....	92
I-3. 3 Analyse de la stabilité de la lPEI à différents pH.....	93
I-4 - Modification de la lPEI par différents synthons sur la lPEI.....	94
I-4. 1 Modification de la lPEI par précurseurs d'acide aminé (premier protocole).....	94
I-4. 2 Modification de la lPEI par les précurseurs d'acide aminé (second protocole).....	94
I-4. 3 Modification de la lPEI par de l'histidine méthyle ester-N- acryloyle.....	96
I-4. 4 Modification de la lPEI par les synthons adamantanes.....	97
I-4. 5 Modification des lPEI-N-histidine par le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle.....	99
I-4. 6 Modification de la lPEI-N-histidine 21% par de l'arginine-N- acryloyle.....	100
II - Techniques d'analyse	101
II-1 - Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	101
II-1. 1 RMN du proton (¹ H).....	101
II-1. 2 RMN du carbone (¹³ C).....	101
II-1. 3 Généralités sur les expériences de RMN.....	102
II-1. 4 RMN DOSY.....	102
II-2 - Spectrométrie de masse (ESI/MS).....	103
II-3 - Dosage en retour des polycations.....	103
II-4 - Solubilité et masse molaire des polymère et détermination des diamètres des polyplexes par diffusion de la lumière dynamique	103
II-4. 1 Condition	103
III-4. 1. 1 <i>Solubilité et masse molaire des polymères</i>	103
III-4. 1. 1 <i>Détermination des diamètres des polyplexe polymère/plasmide</i>	104
II-4. 2 Protocole	104
II-5 - Le potentiel zêta.....	104

II-5. 1 Condition	104
II-5. 2 Protocole	105
II-6 - Chromatographie d'extrusion stérique (CES ou SEC)	105
III – Protocoles biologiques	105
III-1 - Gels d'électrophorèse	105
III-1. 1 Généralité sur l'électrophorèse	105
III-1. 2 Formation du gel retard d'agarose 6%	106
III-1. 3 Protocole	106
III-2 - Transfection in vitro	107
III-2. 1 Test luciférase	107
III-2. 2 Protocole de transfection	107
CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE DE DERIVÉS DE POLY(ÉTHYLENIMINE) LINÉAIRE	109
I – Synthèse des précurseurs.....	110
I-2 - Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle.....	110
I-3 - Synthèse de la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle.....	113
I-4 - Synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle	114
I-4 - Synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle.....	116
I-6 - Synthèse de la L-arginine-N-acryloyle	116
II – Modification des polymères.....	118
II-1 - Modification de la poly(2-éthyle-2-oxazoline)	118
II-1 .1 Synthèse de la lPEI	118
II-1 .2 Hydrolyse partielle de la poly(2-éthyle-2-oxazoline).....	119
II-2 - Modification de la lPEI par la L-histidine-N-acryloyle.....	119
II-2 .1 Réaction modèle	120
II-2. 1. 1 Analyse de la stabilité de la spermine dans différentes conditions de stockage.....	120
II-2. 1. 2 Analyse de la réaction modèle de Michaël entre la spermine et l'histidine-N-acryloyle.....	121
II-2. 1. 3 Analyse de la stabilité de la L-histidine-N-acryloyle.....	124
II-2 .2 Synthèse de la lPEI-N-his	126
II-2. 2. 1 Calculs de la fraction en histidine et du taux d'unités EI modifiées	129
II-2. 2. 2 Le pH du milieu réactionnel.....	132

II-2. 2. 3 Optimisation de la purification du polymère.....	133
II-2. 2. 4 La concentration en L-histidine-N-acryloyle dans le milieu réactionnel.....	134
II-2. 2. 5 Synthèse de la lPEI 2500 g.mol ⁻¹ -N-his.....	135
II-2. 2. 6 La stabilité de la poly(éthylènimine) linéaire.....	135
II-2. 2. 7 Détermination de la masse molaire des lPEI-N-his par diffusion de la lumière quasi-élastique et analyse chromatographique SEC.....	138
II-3 - Modification de la lPEI par la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle ou par la L-arginine-N-acryloyle.....	140
II-4 - Modification de la lPEI par les composés adamantane acryloyle.....	143
II-4 .1 Synthèse des lPEI modifiées.....	143
II-4 .2 Concentration en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle dans le milieu de réaction.....	146
II-5 - Etude cinétique de la modification de la lPEI par les synthons aminés et adamantane.....	147
II-6 - Modification des lPEI-N-his et lPEI-Me par le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle ou la L-arginine-N-acryloyle.....	149
III – Conclusion.....	154
CHAPITRE 4 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES NOUVEAUX VECTEURS ET TESTS BIOLOGIQUES.....	156
I – Caractérisations physico-chimiques des différents polymères.....	157
I-1 - Etude de la solubilité et des charges des différents polymères synthétisés en fonction du pH.....	158
I-1 .1 les lPEI-N-his.....	158
I-1. 1. 1 détermination de la solubilité des lPEI-N-his en fonction du pH.....	158
I-2. 1. 2 Détermination de la mobilité électrophorétique des lPEI-N-his.....	160
I-2. 1. 2. 1. Principe de mesure du potentiel zêta.....	160
I-2. 1. 2. 2 Applications aux systèmes lPEI-N-his.....	162
I-1 .2 les lPEI-N-ad, lPEI-N-his-N-ad et lPEI-N-his-N-arg.....	165
II-1. 2. 1 Détermination de la solubilité des lPEI-N-ad, lPEI-N-his-N-ad et lPEI-N-his-N-arg.....	165
II-2. 2. 2 Détermination de la mobilité électrophorétique des lPEI-N-ad, lPEI-N-his-N-ad et lPEI-N-his-N-arg.....	166

I-2 - Titration acido-basique des lPEI-N-his.....	168
I-2 .1 capacité tampon des polymères.....	169
I-2 .2 Détermination de pKa	170
I-2 .3 densité de charge.....	172
I-3 - Taux de charge des lPEI et lPEI-N-his 19% analysé par RMN ¹ H.....	173
II – Formulation et Caractérisations des polyplexes vecteurs/ADN.....	175
II-1 - Formation des complexes lPEI-N-his/ADN	175
II-1. 1 Formation des complexes lPEI-N-his/ADN.....	175
II-2. 2 diamètres et charges des complexes lPEI-N-his/ADN.....	177
II-2 - Formation des complexes lPEI-N-arg/ADN.....	178
II-3 - Formation des complexes lPEI-N-ad/ADN.....	180
II-3. 1 Influence du taux de modification de la lPEI en fonctions adamantane sur les propriétés de complexation de plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=7,4	180
II-3. 2 Formulation de polyplexes lPEI-N-ad 22% ou 24%/plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=5.....	183
II-3. 3 Formulation de polyplexes lPEI-N-ad 22 ou 24%/plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=5 et en présence de βCD	184
II-3. 4 Conclusion.....	188
III – Formulation des complexes lPEI-N-his/ADN pour la transfection in vivo.....	188
III-1 - Evolution du diamètre moyen des polyplexes en fonction de la concentration de plasmide pour un rapport ADN/lPEI-N-His de 6/1 (w/w)	189
III-2 - Formulation de polyplexes conduite à différentes concentrations de solution initiale de polymère et de plasmide	190
III-3 - Formulation de polyplexes en milieu dilué, suivi d'une reconcentration par évaporation	191
III-4 - Concentration de polyplexes par filtration sous centrifugation	192
III-5 - Influence du pH sur la formulation de polyplexes à base de lPEI-N-His en fonction du milieu de préparation	193
III-6 - Conclusion des études de formulation	194

IV – Transfection in vitro	194
IV-1 - Transfection de cellules HeLa à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoïque acide) linéaire (IPEI-N-his).....	195
IV-2 - Transfection de cellules C2C12 à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbominidamidopentanoïque acide) linéaire (IPEI-N-arg)	197
IV-4 - Transfection de cellules C2C12 à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoïque acide-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbominidamidopentanoïque acide) linéaire (IPEI-N-his-N-arg).....	199
V – Conclusion	200
CONCLUSION.....	201
BIBLIOGRAPHIE	203
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	218
RESUME	221
MOTS-CLES : LPEI, HISTIDINE-N-ACRYLOYLE, POLYPLEXE, TRANSFERT DE GENES, THERAPIE GENIQUE	221
ABSTRACT	221
KEYWORDS : LPEI, N-ACRYLOYL-HISTIDINE, NANOPARTICULES, GENE TRANSFERT ...	221

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : récapitulatif des cmc et des taille de trois polymères bPEI-(PCL-b-PEG) réalisée en solution aqueuse, et des tailles et du potentiel zêta des complexes bPEI-(PCL-b-PEG)/ADN formulés en solution aqueuse 150mM NaCl (pH=7) (N/P=7) ¹⁷⁸	76
Tableau 1-2 : Récapitulatif exhaustif des modifications des PEIs et de leur efficacité de transfection, in vitro et in vivo	78
Tableau 2-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors des synthèses des synthons et des vecteurs à base de lPEI	85
Tableau 2-2 : Caractéristiques des réactifs utilisés lors des synthèses des synthons et des vecteurs à base de lPEI	86
Tableau 2-3 : déplacements chimiques des molécules résiduelles protonées dans les solvants deutérés correspondants en RMN pour la calibration des spectres	102
Tableau 3-1 : Conditions opératoires employées lors de la synthèse de la L-histidine-N-acryloyle en milieu aqueux..	113
Tableau 3-2 : Conditions et résultats de l'hydrolyse de la poly(2-éthyle-2-oxazoline) dans H ₂ O en présence d'HCl (12N), à 100°C, à différents temps de réaction.([PmEOx]=1,7 mmolL ⁻¹).....	119
Tableau 3-3 : modification de la lPEI par la L-histidine-N-acryloyle menée à différents pH [his-N-acryl] = 0,24 M ; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O.....	132
Tableau 3-4 : modification de la lPEI par la L-histidine-N-acryloyle ([his-N-acryl] = 0,24 M ; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O), pH=7.....	133
Tableau 3-5 : modification de la lPEI par la L-histidine-N-acryloyle menée à différentes concentrations en his-N-acryl; [lPEI]=1,17 M (unité EI), T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O, pH=7.....	134
Tableau 3-6 : modification de la lPEI 2500 g.mol ⁻¹ par la L-histidine-N-acryloyle menée à deux concentrations en his-N-acryl; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O, pH=7.....	135
Tableau 3-7 : Récapitulatif des masses molaires des lPEIs (Mn _{théorique} = 22000g.mol ⁻¹) dans les conditions de stockage à différents pH, obtenues par diffusion de la lumière et par SEC (phase mobile eau+détection MALLS).....	137
Tableau 3-8: Calcul des masses molaires théoriques et détermination des masses molaires par DDL.....	138
Tableau 3-9: Caractérisation de la lPEI et la lPEI-His 19% par SEC dans H ₂ O (LiNO ₃ 5%) couplée MALLS.	139
Tableau 3-10 : modification de la lPEI par la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle menée à différentes concentrations en L-histidine méthyle ester-N-acryloyle; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O, pH=7.....	143
Tableau 3-11 : modification de la lPEI par la L-arginine-N-acryloyle menée à différentes concentrations en L-arginine-N-acryloyle; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H ₂ O, pH=7.....	143
Tableau 3-12 : Récapitulatif des quantités du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle utilisées pour la modification de la lPEI. [EI]= 1,17 M.	146
Tableau 3-13 : Constante de cinétique de la réaction de Michaël à 100°C.	149
Tableau 3-14 : Récapitulatifs des expériences associées aux polymères synthétisés, aux synthons utilisés, aux masses molaires de la lPEI et à la fraction en synthons obtenue.	155
Tableau 4-1 : Récapitulatif des volumes de soude versée à l'équivalence, la demi-équivalence, des pKa associés aux volumes des demi-équivalences et les fonctions protonables adjointes.....	171
Tableau 4-2 : Récapitulatif des ratios de complexation totale du plasmide pTG11033 (9,5 kb) exprimé en w/w et N/P des lPEI, lPEI-N-his 7,44%, 16%, 24% et 32% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg de plasmide [plasmide] _{initiale} =1µg/ml).....	176

<i>Tableau 4-3 : Récapitulatif des diamètres et des charges des polyplexes au ratio (w/w) 6/1 pour une quantité en lPEI-N-his de 45 µg et en ADN de 7,5µg (2,5.10⁻² mol de P).....</i>	<i>178</i>
<i>Tableau 4-4 : Récapitulatif des ratios de complexation limites w/w et N/P des lPEI, lPEI-N-his 16%, lPEI-N-arg 14% et 22% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg d'ADN)</i>	<i>179</i>
<i>Tableau 4-5 : Récapitulatif des ratios limites de complexation w/w et N/P du plasmide pTG11033-luc possédant 9,5 kb, par les lPEI, lPEI-N-ad 0,4%, 4% et 23% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg d'ADN)</i>	<i>182</i>
<i>Tableau 4-6 : Tableau récapitulatif des compositions de polyplexes à base de plasmide pTG11033 possédant 9,5 kp (1µg), de lPEI-Ad-22% et un défaut βCD formulé par complexe d'inclusion (ratio mol/mol) (a), puis réalisation de polyplexe (ratio w/w) (b). Les formulations de polyplexes sont réalisées dans un volume totale de 190 µl de tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.</i>	<i>185</i>
<i>Tableau 4-7 : Tableau récapitulatif des compositions de polyplexes à base de plasmide pGT11033 possédant 9,5 kb (1µg), de lPEI-Ad-22% et un excès de βCD. 1) Formulation des polyplexes polymère/plasmide à différents ratio (w/w), dans un volume totale de 190 ml de tampon HEPES 10 mM à pH=7,4. 2) Formation des complexes d'inclusion à différents ratios résidus adamantane/βCD (ratio molaire), à partir des polyplexes</i>	<i>187</i>
<i>Tableau 4-8 Diamètres de polyplexes (par diffusion de la lumière dynamique) formulés à partir de lPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différentes quantités d'ADN dans 190 µl de solution HEPES. ([plasmide]_{initiale} = 1mg/mL).....</i>	<i>189</i>
<i>Tableau 4-9 : Diamètres (par diffusion de la lumière dynamique) de formulation de polyplexes lPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différents volumes de solution HEPES. (m_{ADN}=25 µg).....</i>	<i>190</i>
<i>Tableau 4-10 : Influence de méthodes de concentration sur une formulation de polyplexes lPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 conduisant à une concentration de 25 µg de plasmide 9,5kb dans 2,775 µl d'eau milliQ contenant 10mM d'HEPES.....</i>	<i>191</i>
<i>Tableau 4-11 : Influence d'une filtration de formulation de polyplexes lPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différentes concentrations en ADN ([plasmide]_{initiale}=1µg/ml) obtenu dans 2,775 µL d'eau milliQ contenant 10 mM d'HEPES)</i>	<i>192</i>
<i>Tableau 4-12 : Influence du pH de formulation sur les caractéristiques (diamètre moyen) des polyplexes à base de lPEI-N-his 16 et du plasmide pTG11033 (9,5kb), au ratio w/w=6/1 (7,5 µg de plasmide ([plasmide]_{initiale}=1 mg/ml sont dissous dans 100 µl de tampon HEPES 10 mM. 45 µg de polymère (1µg/µl) sont dissous dans 90 µl de tampon HEPES 10 mM.....</i>	<i>193</i>

Liste des figures

Figure 1-1 : représentation des bases de l'ADN formant la double hélice.....	29
Figure 1-2 : représentation par secteur décrivant les maladies susceptibles d'utiliser la thérapie génique ¹⁰	30
Figure 1-3 : voies d'administration et méthodes physiques du transfert de gènes ²⁰ (A) et voies d'administration par aérosol ²¹ (B).....	31
Figure 1-4 : Différentes étapes du transfert de gène : I passage de la matrice extracellulaire (MEC) ; II passage de la membrane plasmidique; III libération du vecteur dans le cytoplasme ; IV migration du gène médicament vers le noyau ; V internalisation du gène médicament dans le noyau.....	32
Figure 1-5 : Différents mécanismes d'endocytose de la cellule : A) phagocytose, B) macropinocytose, C) endocytose clathrines dépendantes, D) endocytose cavéoles dépendantes, E) endocytose non spécifique (vésicule non tapissée), F) endocytose à récepteurs spécifiques	34
Figure 1-6 : transport du polyplexe dans le cytosol par les filaments du cytosquelette ²²	35
Figure 1-7 : schéma de l'introduction d'un gène dans une cellule, par un adénovirus ⁷¹	37
Figure 1-8 : Structure représentative du lipide cationique Dotma : chlorure de N-[1-(2, 3-dioleloxy) propyl]-N, N, N-triméthylammonium. Représentation des structures possibles de chaque composant d'un lipide cationique type ⁷⁸	39
Figure 1-9 : Mobilité électronique (1) et rayon hydrodynamique Rh(2) des complexes ADN-lPEI 2,5kDa (■) et ADN-lPEI 25kDa (●) dans Tris 10 mM à pH=7,4, [I]=0,15M en fonction du rapport de charge X. [ADN]=[EI]=0,01%.....	41
Figure 1-10 : condensation de l'ADN par de la poly(L-lysine), le complexe forme un toroïde ¹¹¹	42
Figure 1-11 : structure de la poly (L-lysine)	43
Figure 1-12 : Synthèse de la poly(L-lysine) par mécanisme de polymérisation par ouverture de cycles.....	43
Figure 1-13 : synthèse de la PLL-graft-acide imidazole acétique par la réaction d'amidation	44
Figure 1-14 : structure de la poly (L-lysine) histidinilée.....	45
Figure 1-15 : synthèse de la N-acétyl-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) ¹²⁴	46
Figure 1-16 : Structure de la poly(L-histidine)	47
Figure 1-17 : synthèse de la Poly(L-histidine) aminée par la réaction d'alkylation ¹²⁷ (A)et de la poly(L-histidine) carboxyméthyle par alkylation ¹²⁶ (B).....	47
Figure 1-18 : Synthèse des copolymères 6A, 6D-Dideoxy-6A, 6D-diamino-β-cyclodextrine-DMS (A) et 6A, 6D-dideoxy-6A, 6D - di (2-aminoethanethio)- β-cyclodextrine-DMS (B).....	49
Figure 1-19 : Structures chimiques de la lPEI (A) et de la bPEI (B)	50
Figure 1-20 : Efficacité de différents polymères cationiques en transfection in vitro (les cellules 3T3 sont transfectées avec 2 mg de plasmide pCMV-Luc, complexé avec des vecteur au ratio optimal de transfection) ¹⁴¹	53
Figure 1-21 : synthèse des copolymères LP(EI-co-PEI) et LNPEI	55
Figure 1-22 : synthèdede des copolymères poly(éthylènimine-co-N-(2-aminoéthylènimine) (A) et la poly(éthylènimine-co-N-(2-diméthylaminoéthyl)éthylènimine)(B).....	56
Figure 1-23 : Synthèse du poly(EG-b-EI).....	57
Figure 1-24 : Synthèse de la bPEI 25000 gmoI ¹ -βCD et de la lPEI25000 gmoI ¹ -βCD.....	59
Figure 1-25 : Synthèse de la bPEI-βCD-peptide et de la bPEI-γCD-peptide ¹⁶²	60

Figure 1-26 : réaction d'acétylation sur les amines primaires (A) et les amines secondaires (B) de la bPEI à 60°C durant 4 heures ¹⁶⁴	61
Figure 1-27 : Synthèse de la bPEI acétylée, puis association du PEG-bis-phosphate ¹⁶⁶	62
Figure 1-28 : réaction d'alkylation de la bPEI ^{167, 168}	64
Figure 3-29 : synthèse de la bPEI carboxylate oligoaminée par réaction d'amidation	65
Figure 1-30 : Synthèse de la bPEI-gallactose	67
Figure 1-31 : Synthèse de le bPEI -g-chitosane	68
Figure 1-32 : Synthèse de la bPEI-Gal-PVP ou GPP (x=29, y=44, z=121).....	69
Figure 1-33 : synthèse de la Gal-PEG-CHI-g-bPEI ($Mn_{chitosane}=100000 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{bPEI}=25000 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{PEG}=5000 \text{ g.mol}^{-1}$), 14,2% mol de galactose est greffé à la CHI-g-b PEI.....	71
Figure 1-34 : synthèse de la bPEI cholestérol et de la bPEI myristate	73
Figure 1-35 : synthèse de la PEI-co-polycaprolactone par réaction de Michaël.....	74
Figure 1-36 : synthèse de la poly(éthylènimine) branchée-g-(polycaprolactone-b-poly(éthylène glycol) (bPEI-(PCL-b-PEG), masse molaire utilisée : $Mn_{PEG}=5000 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{polycaprolacton}=1800, 3800 \text{ et } 5500 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{bPEI}=800, 2000 \text{ et } 25000 \text{ g.mol}^{-1}$. ¹⁷⁸	75
Figure 2-1 : Synthèse de la Poly (Ethylènimine).....	86
Figure 2-2 : Synthèse de l'histidine-N-acryloyle	87
Figure 2-3 : Synthèse de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle	88
Figure 2-4 : Synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle.....	89
Figure 2-5 : Synthèse du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle	90
Figure 2-6 : Synthèse de l'arginine-N-acryloyle	91
Figure 2-7 : Réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la spermine.....	93
Figure 2-8 : dégradation de la poly(éthylènimine) linéaire à différents pH dans les conditions de la réaction de Michaël	94
Figure 2-9 : Réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la lPEI.....	95
Figure 2-10 : Réaction de greffage de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle sur la lPEI.....	97
Figure 2-11 : Réaction de modification de la lPEI par du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle.....	98
Figure 2-12 : Réaction de greffage du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle sur la lPEI-N-histidine 24%	99
Figure 2-13 : Réaction de modification de la lPEI-N-his 21% par de l'arginine-N-acryloyle	101
Figure 3-1 : Schéma de synthèse de la L-histidine-N-acryloyle	110
Figure 3-2 : Résultats des tests de précipitation de la L-histidine dans l'acétone en fonction du pH du mélange et de la forme protonée de l'acide aminé.....	111
Figure 3-3 : Spectre RMN ¹ H de la L-histidine-N-acryloyle (EB128e) dans le DMSO-d ₆ à 25°C, ([EB128e]=20 mg/ml)	112
Figure 3-4 : Spectre ESI-MS de l'histidine-N-acryloyle dans H ₂ O ([EB103]=1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹)	112
Figure 3-5 : Schéma de synthèse de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle.....	113
Figure 3-6 : Spectre RMN ¹ H la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle (EB061a) dans DMSO-d ₆ à 25°C, ([EB061a]=20 mg/ml).....	114
Figure 3-7 : Schéma de synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle	114

Figure 3-8 : Spectre RMN ¹ H du 1-adamantane alcool-O-acryloyle (EB014a) dans CDCl ₃ à 25°C, ([EB014a]=20 mg/ml).....	115
Figure 3-9 : Spectre ESI-MS du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle ([EB014a]=1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹).....	115
Figure 3-10 : Schéma de synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle.....	116
Figure 3-11 : Spectre RMN ¹ H du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (EB016a) dans CDCl ₃ , à 25°C, ([EB016a]=20 mg/ml).....	116
Figure 3-12 : Schéma de synthèse de la L-arginine-N-acryloyle.....	117
Figure 3-13 : Spectre RMN ¹ H de l'arginine-N-acryloyle (EB101d) réalisé dans D ₂ O à 25°C, ([EB101d]=20 mg/ml).....	117
Figure 3-14 : Schéma de synthèse de la poly(éthylènimine) linéaire.....	118
Figure 3-15 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine) linéaire (EB017) dans D ₂ O contenant 5µl de TFA à 25°C, ([EB017]=20 mg/ml).....	118
Figure 3-16 : Structure de la spermine.....	119
Figure 3-17 : Spectre ESI-MS après réaction à pH=2,3 (EB108) de la spermine dans D ₂ O à 25°C ([EB108]=1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹).....	120
Figure 3-18 : Spectre RMN ¹ H après réaction à pH=2,3 (EB108) de la spermine dans D ₂ O à 25°C, ([EB108]=20 mg/ml).....	121
Figure 3-19 : Schéma de la réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la spermine.....	121
Figure 3-20 : Spectre RMN ¹ H brut de la spermine-N-his (EB102) dans du D ₂ O pH=7, à 25°C, ([EB102]=20 mg/ml).....	122
Figure 3-21 : Spectre RMN 2D COSY de la spermine-N-his (EB102 brut) dans du D ₂ O pH=7, à 25°C, ([EB102]=20 mg/ml).....	123
Figure 3-22 : Spectre ESI-MS brut de la spermine-N-his dans du D ₂ O (EB102 : synthèse réalisée à pH=7), ([EB102]=1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹).....	124
Figure 3-23 : Spectre RMN ¹ H de la réaction de Michael sur la L-histidine-N-acryloyle (EB103) dans D ₂ O à 25°C, ([EB103e]=20 mg/ml).....	125
Figure 3-24 : Spectre ESI-MS de EB103 brut dans H ₂ O en mode anionique ([EB103]=1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹).....	126
Figure 3-25 : Schéma de la Réaction d'Aza-Michaël entre la L-histidine-N-acryloyle et la IPEI.....	127
Figure 3-26 : Mécanisme de la réaction d'addition d'Aza-Michaël entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle.....	127
Figure 3-27 : Spectre RMN ¹ H de la IPEI-N-his greffée à 19% dans D ₂ O pH=7, à 25°C, ([EB154a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his est schématisée.....	128
Figure 3-28 : Spectre RMN ¹³ C quantitative de la IPEI-N-his greffée à 19% (EB154a) dans D ₂ O pH=7 à 25°C, ([EB154a]=200 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his est schématisée.....	129
Figure 3-29 : Structure du copolymère statistique de la IPEI-N-his 18,6% (EB154a).....	132
Figure 3-30 : Equilibre chimique acide base de la IPEI.....	133
Figure 3-31 : Spectre RMN ¹ H de la IPEI (EB115) dans D ₂ O à pH=6, à 25°C, ([EB115]=20 mg/ml).....	136
Figure 3-32 : Schéma de la réaction de Michaël de la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle (A) ou de la L-arginine-N-acryloyle (B) sur la IPEI.....	140

Figure 3-33 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl)propanoate méthyle ester) ou IPEI-N-his Me 19% (EB019a) dans D ₂ O à 25°C, ([EB019a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his Me est schématisée.	141
Figure 3-34 : Spectre RMN ¹ H de la poly(Ethylènimine-co-Ethylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide) (IPEI-N-arg 21% (EB143a)) dans D ₂ O à pH=7 à 25°C, ([EB143a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-arg est schématisée.	141
Figure 3-35 : Structure des copolymères statistiques de la IPEI-N-his Me 19% (A) et de la IPEI-N-arg 21% (B)	142
Figure 3-36 : Schéma de la réaction de Michaël des composés adamantane-acryloyle sur la IPEI.....	144
Figure 3-37 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylester-O-1-adamantane éthanol) (IPEI-O-ad :EB007d) dans CDCl ₃ à 25°C, ([EB007d] 20 mg/ml).....	144
Figure 3-38 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-ad :EB024a) dans D ₂ O à 25°C, ([EB024a]=20 mg/ml).....	145
Figure 3-39 : Structure des copolymères statistiques de la IPEI-N-ad 24%.....	146
Figure 3-40 : cinétique de la réaction de Michaël entre la IPEI et les précurseurs acryloyle à 100°C représentée selon un mécanisme d'ordre 2, hors stœchiométrie.....	148
Figure 3-41 : Schéma de réaction de modification du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (B) ou de la L-arginine-N-acryloyle (B) sur les IPEI-N-his.....	150
Figure 3-42 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl)propanoïque acide) -co- éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-his 24%-N-ad 5% (EB147c)) dans D ₂ O à 25°C, ([EB147c]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his-N-ad est schématisée.....	151
Figure 3-43 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl)propanoate méthyle ester)-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-his Me 19%-N-ad 5%(EB058a)) dans D ₂ O à 25°C, ([EB058a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his Me-N-ad est schématisée.....	151
Figure 3-44 : Spectre RMN ¹ H de la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl)propanoïque acide-co-Ethylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide), (IPEI-N-his-N-arg)(IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5 (EB190a)) dans D ₂ O à 25°C, ([EB190a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his-N-arg est schématisée.....	152
Figure 3-45 : Structure possible des copolymères statistiques en prenant pour exemple la IPEI-N-his17.6%N-ad5% (EB147c).....	154
Figure 4-1 : Variation du rayon hydrodynamique (Rh (nm)) en fonction du pH, des IPEI et IPEI-N-his ([polymère]= 1 g/L ¹) à T°C=25°C.....	159
Figure 4-2 : Schéma représentatif du potentiel zêta ²⁰¹	161
Figure 4-3 : Variation du potentiel zêta (ζ (mV)) en fonction du pH pour les IPEI-N-his à différents taux de modification ([polymère]=10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹), à T°C=25°C,(trait en pointillé= zone turbide, trait plein, zone de solubilité)163	
Figure 4-4 : zone de turbidité des IPEI-N-his en fonction du pH dans différents milieux aqueux	164
Figure 4-5 : Variation du rayon hydrodynamique (Rh (nm)) en fonction du pH, des IPEI et IPEI-N-his 24%, IPEI-N-ad, IPEI-N-his 24%-N-ad 5% et IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% ([polymère]= 1 g/L ¹) à T°C=25°C.....	165

Figure 4-6 : Variation du potentiel zêta (ζ (mV)) en fonction du pH pour les lPEI-N-his24%, lPEI-N-ad 5%, lPEI-N-his 24%-N-ad 5% et lPEI-N-his 21%-N-arg 13,5%([polymère]= 10^{-5} mol.L ⁻¹), à T°C=25°C, (trait en pointillé= zone turbide, trait plein, zone de solubilité).....	167
Figure 4-7: Titration de la solution aqueuse des lPEI, lPEI-N-his de 7,4 à 67% ([EI] = 25 mM) avec une solution de NaOH (0.05M) de pH=2 à 9. Des solutions ont été ajustées à pH = 2 avec du HCL 0,1 M. Ensuite, des aliquotes de 20 µl de NaOH à 0,05 M sont ajoutés et le pH a mesuré avant chaque ajout.....	169
Figure 4-8 : Titration de la solution aqueuse de polymère ([EI] = 25 mM) avec une solution de NaOH (0.05M) de pH=2 à 9 de lalPEI-N-his 16% et dérivée associée à cette titration.....	170
Figure 4-9 : structure schématique de la lPEI-N-his avec les espèces protonables identifiées dans un cercle.....	171
Figure 4-10 : taux de charge f ⁺ des lPEI et lPEI-N-his en fonction du pH, obtenue par titration acide base ([EI]=25mM pour les lPEI, lPEI-N-his 7,4% et lPEI-N-his 16%).....	173
Figure 4-11 : Evolution des spectres RMN ¹ H de la lPEI (A) ([EI]=0,47M) et lPEI (B) ([EI]=0,52M) en fonction du pH.....	174
Figure 4-12 : taux de charge f ⁺ des unités EI de la lPEI (en marron) et de la lPEI-N-his 19% (en bleu) en fonction du pH ([lPEI-N-his 19%]=0,52M et [lPEI]=0,47), déterminé par RMN ¹ H.....	174
Figure 4-13 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide par les lPEI (a), lPEI-N-his 7,4% (b), 16% (c) 24% (d), 32% (e) et 67% (f) à différents ratios polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.....	176
Figure 4-14 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par les lPEI-N-arg 14% (a) et lPEI-N-arg 22% (b) à différents ratios polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.....	179
Figure 4-15 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par les lPEI-N-ad 4% à différent ratio polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans le tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.	181
Figure 4-16 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par les lPEI-N-ad 22% (a) et 24% (b) à différent ratio polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans le tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.....	181
Figure 4-17 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide pTG11033 (9,5 kb) par les lPEI-N-ad 22% (a) et 24% (b) à différent ratio polymère/plasmide (w/w). Les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=5.	183
Figure 4-18 : formulation des polyplexes lPEI-N-ad/plasmide en présence de βCD. 1) formation du complexe d'inclusion lPEI-N-ad/βCD, 2) formation du polyplexe lPEI-N-ad-βCD/plasmide, en tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.....	184
Figure 4-19 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide pTG11033 (9,5kb) par les lPEI-N-ad 22% avec l'ajout de la βCD avant la formation des polyplexes (a) et après la formation des polyplexes (b), à différent ratio polymère/plasmide (w/w) et résidu adamantane/βCD (n/n). Les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=5.	186
Figure 4-20 : formulation des polyplexes lPEI-N-ad/plasmide en présence de βCD. 1) formation des polyplexes lPEI-N-ad/plasmide, puis 2) formation du complexe d'inclusion des résidu adamantyle/βCD, en tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.....	187
Figure 4-21 : Exemple de structure de la lPEI-N-histidine 18,6%.....	195

<i>Figure 4-22 : La transfection des cellules HeLa a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (ou pCMV-Luc) complexée avec lPEI-N-his en fonction de la fraction en L-histidine-N-acryloyle (de 0% à de 67%). Les rapports polymère/plasmide (w/w) sont de 3/1 (violet) et 6/1(bordeau).</i>	196
<i>Figure 4-23 : La transfection des cellules HeLa a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec lPEI-N-his en fonction de la fraction en L-histidine-N-acryloyle (de 0% à de 67%). Le rapport polymère/plasmide (w/w) est de 6/1, (la mesure des diamètres de particule est déterminée par DDL)</i>	197
<i>Figure 4-24 : La transfection des cellules HeLa (en bleu) et C2C12 (en marron) a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec lPEI-N-his 16% et les lPEI-N-arg 14 et 21%. Les rapports polymère/plasmide (w/w) indiqués entre parenthèse sont de 3/1 et 6/1.</i>	198
<i>Figure 4-25 : Structure de la lPEI-N-arg 21%.</i>	198
<i>Figure 4-26 : La transfection des cellules C2C12 a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec lPEI-N-his 16%, les lPEI-N-arg 14 et 21% et la lPEI-N-his21%-N-13,5%. Le rapport polymère/plasmide (w/w) sont de 3/1 et 6/1 (lPEI-N-his et lPEI-N-arg) et de 2/1 et 4/1 pour la lPEI-N-his 21%-N-arg 13,5%.</i>	199
<i>Figure 1 : Spectre ESI-MS de la L-histidine méthyl ester-N-acryloyle dans le méthanol ([EB71a]= 1.10⁻⁴ mol.L⁻¹)...</i>	215
<i>Figure 2 : Spectre RMN ¹³C de la lPEI-N-his Me (EB019a) dans D₂O pH=7 à 25°C, ([EB019a] 200 mg/ml).....</i>	216
<i>Figure 3 : Spectre RMN ¹H COSY de la lPEI-N-arg (EB143a) dans D₂O pH=7 à 25°C ([EB143a] 20 mg/ml).....</i>	217
<i>Figure 4 : Spectre RMN ¹³C de la lPEI-O-ad (EB007d) dans CDCl₃ à 25°C, ([EB007d] 200 mg/ml).....</i>	217

Liste des annexes

Annexes..... 214

Liste des Abréviations

3T3 :	Fibroblastes de souris
ζ :	Potentiel zêta
A	
a :	Facteur de forme
ad :	adamantane
ad-N-acryl :	1-adamantane méthylamine-N-acryloyle
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ASGPR :	Récepteur à galactose
B	
BET :	Bromure d'éthylum
BHK-21 :	Cellules de reins de hamster doré
bPEI :	Poly(éthylènimine) branchée
BNL CL2 :	Cellules embryonnaires de foie de souris
C	
C17.2 :	Cellules progénitrices neurales de souris
C2C12 :	Cellules musculaires squelettiques de souris (myoblastes)
CD :	Cyclodextrines
Cellule 293T :	Cellules embryonnaires de rein humain
CES ou SEC :	Chromatographie d'exclusion stérique
CHO-K1 :	Cellules ovariennes d'hamster chinois
Cmc :	Concentration micellaire critique
Cyt c :	Protéine cytochromr c
D	
DLS :	dynamic light scattering
DMF :	Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dn/dc :	Variation d'Indice de réfraction en fonction de la concentration en soluté
DPn :	Degrés de polymérisation
DRI :	Détecteur réfractométrique différentiel
E	
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique
EI :	Ethylènimine

éq :	Equivalent
ESI-MS :	spectrométrie de masse (électrospray)
ET ₃ N :	Triéthylamine

G

GAGs :	Glycoaminoglycans
--------	-------------------

H

HEK293 :	Cellules embryonnaires de rein humain
HeLa :	Cellules cancéreuses d'utérus humain
HepG2 :	Cellules de carcinome hépatocellulaire humaines
HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineéthanesulfonique
his-N-acryl :	Histidine-N-acryloyle

I

Ip :	Indice de polymolécularité
------	----------------------------

K

K :	Coefficients de MHS (Mark-Houwink-Sakura)
k :	Constance de vitesse

L

LiNO ₃ :	Nitrate de lithium
IPEI :	Poly(éthylènimine) linéaire
IPEI-N-ad :	Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine)
IPEI-N-arg :	Poly (éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide)
IPEI-N-his :	Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propionate de sodium)
IPEI-N-his Me :	Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoate méthyle ester)
IPEI-N-his Me-N-ad :	Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoate méthyle ester)-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine)
IPEI-N-his-N-ad :	Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoïque acide)-co- éthylènimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine)

IPEI-N-his-N-arg :	Poly(éthylènimine- <i>co</i> -éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl)propanoïque acide- <i>co</i> -Éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide)
IPEI-O-ad:	Poly(éthylènimine- <i>co</i> -éthylènimine-N-éthyle ester-O-1-adamantane éthanol)
M	
MDA-MB-231 :	Cellules d'adénocarcinome du sein humaines
\overline{M}_n :	Masse molaire moyenne en nombre
\overline{M}_w :	Masse molaire moyenne en poids
N	
N/P :	ratio Azote/Phosphate
Neuro2A:	Cellules du neuroblastome de souris
NLS :	Nucléar Localisation Signal
NT2 :	Cellules de carcinome embryonnaire du testicule humain
P	
PBS :	Tampon phosphate salin
pCMV-Luc :	Plasmide CMV codant pour la luciférase ou pTG11033
PCS :	Photon Correlation Spectroscopy
PEI :	Poly(éthylènimine)
PEtOX :	Poly(2-éthyle-2-oxazoline)
pHi :	potentiel hydrogène isoélectrique
PI :	Point isoélectrique
PIPE :	Tampon pipérazine-N, N'-bis (2-éthanesulfonique)
R	
Rh :	Rayon hydrodynamique
RLU :	signal de transfection
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
S	
SKOV-3:	Cellules d'adénocarcinome ovarien humain
Spermine-N-his :	Spermine-N-histidine
siARN :	Small interferring ARN
T	
TEB :	Tampon tris borate EDTA
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Acide triméthyle silyle 3 propionique (d ₄) 2,2,3,3,sodium

U

μl : microlitre

μg : microgramme

W

w/w : weight/weight

Introduction

Le transfert de gène, ou plus généralement la thérapie génique, est une approche thérapeutique proposant d'utiliser des acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides) comme médicament.

Le concept de la thérapie génique est apparu en 1960. Mais si tous les éléments théoriques sont présents, le niveau technologique ne permet pas encore de réaliser pratiquement cette approche. L'amélioration des biotechnologies et des connaissances concernant les liens entre certains gènes mutés et certaines pathologies permettent à cette idée théorique de voir le jour sous la forme d'un premier essai clinique initié par S. Rosenberg aux États-Unis à la fin des années 1980. Depuis, la thérapie génique est devenue le thème de recherche de nombreux groupes de recherche dans le monde, dans le vaste domaine des sciences, la médecine, la pharmacie, la biochimie. On estime entre 8000 et 10000 le nombre de maladies génétiques et les recherches ont permis le développement de vecteurs permettant le transfert de gène dans les cellules eucaryotes, offrant la possibilité d'utiliser l'ADN (matériel génétique) comme médicament pour le traitement de maladies génétiques. L'enjeu de ces recherches est de véhiculer le gène jusqu'au noyau pour qu'il puisse produire des protéines fonctionnelles qui sont défectueuses ou absentes chez un patient. Les premières recherches ont montré que lors de l'injection systémique d'ADN nu, une faible quantité de gène arrive jusqu'au noyau des cellules à traiter. Il est dégradé pendant son trajet vers la cellule. Les recherches sur les vecteurs connaissent un essor considérable. Le premier objectif des vecteurs est de protéger l'ADN jusqu'au noyau des cellules contre les barrières biologiques (sang, membranes cellulaires, enzymes de dégradation...) pouvant stopper et détruire le gène.

Il existe différents systèmes de vecteurs, les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques. Bien que les propriétés conférées aux vecteurs viraux en fassent les plus utilisés, ils posent des problèmes de sécurité pour le patient et peuvent provoquer des réactions immunitaires. C'est la raison pour laquelle on voit l'émergence des vecteurs synthétiques (et donc non viraux) présentant de nombreux avantages. Le défi est de concevoir des vecteurs non viraux possédant une faible cytotoxicité et une forte efficacité de transfection, reproductible. Une grande variété de composés cationiques, comme les lipides, les polymères et les peptides, ont montré qu'ils délivraient efficacement l'ADN dans de nombreuses lignées cellulaires. Parmi les polymères, les plus efficaces sont les poly(éthylèneimine)s (PEIs), linéaire et branchée. Depuis quelques années, au sein de l'équipe MPI du LAMBE, des travaux sont réalisés autour de la IPEI.

Dans l'optique de développer de nouveaux vecteurs non viraux, l'objectif de ce travail est de synthétiser des vecteurs synthétiques en modifiant la poly(éthylèneimine) linéaire par différents composés comme des acides aminés (L-histidine et L-arginine), pour protéger l'ADN et obtenir une meilleure efficacité de transfection que les PEIs et ses dérivés. Ce manuscrit est divisé en 4 chapitres.

Une étude bibliographique autour de deux volets débute ce manuscrit. Le premier aborde la thérapie génique et les barrières biologiques que doit traverser un vecteur. Le second discute des vecteurs protégeant l'ADN, en se focalisant plus précisément sur les vecteurs cationiques. Dans ce second volet sera, les propriétés

physico-chimiques et de transfection *in vitro* et *in vivo* des PEIs (branchée et linéaires) et de ces dérivés sont détaillées.

Après un chapitre dédié aux protocoles utilisés pour développer et tester les nouveaux polymères, le troisième chapitre permet de discuter les réactions de modification de la poly(éthylèneimine) linéaire par de petites molécules comme la L-histidine, l'adamantane et la L-arginine. La modification de la lPEI par les différentes molécules est détaillée en terme cinétique et de stabilité de la réaction et a permis de créer de nombreux polymères ayant différents taux de modification.

Enfin, l'objectif du dernier chapitre est de mettre en avant les propriétés physico-chimiques de ses nouveaux vecteurs (solubilité, mobilité électrophorétique, pKa, taux de protonation), ainsi que celles des polyplexes formés en présence d'ADN. Les relations structure/propriété des vecteurs sur la capacité de complexation de l'ADN et l'efficacité de transfection sont aussi discutées.

Chapitre 1 :

Bibliographie : généralités sur la thérapie génique

I – Introduction

Les êtres vivants sont composés de cellules procaryotes, comme les bactéries ou de cellules eucaryotes, famille à laquelle appartiennent les cellules des mammifères et en particulier humaines. La singularité de ces cellules eucaryotes est la présence d'un noyau contenant l'acide désoxyribonucléique (ADN), support du matériel génétique. L'ADN fut décrit en 1953 par James Watson et Francis Crick¹ (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1962). L'information génétique réside dans l'enchaînement de bases (Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G), ou Thymine (T)) (figure 1-1) formant deux macromolécules complémentaires auto assemblées en hélice par la complémentarité des bases deux à deux. Un fragment de cette double hélice, composé de plusieurs nucléotides, est l'unité de base de cette information : le gène. L'ensemble des gènes, constituant le patrimoine génétique (génome), code pour un ensemble de protéines (protéome) qui assure la majorité des fonctions et spécificités cellulaires et tissulaires.

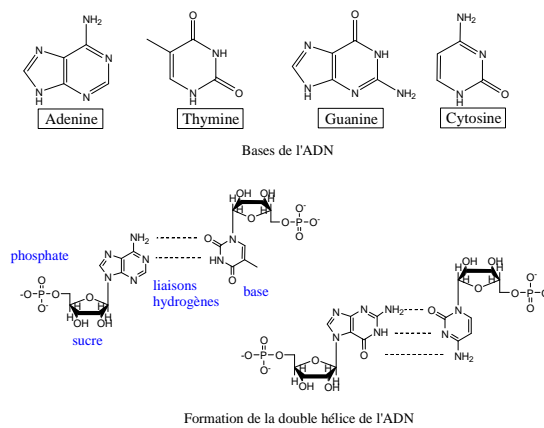


Figure 1-1 : représentation des bases de l'ADN formant la double hélice

Toutes les cellules proviennent de la même cellule initiale : la cellule œuf ou zygote. Pendant la réplication de l'ADN, des erreurs peuvent survenir et persister, malgré les mécanismes de contrôle cellulaire. L'enchaînement des nucléotides est modifié, soit par la substitution d'une base par une autre, soit par la délétion ou l'insertion d'un nucléotide. Ces mutations, souvent muettes, peuvent être induites par des agents extérieurs (UV, produits chimiques, radiations) et n'ont aucune incidence sur l'intégrité des protéines produites. Cependant, il arrive que la mutation touche une partie codante du gène entraînant la perte d'activité ou l'absence d'une protéine, conséquences graves la plupart du temps.

De toutes les maladies génétiques héréditaires recensées, la plus fréquente est la mucoviscidose (ou fibrose kystique)^{2, 3}. En France, elle touche environ 1/2500 naissances². Les recherches sur cette maladie ont permis aux patients de mieux vivre avec la mucoviscidose. Leur espérance de vie atteint 46 ans, grâce aux séances de

kinésithérapie, de médicaments (antibiotique, nouveau traitement : miglustat⁴⁻⁶) et d'opérations chirurgicales. Les avancées en biotechnologie de ces dernières années ont permis l'émergence d'un nouveau domaine, la thérapie génique. Son but est de remplacer le fragment de gène défectueux grâce à l'insertion de gène sain, dans le patrimoine génétique du patient, dans un objectif thérapeutique⁷. Cette technique peut être utilisée pour soigner les maladies génétiques comme la mucoviscidose, la myopathie de Duchesne mais aussi les maladies cardio-vasculaires, des maladies neuronales ou certains cancers^{8,9} (figure 1-2)...

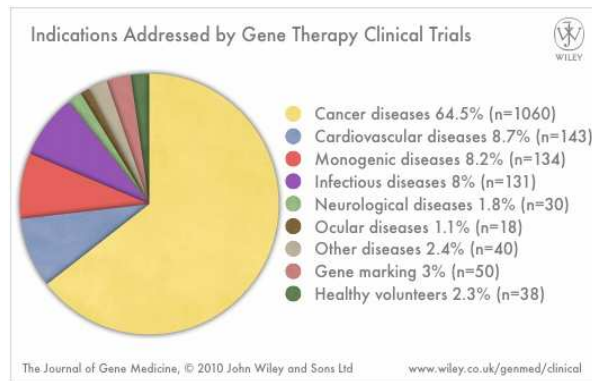


Figure 1-2 : représentation par secteur décrivant les maladies susceptibles d'utiliser la thérapie génique¹⁰

Le traitement par thérapie génique consiste en l'introduction, par voie intraveineuse, aérosol... du matériel thérapeutique constitué de trois éléments au minimum :

- Le gène d'intérêt, souvent incorporé dans un plasmide codant pour une protéine d'intérêt,
- Un système qui contrôle l'expression et le fonctionnement de gène au sein de la cellule,
- Un vecteur de transfection permettant d'apporter le matériel génétique dans la cellule.

Nous allons décrire, dans une première partie, les modes de transfection reportés dans la littérature, et nous mettrons en évidence le trajet et les barrières rencontrées par un fragment d'ADN migrant vers le noyau au cours de la transfection. Dans un deuxième temps, nous décrirons les vecteurs chimiques utilisés pour améliorer la transfection, et nous détaillerons particulièrement les vecteurs à base de poly(éthylèneimine), le vecteur polymérique standard à l'heure actuelle.

II – Le transfert de gène

II-1 – Les modes d'administration en thérapie génique

L'utilisation du gène comme médicament implique la connaissance des nombreux processus qui régissent la pharmacologie d'un principe actif (formulation, mode et site d'administration, site d'action).

Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique *in vivo*, le gène peut être administré vers sa cible de plusieurs manières (figure 1-3A):

- par la voie systémique, à l'aide d'une injection intraveineuse ou intra-artérielle.
- par application locale, à l'aide d'une injection locale sur le tissu ciblé.
- par « gene gun »¹¹ (application locale), qui consiste à propulser de minuscules particules d'or recouvertes d'ADN plasmidique (0.5 à 5µg par mg d'or) dans les cellules cibles. Elles sont, par exemple, accélérées par un gaz. L'ADN ne subit pas les dégradations du milieu biologique, car il pénètre directement dans le cytosol ou dans le noyau. L'efficacité de cette technique varie en fonction des tissus visés (> 20% de cellules transfectées pour les cellules épidermiques et >5% de cellules transfectées pour les cellules musculaires^{12, 13}).
- par électroporation (application locale). Cette méthode déstabilise la membrane des cellules, pendant une courte période, par des impulsions électriques pour permettre la pénétration du gène dans celle-ci. Elle est utilisée depuis 1982¹⁴ et s'applique à de nombreux tissus comme le tissu musculaire¹⁵. Son efficacité dépend de nombreux paramètres, comme le type de tissus, ou la puissance de l'impulsion électrique^{16, 17}.
- par ultrasons (US) : En présence des vecteurs synthétiques, l'irradiation par des US des cellules, *in vitro* et *in vivo*, augmente l'expression du transgène^{18, 19}.
- par aérosols : Le gène est administré par la voie nasale. Il atteint directement les cellules épithéliales pulmonaires (figure 1-3B).

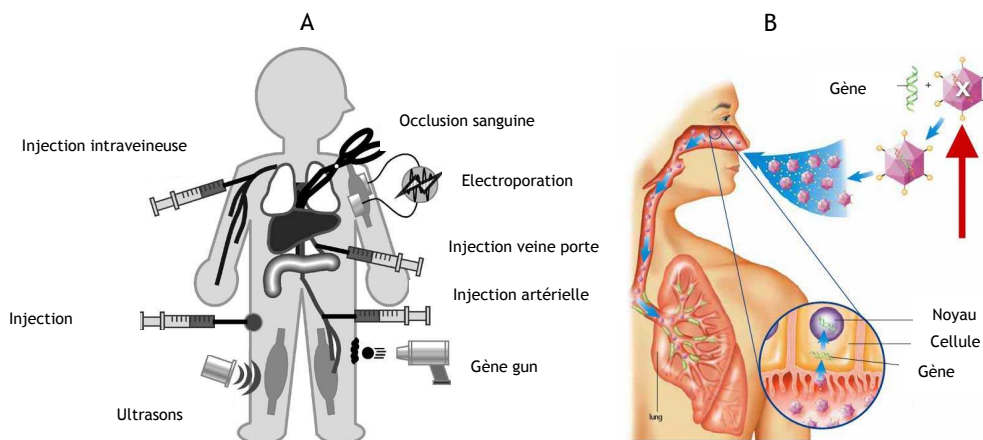


Figure 1-3 : voies d'administration et méthodes physiques du transfert de gènes²⁰ (A) et voies d'administration par aérosol²¹ (B)

Actuellement, les voies les plus utilisées sont l'application locale et la voie systémique. Celles-ci allient un confort d'utilisation pour le patient à une efficacité. Après l'injection, le gène doit traverser plusieurs obstacles ou barrières biologiques pour arriver au noyau de la cellule cible.

II-2 - Le trajet de l'ADN médicament jusqu'au noyau de la cellule

Par injection intraveineuse, l'ADN médicament est drainé dans les vaisseaux sanguins. Le sang constitue la première barrière biologique car il contient des cellules immunitaires, protéines et enzymes de dégradation pouvant détruire l'exogène²²⁻²⁴. Ensuite, il doit traverser les parois des vaisseaux puis migrer dans la matrice extra cellulaire pour atteindre les tissus cellulaires cibles (I). Le plasmide doit alors traverser la membrane plasmique des cellules (II) selon différents mécanismes, et plus particulièrement par endocytose ou vacuoles, puis se libérer de l'endosome (III). Enfin, il doit migrer vers le noyau dans le cytoplasme (IV) et traverser la membrane nucléaire (V) pour y être transcrit en ARNm. Les ARNm sortant du noyau sont traduits en la protéine souhaitée (figure 1-4)²².

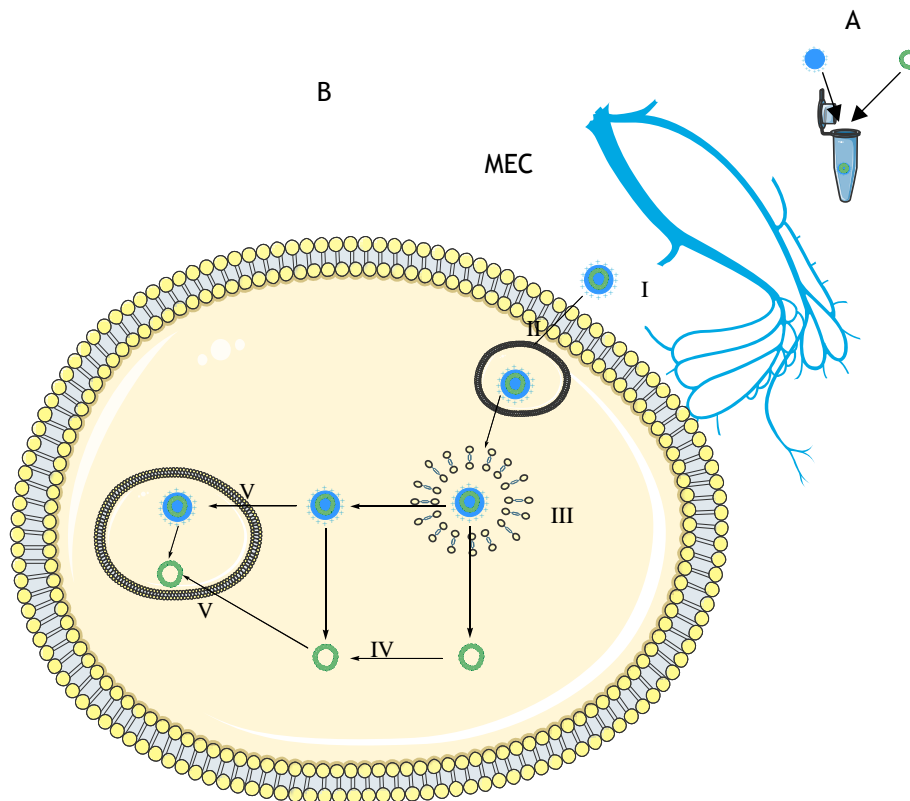


Figure 1-4 : Différentes étapes du transfert de gène : I passage de la matrice extracellulaire (MEC) ; II passage de la membrane plasmidique; III libération du vecteur dans le cytoplasme ; IV migration du gène médicament vers le noyau ; V internalisation du gène médicament dans le noyau.

Parmi les différentes barrières répertoriées, nous proposons d'analyser particulièrement la question de la translocation de l'exogène vers l'intérieur d'une cellule, puisque c'est la première barrière rencontrée lorsque les biologistes procèdent à une évaluation de transfection *in vitro*.

II-2. 1 L'interaction membranaire, fusion et endocytose

Constituée de phospholipides amphiphiles²⁵, la membrane cellulaire est imperméable aux molécules hydrophiles et polaires. Contrairement à l'ADN nu, l'ADN vectorisé (protégé par un vecteur viral ou synthétique) peut se fixer à sa surface, provoquant son internalisation. Il existe deux types d'interaction. La première est passive, et dépend des charges de surface de la membrane et de l'ADN vectorisé²⁶⁻²⁸. Le second, spécifique, résulte d'un ciblage de récepteurs membranaires²⁴ générant un mécanisme de transport activé qui permet l'internalisation^{29, 30}. Différents modes d'internalisation de gène médicament ont été répertoriés :

- la fusion qui introduit directement dans le cytoplasme le gène ou le complexe.

- la macropinocytose^{31, 32} (figure 1-5B) : Ce mécanisme d'endocytose est non sélectif aux macromolécules. Les cellules animales peuvent déformer la membrane cellulaire pour former un pseudopode, provoquée par des pressions internes du cytoplasme à cause du cytosquelette d'actine. Ce pseudopode encercle le complexe et forme autour de celui-ci une vésicule appelée macropinosomes qui est internalisée dans la cellule. Cette vésicule permet d'internaliser de gros objet car son diamètre peut atteindre 5µm.

- la phagocytose³³ (figure 1-5A) : Grâce à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire, celle-ci se déforme et s'allonge pour former deux bras lipidiques, les pseudopodes qui entourent l'ADN médicament (nu ou vectorisé), permettant l'internalisation d'un complexe dans la cellule.

- l'endocytose est un mécanisme d'internalisation de grosses molécules via la formation d'une vésicule nommée endosome^{22, 34}. Les interactions qui conduisent à ce mécanisme peuvent être soit :

- spécifiques (figure 1-5F) : La membrane possède des récepteurs spécifiques à certaines molécules comme le glucose, le galactose ou le folate. Le contact de ces ligands sur le récepteur entraîne la formation d'un endosome et son entrée dans la cellule.

- non spécifiques (figure 1-5E, vésicules non tapissées). L'endocytose non spécifique internalise des nanoparticules sans discrimination. Ce mécanisme compte pour 50% de l'activité endocytique d'une cellule²⁵.

- Endocytose à clathrines dépendantes (figure 1-5C). L'endocytose spécifique met en jeu des vésicules couvertes de clathrine³⁵, se trouvant sur la face intérieure de la membrane plasmique³⁶. Elles sont exprimées en petite quantité dans tous les types de cellules.

Il existe aussi l'endocytose par cavéoles dépendantes³⁷⁻³⁹ (figure 1-5D). La membrane cellulaire possède des microdomaines, contenant du cholestérol et des sphingolipides, présents sur 10 à 20% de la surface membranaire. Le mécanisme de l'endocytose par cavéoles dépend du cytosquelette d'actine se trouvant à l'intérieur de la cellule. Le complexe, positif, interagit avec le cholestérol et les sphingolipides. Cela active les cavéoles et le cytosquelette qui internalise le polyplexe dans la cellule.

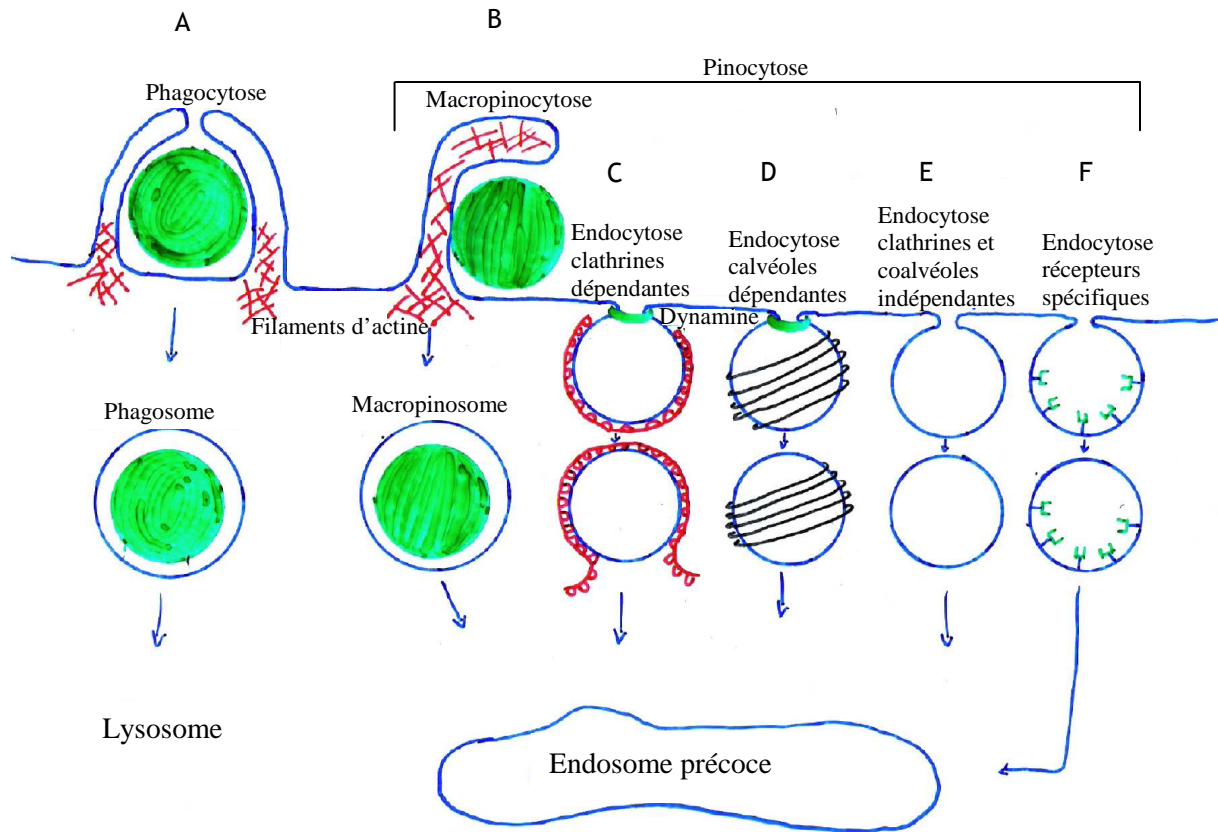


Figure 1-5 : Différents mécanismes d'endocytose de la cellule : A) phagocytose, B) macropinocytose, C) endocytose clathrines dépendantes, D) endocytose cavéoles dépendantes, E) endocytose non spécifique (vésicule non tapissée), F) endocytose à récepteurs spécifiques

II-2. 2 Endocytose : libération dans le cytosol

Après la formation de l'endosome autour du plasmide, celui-ci entre dans la cellule mais son contenu est rapidement détruit par une acidification du milieu endosomique. Un endosome inclus dans une cellule subit un abaissement de pH avec le temps selon deux phénomènes :

- fusion avec un lysosome qui possède un pH acide (pH=5).
- diminution de son pH par l'entrée de protons, entraînant une évolution vers un lysosome. L'acidité du milieu active des enzymes de dégradation qui détruisent rapidement l'ADN exogène.

Une formulation de l'ADN médicament par des vecteurs chimiques, notamment les polymères, entraîne une déstabilisation de la membrane de l'endosome selon un mécanisme d'éponge à protons qui libère ainsi, dans le cytoplasme, l'outil thérapeutique complexé aux polymères. Ce mécanisme est expliqué par une entrée massive de protons et d'ions chlorure dans l'endosome lors de son acidification, accrue par l'effet tampon apporté par le polymère. L'équilibre osmotique du système est maintenu par une entrée concomitante d'eau entraînant le gonflement de l'endosome jusqu'à sa destruction, libérant son contenu dans le cytoplasme. Le

phénomène de fusion entre l'endosome et un lysosome est inhibé pendant six heures en présence de vecteurs synthétiques possédant un pouvoir tampon à des pH légèrement acides⁴⁰.

II-2. 3 Migration et pénétration dans le noyau

Les complexes présents dans le cytosol doivent migrer jusqu'au noyau selon des mécanismes passifs de diffusion libre (qui n'est pas susceptible d'être le mode principal du transport cytotolique)^{41, 42}, ou actifs impliquant le cytosquelette de la cellule (microtubule et filaments d'actine)⁴³. Ainsi les filaments d'actine peuvent intercepter le gène thérapeutique et le véhiculer jusqu'au noyau (figure 1-6)^{22, 34, 44}.

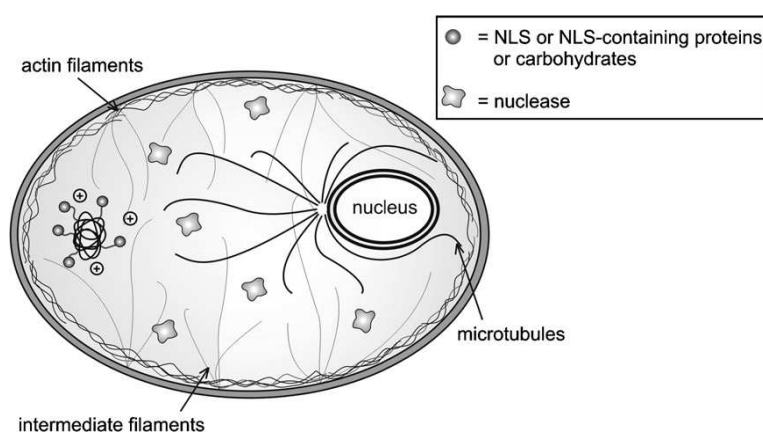


Figure 1-6 : transport du polyplex dans le cytosol par les filaments du cytosquelette²²

La membrane nucléaire limite l'internalisation du plasmide dans le noyau. Il a été démontré que le transfert de gène est plus efficace lorsque la cellule se trouve en division plutôt qu'à l'état quiescent³³. Des expériences de transfection, réalisées à différentes étapes de la division cellulaire, confirment que la rupture de l'enveloppe nucléaire est un atout pour une expression efficace du transgène⁴⁵.

La transfection *in vitro*⁴⁶ et *in vivo*⁴⁷ de cellules quiescentes par des complexes formulés avec des vecteurs synthétiques (polyéthylèneimine) laisse penser que d'autres mécanismes interviennent dans le processus de migration intranucléaire.

La dernière barrière à franchir pour le gène thérapeutique est la membrane nucléaire qui possède à sa surface plusieurs milliers de pores (entre 3000 et 4000 pores) d'un diamètre de 11 nm^{25, 47}. Il a été montré que ces pores permettent une translocation de molécules possédant un signal de reconnaissance constitué d'une séquence peptidique NLS (nuclear localization signal)⁴⁸. Ainsi, des macromolécules telles que les histones peuvent être transloquées à travers ces pores^{29, 34, 49-52}.

Pour tenter d'améliorer l'efficacité du transfert de gène, des séquences NLS ont été associées au plasmide ou aux vecteurs. Les divers résultats montrent que la présence du peptide NLS associé au plasmide améliore son internalisation dans le noyau et donc l'efficacité du transfert de gène.

II-2. 4 Synthèse de protéines : détection de la transfection cellulaire

Enfin, à l'intérieur du noyau, l'ADN transfecté peut être transcrit en ARN messager, vecteur de l'information pour la production d'une protéine d'intérêt. Les plasmides (ADN circulaire provenant d'une bactérie) utilisés dans les études préliminaires de transfection contiennent un gène rapporteur codant pour une protéine susceptible d'émettre un signal quantifiable. Les plus utilisés sont les gènes codant pour la GFP ou la luciférase⁵³.

Les études *in vivo* montrent une expression du gène dans la cellule hôte allant de 14 semaines (en utilisant un vecteur synthétique)⁵⁴ à 18 semaines (vecteurs viraux)^{55, 56}. Cependant, la capacité des virus à intégrer leur patrimoine dans la cellule hôte permet une expression prolongée du gène jusqu'à 18 mois⁵⁶. Cette capacité d'expression du plasmide ne s'effectue pas en présence de vecteurs synthétiques.

III – Les outils du transfert de gène

Depuis 1990⁵⁷, diverses expériences d'injection directe *in situ*⁵⁸ d'ADN nu (sans protection) ont démontré une expression du gène dans certains tissus⁵⁸ (muscle cardiaque, muscle squelettique^{59, 60}, cerveau). Cependant, l'injection intramusculaire d'ADN nu reste faiblement efficace, car moins de 1% de la dose injectée est internalisée par les cellules. Cette expression reste très localisée au niveau du site d'injection et met en évidence la nécessité d'utiliser un vecteur pour amener un gène thérapeutique du site d'injection au noyau de la cellule d'un organe cible. Ce vecteur aura pour fonction la compaction du plasmide, sa protection vis-à-vis des agressions du milieu biologique, et enfin de le véhiculer vers son site d'action. Deux familles de vecteurs se sont développées :

- Les vecteurs viraux,
- Les vecteurs non viraux, provenant de macromolécules naturelles ou synthétiques.

Nous allons décrire maintenant les intérêts respectifs de ces deux familles de vecteurs.

III-1 - Les vecteurs viraux

Les virus, fruit d'une évolution de plusieurs millions d'années, réalisent une transfection par ciblage d'une cellule hôte, y pénètrent et y expriment leur matériel génétique. Plusieurs familles (virus de l'herpes⁶¹, adénovirus⁶²⁻⁶⁴, rétrovirus⁶⁵⁻⁶⁷, virus adéno-associés^{33, 68}...) ont été utilisées dans un objectif de transfert de gène. Grâce à des mécanismes sophistiqués⁶⁹ et à une structure complexe, évoluant pendant leur trajet⁷⁰ (figure 1-7), ils ciblent les cellules et les transfectent efficacement :

- Les virus pénètrent généralement dans les cellules par la voie spécifique endosomiale, grâce aux interactions ligands-récepteurs entre le virus et la cellule. Certains virus réussissent à entrer dans la cellule hôte par fusion.

- Dans le cytoplasme, ils protègent l'ADN jusqu'au noyau.
- Dans le noyau, le gène est intégré dans le génome du patient.

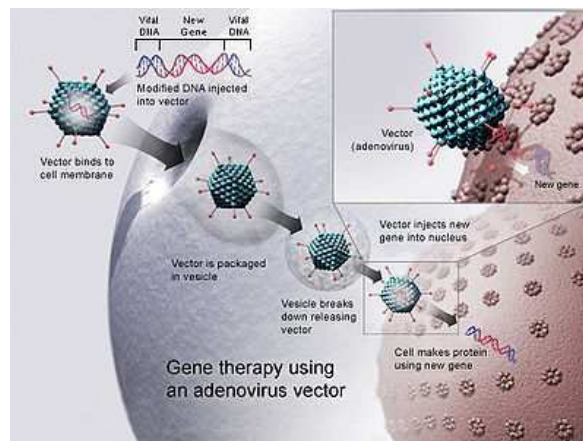


Figure 1-7 : schéma de l'introduction d'un gène dans une cellule, par un adénovirus⁷¹

Les virus posent des problèmes de sécurité évidents et peuvent susciter des réactions immunitaires.

L'insertion du gène dans le génome apporte des modifications à la cellule comme l'apparition d'antigènes viraux à sa surface qui conduit à la destruction des cellules transfectées par le système immunitaire et au développement de maladies auto-immunes⁸. Cela peut aussi engendrer l'activation de proto-oncogènes (gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire, dont la mutation est à l'origine des tumeurs) ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs⁷²⁻⁷⁴.

Ils sont aussi mal adaptés à la transfection de gènes possédant un nombre élevé de paires de bases. Une limite maximale de 8000 paires de bases (8kpb) est généralement admise, empêchant leur utilisation

pour transfecter des gènes de grande taille comme le gène codant pour CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) de la mucoviscidose (250kpb)⁷⁵.

Afin de circonvenir à ces différentes limites, des vecteurs totalement synthétiques ont fait leur apparition.

III-2 - Les vecteurs non viraux, synthétiques

Depuis quelques années, de nouveaux vecteurs voient le jour pour substituer les vecteurs viraux. Ces nouveaux vecteurs, synthétiques, présentent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Ils sont caractérisés par une faible immunogénicité qui laisse envisager la possibilité d'administrations répétées, une faible toxicité, ainsi qu'une production aisée et économique.

Pour permettre un système optimal de transport, un vecteur synthétique nécessite certaines caractéristiques :

- former un complexe avec l'ADN à vectoriser en le compactant,
- protéger l'ADN des diverses sources de dégradation comme les nucléases,
- obtenir des particules vecteur synthétique / ADN homogènes et de petite taille (<100nm),
- faciliter la fixation de l'ADN sur la cellule car celui-ci étant chargé négativement, il ne peut adhérer spontanément à la membrane plasmique polyanionique des cellules,
- favoriser le passage de l'ADN hydrophile à travers le milieu hydrophobe constitué par la membrane plasmique et/ou endosomique,
- permettre le trafic intracellulaire et la pénétration de l'ADN dans le noyau, quand celui-ci reste lié au vecteur.

En considérant le vecteur comme transporteur du principe actif, on distingue trois grandes classes de vecteurs synthétiques, ayant leurs caractéristiques propres : les lipides, les polymères amphiphile neutres et les peptides.

III-2. 1 Les lipides cationiques

L'équipe de Felgner⁷⁶ fut la première à utiliser des lipides cationiques en thérapie génique :

- Ces lipides condensent l'ADN en interagissant avec les charges négatives des polynucléotides⁷⁷. Cela entraîne la formation de complexes vecteurs/ADN appelés lipoplexes, de tailles comprises entre 200 et 500 nm.

- Ils facilitent l'accrochage des complexes sur la membrane cellulaire grâce aux interactions électrostatiques entre les charges positives des lipides et les charges négatives des glycoprotéoglycanes de la membrane cellulaire⁷⁷.

- Ils déstabilisent la membrane plasmique et permettent aux complexes de fusionner ou de rentrer dans la cellule par la voie de l'endocytose (cf. paragraphe III). Ils délivrent l'ADN dans le cytoplasme cellulaire et limitent sa dégradation par les compartiments lysosomaux⁴⁷.

Les lipides cationiques utilisés sont composés de trois parties (figure 1-8) :

- d'une tête polaire hydrophile de charge positive (mono ou polychargée),
- d'une chaîne d'acides gras saturés ou insaturés hydrophobes,
- et d'un espaceur reliant la région polaire et apolaire du lipide⁷⁸.

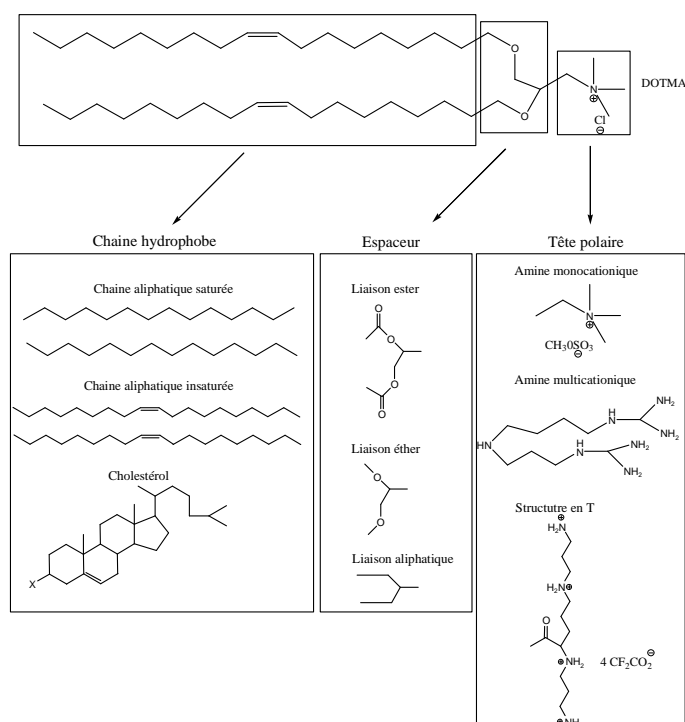


Figure 1-8 : Structure représentative du lipide cationique Dotma : chlorure de N-[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N, N, N-triméthylammonium. Représentation des structures possibles de chaque composant d'un lipide cationique type⁷⁸

Les têtes polaires multicationiques sont les plus efficaces pour condenser et protéger l'ADN⁷⁹. La nature de l'espaceur⁸⁰, la longueur grandissante des chaînes hydrophobes et leurs nombres d'insaturations agissent sur la stabilité du lipoplexe, l'efficacité de transfection^{81, 82}, mais aussi la toxicité⁷⁷.

Les premières expériences de transfection par les lipides cationiques ont été réalisées en 1987 avec le lipide cationique synthétique DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium)^{76, 77} (figure 1-8). Ce lipide possède une partie hydrophobe composée de chaînes d'acide gras insaturées. D'autres molécules amphiphiles sont synthétisées comportant une partie hydrophobe monovalente d'acide gras insaturée ou saturée comme (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane (DOTAP)^{83, 84} et le bromure de

1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium (DMRIE)⁷⁷. D'autre part, des lipides multivalents, de types lipopolyamine ont été synthétisés et leurs capacités de transfection démontrées (le chlorure de 2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium (DOSPA)⁸⁵⁻⁸⁷, le dioctadécylaminoglycylspermine (DOGS)⁸⁸).

Ces lipides sont associés à des lipides neutres, pour leurs propriétés fusiogènes, telle que la dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE)^{84, 89} ou ses dérivés^{90, 91}. La présence de cholestérol associé au 3β[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]⁹² ou au groupement guanidinium^{93, 94} forment également des vecteurs efficaces lorsqu'ils sont associés à la DOPE⁹⁵ en accroissant la stabilité des liposomes.

De récentes études montrent que des lipides de types lipophosphoramidate^{96, 97}, comme le Dilinoléylphosphatidyl-2-aminoethyltriméthylarsonium iodide (BSV4)⁹⁸ améliore la transfection *in vitro* et *in vivo*.

La voie des lipides cationiques pour la transfection de gènes fait d'importantes avancées. En parallèle, une autre voie s'est ouverte, la voie des polymères synthétiques dont ce travail traite plus particulièrement.

III-2. 2 Les polymères amphiphiles neutres

Les lipides cationiques sont souvent inefficaces quand ils sont injectés localement dans les tissus par exemple au niveau des muscles squelettiques et des sites de tumeurs⁹⁹. Il existe des vecteurs polymères non ioniques solubles dans l'eau qui ne complexent pas l'ADN et qui ne condensent pas l'ADN. Ces polymères ont la propriété d'être des vecteurs de transfection efficace lors de l'administration locale d'ADN dans les tissus. Parmi eux sont les poly(N-vinyl pyrrolidone), les poly(vinyl alcool)¹⁰⁰ et les pluronics ou poloxamères (copolymères à blocs de poly(oxyde d'éthylène) et de poly(oxyde de propylène)¹⁰¹. Les pluronics augmentent le taux et la fréquence de transduction dans les cellules musculaires quand ils sont combinés avec les vecteurs adenovirus¹⁰² et lentivirus¹⁰³. Lorsqu'ils sont conjugués avec des polycations, le polyplexe ainsi formé, pratiquement électriquement neutre, est moins toxique *in vivo* et *in vitro*. La présence de pluronics prévient de l'aggrégation des particules et transportent efficacement les plasmides dans les cellules. Il en résulte une augmentation importante de l'expression de gènes¹⁰⁴.

III-2. 3 Les polymères cationiques

L'utilisation de polymères cationiques pour des expériences de transfert de gène est apparue aussi en 1987¹⁰⁵, et a permis de développer une alternative complémentaire à l'approche lipide précédemment

évoquée. De nombreux travaux ont visé à synthétiser de nouveaux composés plus efficaces et moins toxiques. Nous développerons dans ce paragraphe les propriétés générales de ces agents de transfert. Dans un second temps, nous répertorierons les différentes stratégies de synthèse en discutant de façon non exhaustive, pour raison de trop grande quantité de dérivés, les principales familles de vecteurs ayant donné des résultats intéressants en transfert de gène.

III-2. 3. 1 Généralités sur la complexation des polymères cationiques et l'ADN

La complexation entre le vecteur et le plasmide est généralement le résultat d'une interaction électrostatique entre deux polyélectrolytes : l'ADN anionique et le polymère cationique. Des nanoparticules peuvent ainsi être obtenues, et l'interaction souvent élevée entre l'ADN et le polymère cationique peut être déterminée par gel retard.

Depuis plusieurs années, les chercheurs essayent de comprendre le phénomène de complexation entre les vecteurs cationiques et l'ADN. Mengarelli *et al.*¹⁰⁶ ont construit le diagramme de phase (figure 1-9) caractérisant la complexation entre l'ADN et les poly(éthylèneimine) linéaire IPEI (dont les caractéristiques seront discutées dans le paragraphe III-2. 2. 4).

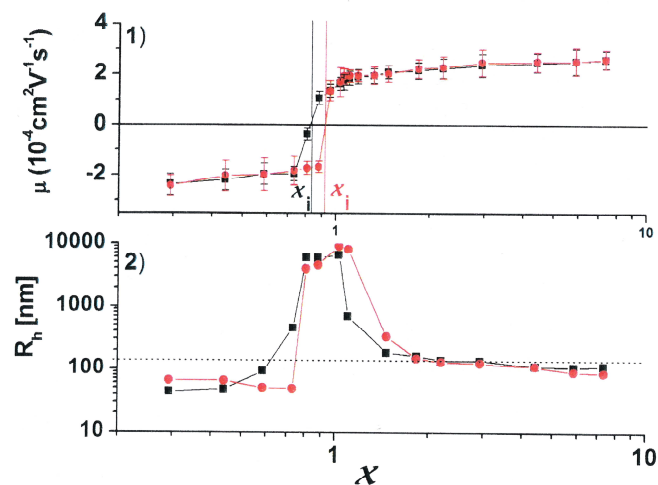


Figure 1-9 : Mobilité électronique (1) et rayon hydrodynamique R_h (2) des complexes ADN-IPEI 2,5kDa (■) et ADN-IPEI 25kDa (●) dans Tris 10 mM à pH=7,4, [I]=0,15M en fonction du rapport de charge X . [ADN]=[EI]=0,01%

Les auteurs montrent que les effets de complexation de l'ADN sont plus marqués avec la IPEI de masse molaire 25 kDa que 2,5 kDa. Le comportement de la mobilité électrophorétique et du rayon hydrodynamique, en fonction du rapport de charge est qualitativement le même pour les deux polymères.

Ils concluent que le processus d'agrégation (ou plutôt complexation) entre l'ADN et le polymère ne dépend pas que de la structure et de la rigidité des chaînes de l'ADN et du vecteur (ou forces entropiques); mais il est aussi contrôlé par des interactions électrostatiques entre polyanion et polycation (ou forces enthalpiques) qui confirment les théories déjà existantes sur l'agrégation de polymères de charges opposées^{107, 108}. Il faut aussi signaler que les polymères aminés comme la poly(éthylèneimine) possèdent un taux de protonation différents selon le pH. L'équipe de Jorge¹⁰⁹ a démontré que le pH d'une solution joue un rôle non négligeable sur la formulation des complexes. Pour une masse constante de poly(éthylèneimine) branchée (bPEI), le taux de protonation change en fonction du pH et influe sur la formation des polyplexes. Pour expliquer la formation des complexes bPEI/ADN, l'équipe de Jorge¹⁰⁹ a utilisé un rapport de charges (noté β) entre la concentration molaire en charges positives des amines de la bPEI (C^+), au pH étudié (pH=4, 6 et 8), et la concentration molaire en charges négatives des bases phosphate de l'ADN (C^-). Le rapport de charge $\beta = C^+/C^-$ augmente en fonction de l'acidité de la solution (au pH=8, $\beta = C^+/C^- = 0,8$; au pH=6, $\beta = C^+/C^- = 0,92$ et au pH=4, $\beta = C^+/C^- = 2,03$). Pour une masse constante de bPEI, la complexation du plasmide est donc meilleure à pH acide qu'à pH= 7,4, car elle possède un taux de protonation en amines supérieur à 20%¹¹⁰.

Dans le cas des lipides, une auto-organisation sous forme de phase lamellaire a été démontrée. Aucun phénomène de ce type n'a été présenté dans le cas des polymères. Une analyse de polyplexes par cryoTEM a révélé la formation de nanoparticules de structure plus ou moins sphérique, accompagné de toroïdes (figure 1-10) La présence de ce type de structure bien définie n'a pas trouvé d'explication particulière.

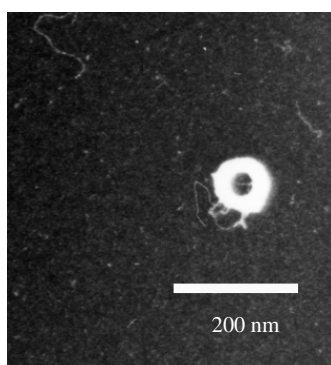


Figure 1-10 : condensation de l'ADN par de la poly(L-lysine), le complexe forme un toroïde¹¹¹.

Cette étude s'applique aussi aux autres polymères cationiques, dont nous allons maintenant discuter les propriétés de complexation et d'efficacité de transfection. Ensuite, la poly(éthylèneimine) et ses dérivés seront mis en avant pour expliquer le cheminement qui a permis la création de la nouvelle molécule étudiée dans cette thèse.

III-2. 3. 2 La poly(L-lysine) (PLL) et ses dérivés

La polylysine ou PLL (figure 1-11) est le premier polymère cationique qui fut utilisé en thérapie génique¹⁰⁵. C'est un polypeptide linéaire formé de monomères peptidiques de la L-lysine.

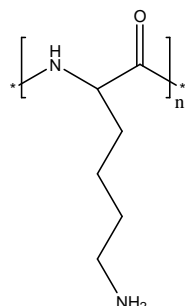


Figure 1-11 : structure de la poly (L-lysine)

La poly(L-lysine) peut être synthétisée à partir de la N-carboxy-(N^ε-benzyloxycarbonyl)-L-lysine anhydride (Z-L-lysineNCA)¹¹². La polymérisation (figure 1-12) est réalisée en trois étapes :

- formation d'un cycle intramolécule entre la fonction carboxylique et l'amine primaire de la L-lysine, la ε-amine (située sur le 5^{ème} carbone à partir de la fonction carboxyle) étant protégée par le groupement benzyloxycarbonyle, noté Z sur la figure 1-12.
- polymérisation par ouverture du cycle N-carboxy anhydride, amorcée par un nucléophile faible telle qu'une fonction amine, entraînant une décarboxylation et menant à la structure peptidique escomptée.
- Déprotection du benzyloxycarbonyle.

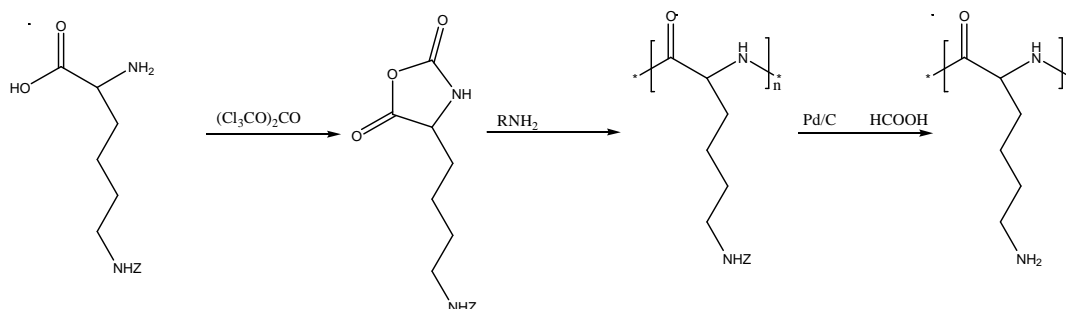


Figure 1-12 : Synthèse de la poly(L-lysine) par mécanisme de polymérisation par ouverture de cycles

Etant chargé positivement au pH physiologique, elle condense efficacement l'ADN et forme des polyplexes (complexes poly(L-lysine)/ADN). Les tailles de ces polyplexes sont de l'ordre de 100 nm, un diamètre raisonnable pour la transfection¹¹³.

La PLL de masse molaire élevée (>27 kDa) est efficace pour la condensation de l'ADN, la stabilisation du polyplexe en transfection *in vivo*¹¹⁴, mais possède une forte cytotoxicité¹¹⁵, provoquant l'apoptose²⁹. L'équipe de Symonds¹¹⁶ a démontré que la PLL déstabilise la membrane des mitochondries et active les enzymes de dégradation qui engendrent le cycle de l'apoptose.

Elle ne possède pas de pouvoir tampon à pH légèrement acide, ce qui défavorise la sortie rapide de l'ADN des endosomes. Cette sortie de l'ADN est améliorée si des agents endosomolytiques, comme la chloroquine¹¹⁷ ou les peptides fusioènes, sont associés aux complexes PLL/ADN¹¹⁸.

Pour limiter la toxicité de la PLL, des modifications sont apportées à ce polymère par le greffage du poly(éthylène glycol) (PEG)¹¹⁹, de dextran¹²⁰ ou de l'histidine¹²¹.

L'ajout de résidus contenant la fonction imidazole (l'acide imidazole acétique¹²² ou l'histidine) permet une plus grande efficacité de transfection⁵³.

La PLL modifiée par l'acide imidazole acétique (figure 1-13) est obtenue par la réaction d'amidation entre la fonction carboxylique de l'acide imidazole acétique et l'amine primaire de la PLL¹²².

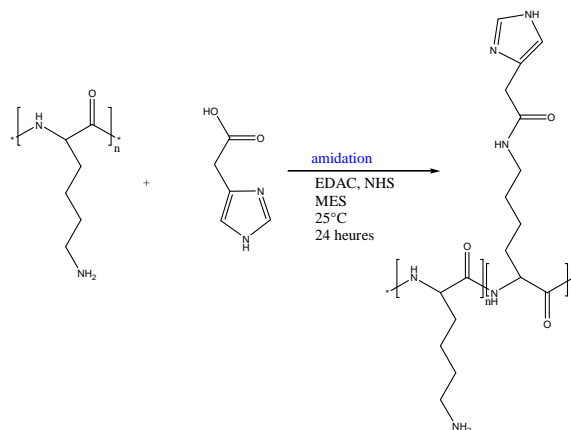


Figure 1-13 : synthèse de la PLL-graft-acide imidazole acétique par la réaction d'amidation

L'apport de l'imidazole sur la PLL diminue le taux d'amines protonables par macromolécule au pH physiologique (pH=7,4) car le pKa du groupement imidazole se situe à pKa= 6,5. Lors d'expériences de gel retard, la PLL-greffée-acide imidazole retarde complètement l'ADN à partir du ratio N/P (ratio molaire entre le nombre d'atomes d'azote (N) protonables du polymère par rapport au nombre de phosphate (P) dans l'ADN) de 2:1 alors que ce ratio est de 1:1 pour le complexe PLL/ADN. Au ratio N/P=2, la taille des polyplexes formés est inférieure à 150 nm.

Le greffage d'acide imidazole diminue aussi la cytotoxicité de la poly(L-lysine) sur plusieurs lignées cellulaires transfectées : les cellules CRL 1476, cellules musculaires de souris, les macrophages (P388D1) et les cellules de carcinome hépatocellulaire humaines (HepG2).

Midoux *et coll.*¹²¹ ont greffé de l'histidine sur la PLL 24130 g.mol⁻¹ par une réaction d'amidation (figure 1-14). Les auteurs proposent d'utiliser les propriétés de la L-histidine pour diminuer la cytotoxicité de ce nouveau polymère tout en augmentant son efficacité de transfection.

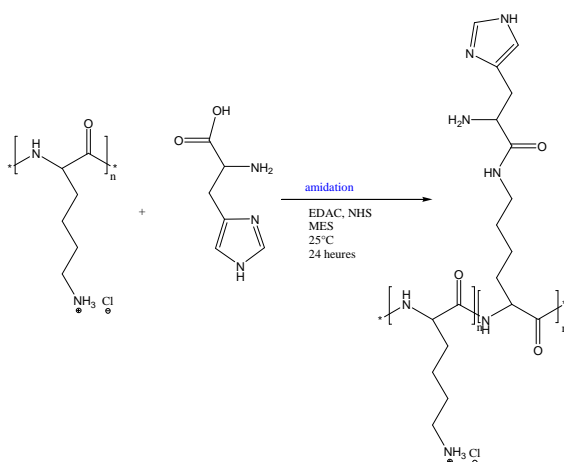


Figure 1-14 : structure de la poly (L-lysine) histidinilée

Les tailles des complexes PLL-histidinilée/ADN, au ratio w/w=3/1 (rapport N/P=5/1), sont déterminées dans plusieurs milieux, à pH de 7,4 :

- 140 nm, dans le tampon HEPES 5 mM.
- entre 105 nm et 140 nm, dans les solutions aqueuse et tamponnée suivantes : a) eau, b) eau contenant 5% de glucose, et c) tampon HEPES en présence de sérum et des protéines qui le constituent,
- 105 nm à 800 nm, dans de l'eau contenant 5% de glucose puis dilué dans du sérum.

La présence du sérum physiologique²⁹ ou de 10% de sérum de veau fœtal provoque une augmentation de tailles des complexes, expliquée par les interactions électrostatiques entre les protéines anioniques (exemple : l'héparine) du sérum et les polyplexes cationiques.

- de l'ordre de 1 à 3 μm , en milieu physiologique et en présence de sels.

Midoux a démontré que le maximum de transfection apparaît pour des PLL modifiées entre 12% et 53% en résidus histidine. Cette amélioration est attribuée à l'augmentation de l'effet éponge à proton par le groupement imidazoyle de l'histidine^{53, 121, 123}.

Cette même équipe a démontré que les PLLs histidinilées de faible masse molaire n'améliorent pas la transfection,

Dans le même temps, l'équipe de Bennis¹²⁴ a greffé la poly (L-histidine) sur la chaîne de la PLL par une réaction d'amidation (figure 1-15). Le dosage acide base du polymère a montré que le greffage de la

poly(L-histidine) augmente la capacité de l'effet éponge à proton de ce polymère par rapport à la PLL, dans l'endosome.

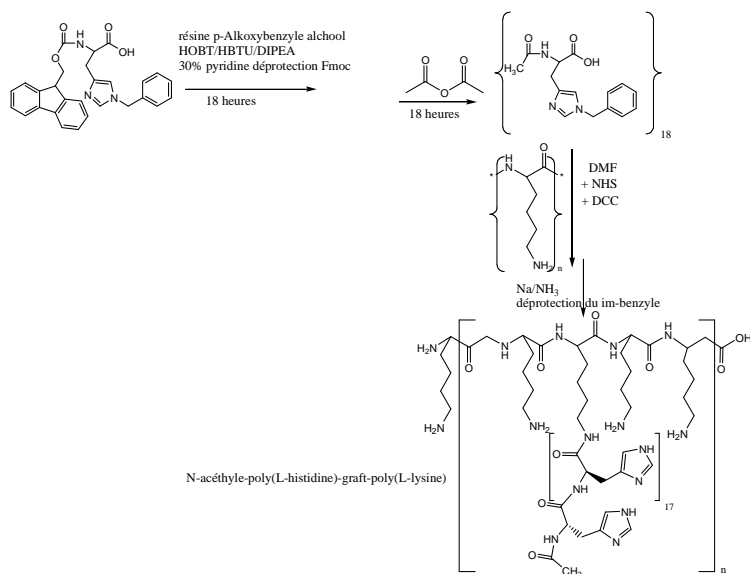


Figure 1-15 : synthèse de la N-acétyle-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine)¹²⁴

L'étude sur gel retard montre que la N-acétyl-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) (PLL-g-PLH) complexe efficacement l'ADN à partir d'un ratio vecteur/ADN de 20 (w/w). Les polyplexes PLL-g-PLH/ADN donnent de meilleurs résultats en transfection que les polyplexes ADN/PLL. La présence de chloroquine (agent endosomolitique) augmente encore l'efficacité de la transfection, démontrant dans ce cas une limite à l'activité tampon des fonctions imidazole dans cet exemple¹²⁴. Sans chloroquine, ce nouveau polymère transfecte efficacement pour un ratio ADN/vecteur en poids de (w/w) = 1/20. Il est aussi moins toxique que la PLL. Une viabilité cellulaire de 80 % est déterminée après une injection de complexes ADN/PLL-g-PLH, alors que seulement 40% des cellules résistent à la présence de la PLL seule.

Depuis la synthèse de la poly(L-lysine) histidinilée de l'équipe de Midoux, de nouvelles molécules sont apparues à base de poly(L-histidine). Ces polymères possèdent les propriétés de l'histidine qui sont importantes pour une bonne transfection des cellules.

III-2. 3. 3 La poly(L-histidine) et ses dérivés

A pH physiologique, la poly(L-histidine) est insoluble dans l'eau, car le cycle imidazole n'est pas chargé (figure 1-16). Cela limite son application en thérapie génique.

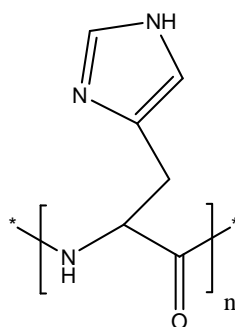


Figure 1-16 : Structure de la poly(L-histidine)

De ce fait, différents dérivés de la poly(L-histidine) ont été synthétisés pour améliorer sa solubilité et permettre d'utiliser ses propriétés d'éponge à proton lors d'expériences de transfection. L'équipe d'Asayama s'est spécialisée dans la synthèse et l'étude des dérivés de la poly(L-histidine) en fixant diverses molécules sur le cycle imidazole de la poly(L-histidine).

Le premier dérivé créé est la poly(L-histidine) aminée, synthétisée par une réaction d'alkylation partielle de la fonction imidazole de la poly(L-histidine) par le 2-bromoéthylamine hydrobromure (figure 1-17A)¹²⁵. Le deuxième dérivé est la poly(L-histidine) carboxyméthyle. Elle est aussi réalisée par une réaction d'alkylation entre la poly(L-histidine) et l'acide iodoacétique (figure 1-17B)¹²⁶.

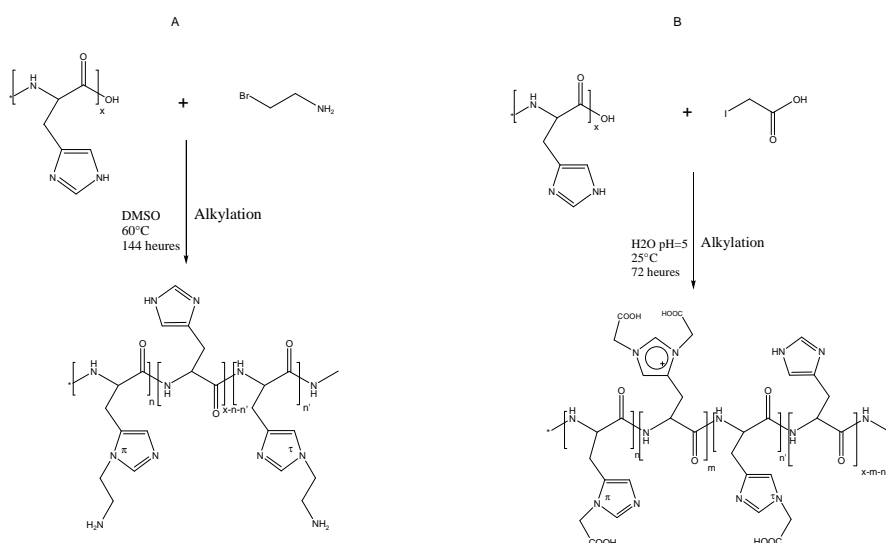


Figure 1-17 : synthèse de la Poly(L-histidine) aminée par la réaction d'alkylation¹²⁷ (A) et de la poly(L-histidine) carboxyméthyle par alkylation¹²⁶ (B)

La poly(L-histidine) aminée présente une faible hémolyse à pH physiologique, attribuée à son insertion dans la bicouche lipidique induisant sa perméabilité. En revanche, la poly(L-histidine) carboxyméthyle possède une activité hémolytique négligeable (à pH=7,4 et pH=6). A pH=5 et en présence

des charges cationiques du cycle imidazole, cette activité augmente et détruit les hématies. La poly(L-histidine) carboxyméthyle est donc moins toxique que la poly(L-histidine) aminée.

Comparé à l'ADN seul, la présence du carboxyméthyle poly(L-histidine) permet une meilleure transfection¹²⁶.

Pour les poly(L-histidine) aminée et carboxyméthyle, la présence d'amines non protonées à pH physiologique, sur le groupement imidazole de l'histidine ($pK_a=6$), confère à ces molécules un pouvoir tampon efficace pour la sortie de l'endosome. Pour le poly(L-histidine) aminée, seule les amines primaires ($pK_a=10$) peuvent être protonées à $pH=7,5$. A $pH=6$, en plus des amines primaires, 50% des fonctions imidazole de l'histidine sont aussi protonées. Les nanoparticules comportant des charges de surface positives introduites par l'excès de poly(L-histidine) aminé empêche l'agrégation des polyplexes. Ce polymère est soluble à pH élevé, empêchent l'apparition de zone de turbidité¹²⁷, à pH physiologique, car l'apport des amines primaires sur la poly(L-histidine) lui confère un caractère cationique¹²⁵ permettant de condenser efficacement l'ADN.

La poly(L-histidine) carboxyméthyle est anionique à pH physiologique. Ce polymère est employé comme une seconde protection par complexation à un polyplexe ADN/bPEI¹²⁸. Cette association permet une meilleure efficacité de transfection par rapport au complexe formé ADN/bPEI et une cytotoxicité négligeable. De plus, cette seconde protection est nécessaire car à $pH=7,4$, les charges négatives de la poly(L-histidine) carboxyméthyle interagissent avec les charges positives de la bPEI, qui, en présence des protéines du sérum, empêchent le complexe ADN/bPEI/ poly(L-histidine) carboxyméthyle de s'agréger.

Parallèlement à ces vecteurs, de nouveaux vecteurs à base de cyclodextrine apparaissent et apporte des résultats de toxicité et de transfection satisfaisants pour le transfert de gène.

III-2. 3. 4 La polyamine-cyclodextrine

Depuis 1999, l'équipe de Davis propose la synthèse d'une nouvelle famille de polymères cationiques contenant des cyclodextrines (CDs) dans la chaîne par condensation de CD bifonctionnelle avec un second monomère bifonctionnel comportant des fonctions amine protonables^{129, 130}. Cette nouvelle stratégie permet d'utiliser les propriétés de la cavité de la CD qui peut participer à des fonctionnalisations ultérieures par des molécules de ciblage/furtives fonctionnalisées par l'adamantane.

Davis et al.¹²⁹ polymérisent la 6A, 6D-Dideoxy-6A, 6D-diamino- β -cyclodextrine (CD1) et 6A, 6D-dideoxy-6A, 6D-di (2-aminoethanethio) - β -cyclodextrine (CD2) avec des composés fonctionnels cationiques (diméthylsuberimidate.2HCl ou DMS) pour former un copolymère alterné comportant des fonctions cationisables et des cyclodextrines dans le motif de répétition (figure 1-18).

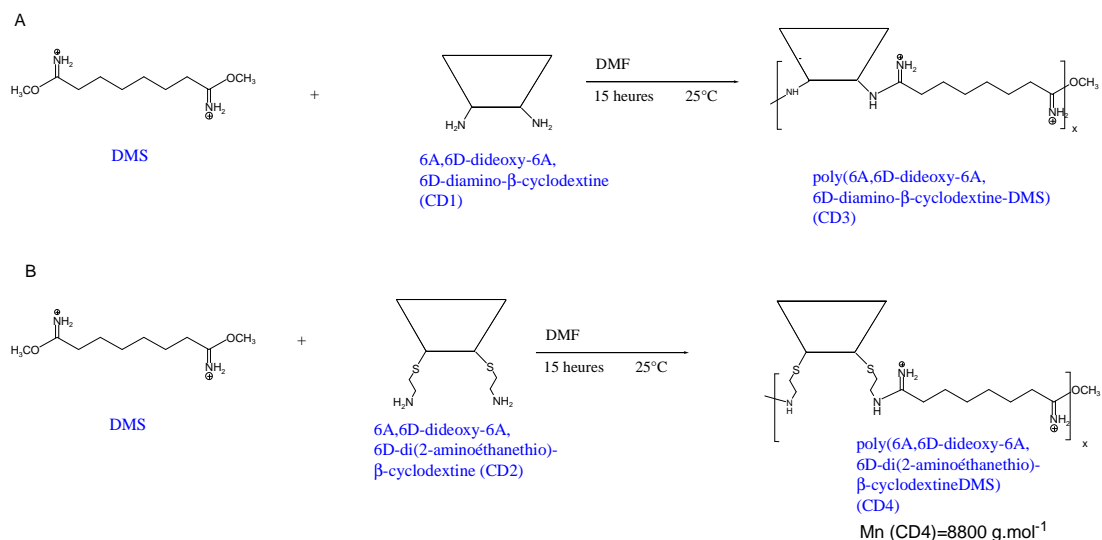


Figure 1-18 : Synthèse des copolymères 6A, 6D-Dideoxy-6A, 6D-diamino- β -cyclodextrine-DMS (A) et 6A, 6D-dideoxy-6A, 6D - di (2-aminoéthanethio)- β -cyclodextrine-DMS (B)

L'équipe Davis utilise l'expérience du gel retard pour démontrer l'interaction de l'ADN avec les cyclodextrines initiales CD1 et CD2 et des polymères CD3 et CD4 qui en proviennent.

Les auteurs annoncent que le polymère CD3 ne complexe pas l'ADN, dans une solution aqueuse contenant 150 mM de NaCl, tout comme le composé de β CD d'origine (CD1). Ils expliquent ce résultat par une grande proximité des ammoniums de CD1 et CD3 de la cavité des CDs, qui peut aussi être considéré comme un obstacle stérique à la complexation de l'ADN. Ils montrent aussi que le composé CD2 lie aisément l'ADN (à 88%) dans un milieu aqueux, mais ils ne donnent pas le ratio N/P de complexation. Le polymère CD4 complexe le plasmide dans une solution aqueuse contenant 150 mM de NaCl, à partir du ratio N/P de 1,5/1. Le DMS doit améliorer la solubilité de la cyclodextrine en milieu salin, permettant dans ce cas de complexer l'ADN.

Les auteurs démontrent aussi qu'en solution aqueuse la taille des complexes CD4/ADN est de 150 nm (N/P=1,5/1). Des agrégats sont observés en présence de sel.

Les tests *in vitro*, réalisés sur les cellules BHK-21 (cellules de reins de hamster doré) et les cellules CHO-K1 (cellules ovariennes d'hamster chinois), sont déterminés par le test de la luciférase. D'après les auteurs, le CD4, au ratio N/P=70, transfecte autant les cellules BHK-21 que la bPEI (N/P=20) dans un tampon phosphate salin (PBS) pH=7,4 et contenant 10% de sérum. Pour les cellules CHO-K1, la transfection des complexes CD4/ADN est plus faible par rapport à la bPEI pour des ratios N/P>10.

Le test de cytotoxicité de la CD4 est déterminé par la quantité de protéines observée issue de lysats des cellules transfectées. L'équipe de Davis remarque que le bPEI, au ratio N/P=20, est très toxique pour les cellules BHK-21 et CHO-K1, en tampon phosphate Sali ou PBS (30% de cellules viables). Les complexes CD4/ADN (N/P de 20 à 70) sont peu toxiques, pour les cellules BHK-21 (90% de cellules viables) dans le tampon PBS par rapport à la bPEI. En présence de 10% de sérum, la toxicité des polyplexes augmente et il

ne reste que 40% de cellules BHK-21 viables. Pour les cellules CHO-K1, quel que soit le ratio N/P utilisé (N/P de 1,5 à 70), les polyplexes CD4/ADN ne sont pas toxiques (100% de cellules viables), dans le tampon PBS, avec ou sans sérum.

La stratégie de Gonzalez *et al*¹²⁹, de synthétiser de nouveaux vecteurs originaux à base de cyclodextrine, apporte des résultats intéressants en cytotoxicité, permettant d'utiliser des ratios de complexation importants (N/P=50) pour obtenir une efficacité de transfection égale à la bPEI (N/P=20).

Les dérivés à base de poly(lysine), de poly(histidine) ou de poly(cyclodextrine) ont montré de bons résultats de transfection, mais sont supplantés par la poly(éthylèneimine) et ses dérivés.

III-2. 3. 5 Les poly(éthylèneimine)s (PEIs) et ses dérivés

III- 2. 3. 5. 1 Les poly(éthylèneimine)s

La PEI est un polymère cationique à pH physiologique et fut proposée pour la thérapie génique par Boussif *et al*¹³¹. La structure de ce polymère est une succession simple de motifs $-CH_2CH_2NH-$. Il existe deux sortes de PEIs, la poly(éthylèneimine) linéaire (IPEI) et la poly(éthylèneimine) branchée (bPEI) (figure 1-19).

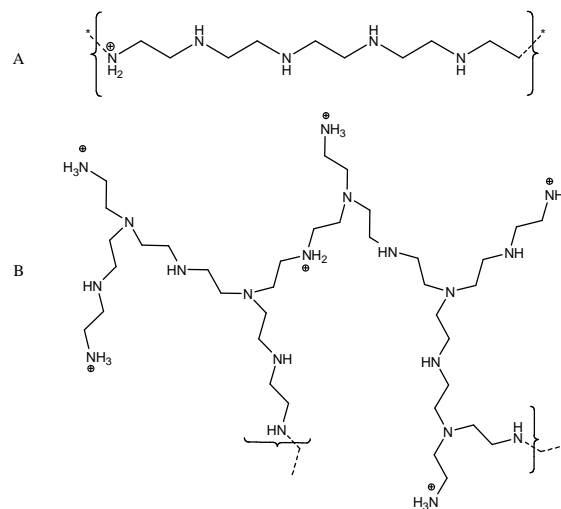


Figure 1-19 : Structures chimiques de la IPEI (A) et de la bPEI (B)

Les PEIs sont solubles dans l'eau, à pH physiologique (pH=7,4), du fait de leur densité de charge provenant de la protonation des amines primaires (bPEI), secondaires (IPEI) et tertiaires (bPEI). Elles possèdent un bon pouvoir tampon (entre pH=4,5 et 7,5), intéressant pour la thérapie génique. Ceci est expliqué par un nombre important d'amines non protonées à pH=7,4. Dans l'endosome, l'effet éponge à

protons (expliqué au paragraphe II- 2.3.) des PEIs permet de déstabiliser la membrane endosomiale^{132, 133}, et de libérer l'ADN dans le cytosol.

La différence d'architecture entre la IPEI et la bPEI s'explique par deux voies de synthèse différentes.

La bPEI est obtenue par polymérisation cationique par ouverture de cycles de l'aziridine (en masse, à basse température ou en solution aqueuse ou alcoolique^{134, 135}).

La IPEI est obtenue en deux étapes :

- Par la polymérisation cationique par ouverture de cycles alkyloxazoline,
- Puis par une hydrolyse, acide ou basique, des polyalkyloxazolines permettant d'obtenir des IPEIs¹³⁶. La IPEI la plus utilisée, issue de la poly(éthylloxazoline) commercialement disponible, possède une masse molaire de 22000 g.mol⁻¹.

III-2. 3. 5. 1. 1 – Etude physico-chimique des PEIs

Afin de connaître la densité de charge de la PEI (linéaire et branchée 25000 g.mol⁻¹) en fonction du pH, Mengarelli et al.¹³⁷ ont utilisé la méthode de titration, à différentes concentrations en PEI (0,23 M et 0,0465M). Cette étude a démontré que la densité de charge de la macromolécule dépend de la concentration en PEI. Mengarelli et al. ont montré qu'à pH physiologique, la solution de IPEI 25000 g.mol⁻¹ à 0,0465M possède 12% d'ammonium tandis que celle à 0,23 M possède 14% d'ammonium. Ce faible écart de protonation s'accroît vers les pH acides (à pH 2, la IPEI de 0,0465M possède 35% d'ammonium et la IPEI 0,23molL⁻¹ en a 40%). Ensuite, une comparaison du taux de protonation des deux PEI de masse molaire équivalente a mis en évidence qu'à pH physiologique, la IPEI 25000 g.mol⁻¹, de concentration 0,23M, possède une densité de charge de 14% d'ammonium ; tandis que la densité de charge de la bPEI 25000 g.mol⁻¹, dans les mêmes conditions, est plus élevée (40% d'ammonium), en accord avec des résultats préliminaires déjà reportés^{110, 138-140}.

III-2. 3. 5. 1. 2 – Complexation et taille des polyplexes

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les IPEI et bPEI sont partiellement protonées à pH physiologique permettant ainsi la formation de complexe avec l'ADN par interaction électrostatique. La formation du polyplexe entre les PEI et le plasmide est conditionnée par le rapport N/P (nombre d'ammonium du vecteur sur le nombre de phosphate de l'ADN). Dans le tampon HEPES 10 mM à pH=7,4, l'équipe de Fischer a démontré que les bPEIs de haute masse molaire (25000 à 800000 g.mol⁻¹) permettent de

former des polyplexes bPEI/ADN de taille plus petite (environ 160 nm, pour le ratio N/P=6/1) que les bPEIs de faible masse molaire (environ 600 nm, pour le ratio N/P=6/1). Pour les bPEIs, quand le ratio N/P augmente, la taille des complexes ADN/bPEI diminue^{141, 142}. L'équipe de Matar¹⁴³ a démontré que les IPEIs de petite masse molaire (2500 à 10000 g.mol⁻¹) forment des polyplexes de petite taille (entre 100 et 150nm) en tampon HEPES, pour un ratio N/P de 6/1.

Goula¹⁴⁴ et al. réalisent leur étude de taille des complexes bPEI/ADN dans une solution aqueuse de NaCl 15mM. Les auteurs forment les complexes IPEI 22000 g.mol⁻¹/ADN directement dans la solution de NaCl. Ils indiquent que pour les ratio N/P= 2/1, 6/1, et 10/1 les complexes s'agrègent et forment des particules d'1 µm.

Dunlap et al. ont directement formulé les complexes bPEI/plasmide dans une solution aqueuse contenant 150mM de NaCl¹⁴⁵. Ils obtiennent des tailles de polyplexes entre 20 et 40 nm, pour un ratio N/P= 1,6/1 des complexes d'ADN formulés avec la IPEI (22000g.mol⁻¹) ou la bPEI(25000g.mol⁻¹), dans une solution saline à 15 mM et 150 mM. Szoka et al.¹⁴⁶ ont mesuré la taille du complexe bPEI/ADN pour un ratio N/P=6/1. La taille du complexe est plus élevée que pour l'équipe de Dunlap, mais elle toujours inférieure à 100 nm.

Dans une solution aqueuse de glucose 5%, l'équipe de Goula¹⁴⁴ a démontré que la IPEI22KDa complexe totalement l'ADN pour un ratio N/P=2/1. Pour les ratios N/P de 2, 6 et 10, les tailles des particules se stabilisent entre 50 et 60 nm (concentration en plasmide de 10 à 500 µg/ml). La structure des polyplexes, régulière, forme des sphères ou des toroïdes (démontré par la microscopie à balayage de force atomique).

III-2. 3. 5. 1. 3 – Transfection

In vitro, la comparaison des tests de transfection sur les cellules 3T3 (Fibroblastes de souris) montre que la IPEI 22000 g.mol⁻¹ transfecte mieux que les bPEIs de haute masse molaire (de 25 000 g/mol à 800 000 g/mol), pour les N/P optimaux, les complexes étant de taille proche de 160 nm. A noter que les IPEIs d'une masse molaire supérieure à 88 000 g/mol sont moins efficaces que les bPEIs de haute masse molaire¹⁴⁷. La masse molaire optimale des PEIs pour la transfection se situe entre 700 et 25000 g/mol (figure 1-20)^{34, 148}. Comparée à d'autres polymères, (poly(L-histidine), les polypropylimines, les PEIs modifiées ou le chitosane (cf. : figure 1-20)), la IPEI 22000 g.mol⁻¹ donne de meilleurs résultats en transfection¹⁴¹, pour les cellules 3T3.

La IPEI (22000 g.mol⁻¹) est commercialisée sous le nom de jetPEITM par la société Polyplus ou ExGen500 par EUROMEDEX. Celles-ci sont souvent utilisées en tant que référence lors des tests de comparaison *in vivo* et *in vitro* avec les nouveaux polymères créés (polymères à base de PEI, PEG, PLL...)^{141, 142}.

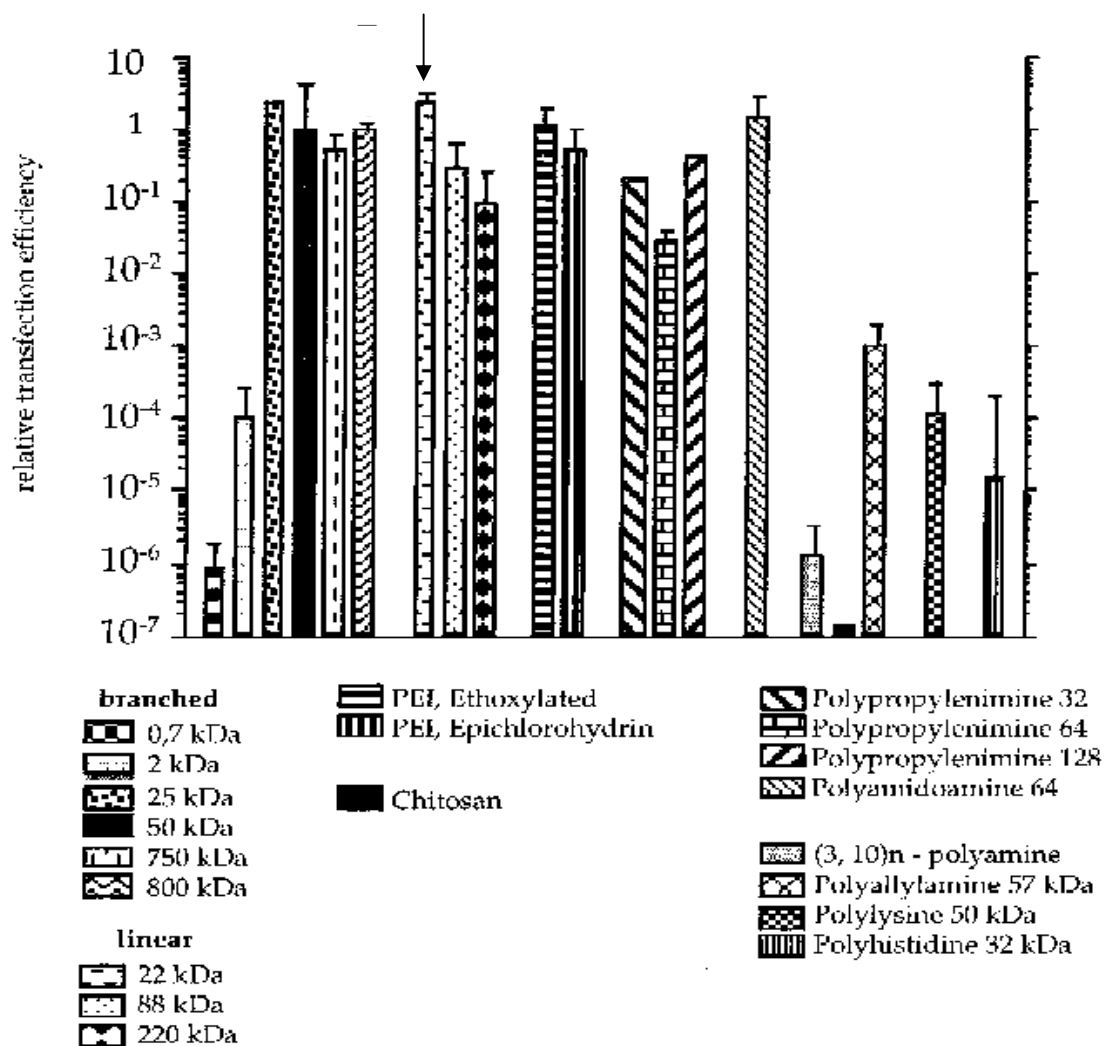


Figure 1-20 : Efficacité de différents polymères cationiques en transfection *in vitro* (les cellules 3T3 sont transfectées avec 2 mg de plasmide pCMV-Luc, complexé avec des vecteur au ratio optimal de transfection)¹⁴¹

III-2. 3. 5. 1. 4 – Toxicité

Dans un but d’injecter un maximum d’ADN (compris entre 50 μ g et 100 μ g), pour une transfection *in vivo*, il faut utiliser un ratio N/P minimum de 20. Cependant, à ce ratio, seule la bPEI est tolérée par les cellules 3T3, car elle est moins toxique que la IPEI^{34, 141}. D’après Godbey¹⁴⁹, la PEI présente deux sortes de toxicité pendant la transfection des cellules :

- La première est liée à la PEI libre (non complexée à l’ADN). Le polymère qui est cationique, interagit avec les molécules de charge négative du sérum. Cela provoque une précipitation de la PEI libre qui adhère à la surface des cellules et déstabilise leurs membranes¹⁴².

- la seconde est liée au complexe ADN/PEI. Après la libération de l’ADN dans le cytoplasme, la PEI peut interagir avec les organites cellulaires et inhiber le fonctionnement de la cellule^{34, 149}.

L'équipe de Godbey a comparé la stabilité des complexes ADN/bPEI et ADN/poly(L-lysine) *in vivo* grâce au test de digestion par la DNase et par des mesures de fluorescence. La bPEI protège plus longtemps l'ADN que la poly(L-lysine) (PLL) (1 jour au lieu de 3 min)¹⁵⁰.

Il faut rappeler que les PEIs (linéaires et branchées) possèdent une toxicité équivalente à la PLL. L'équipe de Fischer utilise l'analyse de la déshydrogénase de lactate (LDH) pour étudier la toxicité des PEI. Ce test est effectué sur fibroblastes de la souris L929 dans un milieu Dulbecco/Vogt modifié par un minimum essentiel d'Eagle (DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau, 2 mM de glutamine à 37°C, 10% de CO₂ et 95% d'humidité. D'après ce test, les bPEIs sont toxiques, pour une concentration supérieure à 0,1 mg/ml, car les résultats obtenus au bout d'une heure apportent un taux de 55% en LDH. Cette cytotoxicité est confirmée par le test de cytotoxicité MTT : à une concentration de 0,1 mg/mL, la bPEI engendrent une apoptose de 95% des cellules, au bout de 3 heures, entraînant la mort des souris¹⁵¹.

En injection intraveineuse, la quantité de plasmide à injecter dans les souris ne peut dépasser 100 µg (souvent comprise entre 20 et 50 µg) car l'ADN est aussi toxique. Avec cette quantité d'ADN, la toxicité mesurée de la IPEI implique que le ratio maximal N/P utilisable en transfection intraveineuse ne peut excéder 20^{152, 153}.

Cette méthode de transfection active plus rapidement le système immunitaire contrairement à une injection par aérosol. Ce deuxième protocole permet d'obtenir une faible toxicité chez les lapins. Après l'injection de 300 µg de pCMV-Luc complexé à la IPEI (N/P=5), le test de la luciférase montre la présence d'une forte transfection dans les poumons⁷⁹.

Bien que l'utilisation de PEIs conduit à des résultats intéressants en transfection, elles sont très toxiques pour les organes. Actuellement, les recherches se tournent vers de nouveaux vecteurs synthétiques à base de bPEI et IPEI modifiées, pour diminuer la toxicité du polymère initial et augmenter le transfert de gène.

III- 2. 3. 5. 2 Les modifications des PEIs

Depuis plusieurs années, la PEI la plus utilisée est la bPEI, pour ses performances *in vivo*. De nombreux dérivés de ce polymère sont apparus pour diminuer sa toxicité. Peu de dérivés de la IPEI sont répertoriés dans la littérature. Nous allons donner dans ce paragraphe l'ensemble des stratégies pour améliorer les performances des PEI en tant que vecteur synthétiques.

Les PEIs ont premièrement été modifiées par des composés possédant des chaînes hydrophobes qui permettent une diminution de leur cytotoxicité et une amélioration de la délivrance de l'ADN dans les cellules¹⁵⁴. Ces nouveaux polymères doivent garder un bon pouvoir complexant de l'ADN, en permettant la

formulation de nanoparticules de petite taille¹³² afin que les polyplexes puissent entrer facilement dans la cellule en utilisant les voies d'endocytose de la cellule²⁹.

III-2. 3. 5. 2. 1 – Les PEIs modifiées poly(éthyl oxazoline)

Brissault et al. ont synthétisé les poly(éthyl-oxazoline-co-éthylènimine) (LP(EtOXZ-co-EI)), poly(éthylènimine-co-N-propyl-éthylènimine) (LP(EI-co-NPEI), poly(éthyl-oxazoline-co-N-propyléthylènimine) (LPNPEI) (figure 1-21)^{136, 155}. Ce travail avait pour objectif d'étudier les propriétés de transfection des dérivés de la IPEI en fonction de divers paramètres structuraux.

Certains de ces polymères (LP(EI-co-NPEI) et LPNPEI) possèdent des amines tertiaires dont le pKa est inférieur à celui des amines secondaires de la IPEI. Ceci implique que le taux de protonation par macromolécule à pH physiologique est plus faible que pour la IPEI, empêchant une bonne complexation du plasmide.

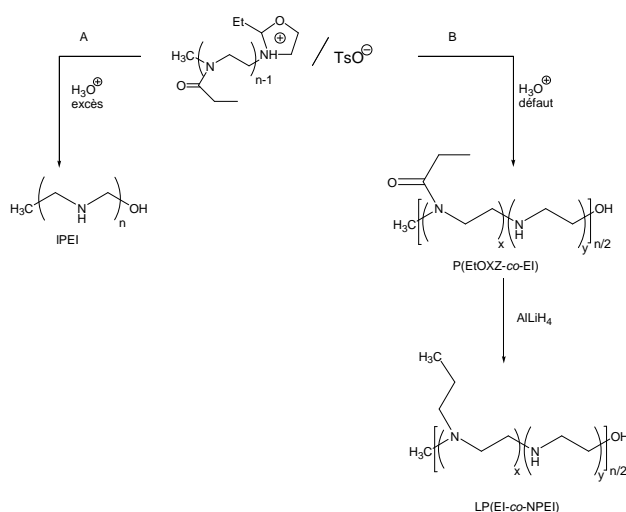


Figure 1-21 : synthèse des copolymères LP(EI-co-PEI) et LNPEI

La deuxième série de polymère synthétisée par Brissault et al.¹⁵⁶ est composée de la poly(éthylènimine-co-N-(2-aminoéthyléthylènimine)) et de la poly(éthylènimine-co-N-(2-diméthylaminoéthyl)éthylènimine) (figure 1-22). Ce travail consiste à étudier l'influence de la classe des amines sur la capacité des vecteurs synthétisés à transfecter l'ADN. L'efficacité du pouvoir tampon de ces polymères diminue avec l'augmentation du degré de substitution de la IPEI. Les amines tertiaires apportées par la modification de la IPEI diminue la basicité moyenne du polymère et donc réduit son effet éponge à protons.

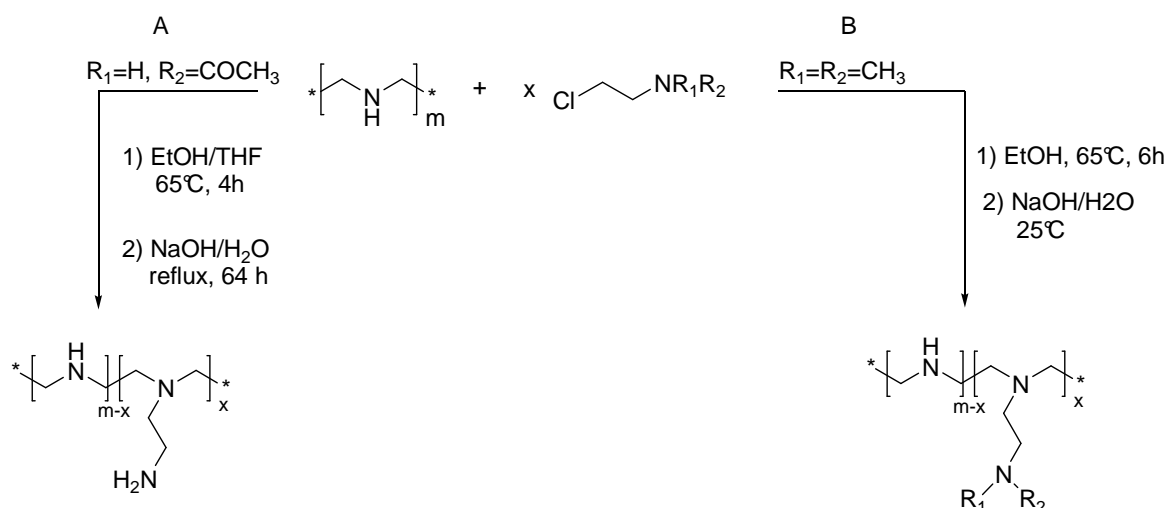


Figure 1-22 : synthèse des copolymères poly(éthylèneimine-co-N-(2-aminoéthylèneimine) (A) et la poly(éthylèneimine-co-N-(2-diméthylaminoéthyl)éthylèneimine)(B)

L'expérience de gel retard montre que tous ces polymères¹³⁶ sont capables de complexer l'ADN. Mais comparés à la IPEI, il faut augmenter le ratio entre ces polymères et l'ADN pour obtenir une complexation totale du plasmide (le ratio vecteur/ADN w/w varie de 1/1 à 15/1 selon les polymères). Cette augmentation s'explique par la diminution du taux de protonation par macromolécule à pH=7,4 provoquée par la modification de la IPEI. Toutefois, les tailles des complexes sont du même ordre de grandeur (75nm) et le potentiel zêta reste positif (environ +20 mV), quelle que soit la nature des amines (secondaires ou tertiaires) sur les vecteurs.

La poly(éthylèneimine-co-N-(2-aminoéthylèneimine) possède les mêmes taux d'amines que la bPEI tout en étant linéaire. Les auteurs se sont affranchis de l'effet d'architecture du polymère. Les résultats de transfection de ce copolymère sont similaires à la bPEI, permettant de déduire que l'architecture est un paramètre important et qu'il faut mieux utiliser des polymères linéaires.

Les autres polymères¹³⁶ apportent de moins bons résultats de transfection que la bPEI 25 000 g mol⁻¹ et la IPEI 22 000 g mol⁻¹ sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humaines (HepG2). La présence des groupements propyle réduit la transfection.

Malgré des résultats décevants en transfert de gène, ces études ont démontré que les vecteurs (quels que soient leurs taux de modification de la IPEI), possèdent un comportement proche de la IPEI 22000 g.mol⁻¹. Il semble donc que la topologie et la flexibilité du vecteur soient des paramètres plus importants que la classe des amines portées par les polymères utilisés en tant que vecteurs.

La synthèse de la IPEI-*b*-POE a été réalisée par Brissault¹⁵⁷ *et al.* Dans un premier temps, une copolymérisation cationique est effectuée entre l'éthyle oxazoline et le méthyle oxazoline (une copolymérisation est effectuée pour diminuer les réactions de transfert et accroître la Mn du bloc alkyloxazoline) avec pour amorceur du poly(oxyde d'éthylène- α -méthoxy- ω -4-toluène sulfonate) de masse molaire 2000 g.mol⁻¹. La réaction est réalisée dans l'acétonitrile à 82°C. Ensuite, le copolymère statistique à base d'oxazoline est hydrolysé totalement par hydrolyse basique. Cette hydrolyse coupe les résidus éthyle et méthyle de la poly(éthylloxazoline-co-méthylloxazoline) afin d'obtenir la IPEI (figure 1-23). Le poly(oxyde d'éthylène)¹⁵⁷ permet d'accroître la solubilité dans l'eau à pH élevé du segment polyamine et peut permettre une stabilisation stérique dans le cas de formation de polyplexes avec l'ADN.

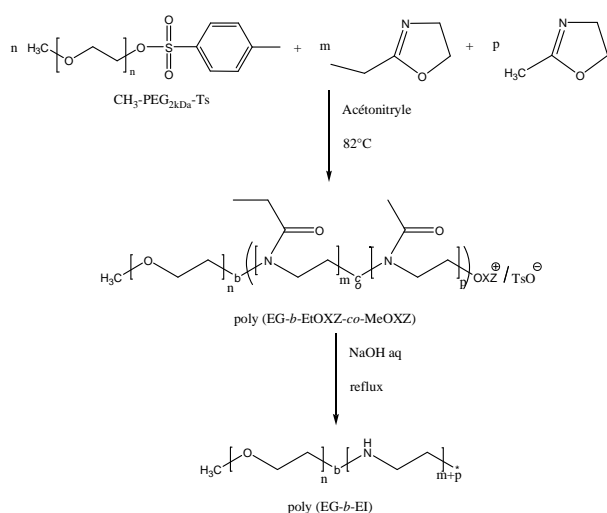


Figure 1-23 : Synthèse du poly(EG-*b*-EI)

Le poly(EG-*b*-EI)¹⁵⁷ (IPEI 20kDa) complexe totalement l'ADN pour un ratio (w/w) poly(EG-*b*-EI)/ADN de 2, plus élevé que dans le cas de la IPEI 22kDa (w/w=0,75). La formulation du complexe poly(EG-*b*-EI)/ADN dans de l'eau contenant 5% de glucose donne des particules de taille de 70 nm, plus petite que la taille des complexes IPEI 22000g.mol⁻¹/ADN (100 nm) (pour un ratio poly(EG-*b*-EI)/ADN w/w=62,5/25) . Toutefois, la présence de sel (Na Cl 150 mM) fait augmenter le diamètre des polyplexes jusqu'à 1 μ m (ratio w/w=62,5/25). Malgré l'utilisation de PEG, le potentiel zêta de ces particules est positif, impliquant une localisation de fragment de PEI en surface du polyplexe.

Les études, *in vitro*, du poly(EG-*b*-EI)¹⁵⁷ sur des cellules embryonnaires de rein humaines (HEK293) et HepG2 montrent que ce nouveau polymère donne les mêmes résultats en transfection et en cytotoxicité que

la IPEI. Pour mettre à profit les propriétés du PEG, celui-ci doit recouvrir l'extérieur de la particule. De ce fait, il doit être introduit après la formation du complexe IPEI/ADN.

III-2. 3. 5. 2. 3 – Les PEIs-cyclodextrines

Bien que l'équipe de Davis ait démontré que l'utilisation des cyclodextrines (CDs), permette d'obtenir des vecteurs très peu toxiques, pour le transfert de gène, les polyamines-CD synthétisées apportent des résultats un peu décevants en transfection par rapport à la poly(éthylèneimine) branchée (bPEI)^{129, 158}. De ce fait, l'équipe a changé de stratégie en greffant les CDs directement sur la bPEI^{159, 160}, par une monomodification de la CD par une fonction tosyle, réagissant ensuite sur la bPEI (figure 1-24). Les bPEI-CD permettent une fonctionnalisation non covalente des polyplexes par des fonctions de furtivité ou de ciblage : la cavité de la CD peut former un complexe d'inclusion avec une molécule d'adamantane fonctionnalisée par une chaîne de poly(éthylène glycol) (furtivité), ou un ligand (galactose, folate, transferrine pour le ciblage). Les ligands sélectionnés sont spécifiques des organes visés (foie, poumon...)¹⁵⁹. Cette approche originale permet d'obtenir un système supramoléculaire extrêmement versatile.

Pun *et al.*¹⁶⁰ ont modifié à la fois la bPEI 25000 g.mol⁻¹ (figure 1-24A) et la IPEI 25000 g.mol⁻¹ (cf. : figure 1-23B) par du 6-monotosyl-β-cyclodextrine, par une réaction de substitution nucléophile. Pun *et al.* montrent que pour un taux de greffage de 12% en CD, la bPEI-CD¹⁶⁰ retarde complètement l'ADN pour un ratio N/P de 10, alors que la IPEI-βCD forme des agrégats ne permettant pas la transfection de cellules. Pun *et al.* démontrent aussi qu'en solution aqueuse contenant 150 mM de NaCl, la taille des polyplexes bPEI-βCD/ADN et IPEI-βCD/ADN est d'environ 300 nm. La présence de PEG-adamantane, permet de garder une taille de particules constante de 150 nm, en présence de sel. *In vitro*, l'augmentation du taux de greffage en CD sur la bPEI réduit l'efficacité du transfert de gène.

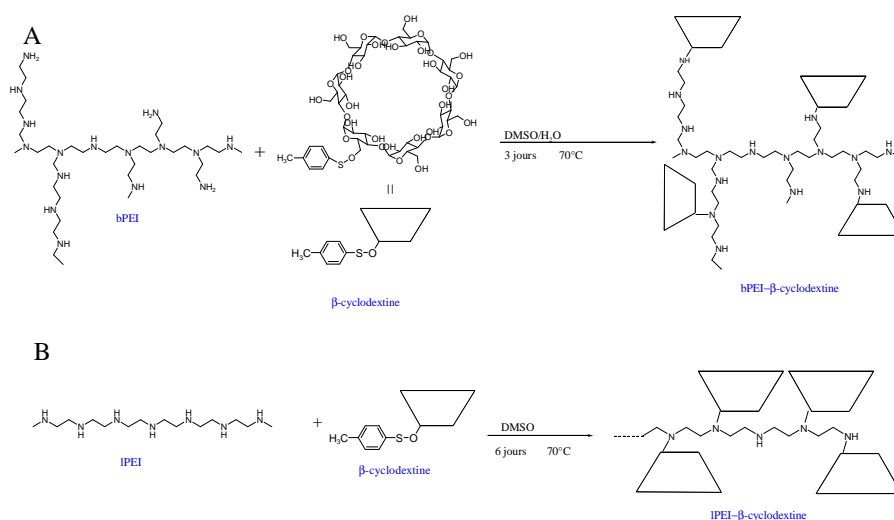


Figure 1-24 : Synthèse de la bPEI 25000 g mol⁻¹-βCD et de la IPEI25000 g mol⁻¹-βCD

Pun *et al.* ont déterminé l'IC₅₀ du vecteur à base de CD. D'après ce test, la bPEI possède un IC₅₀ d'environ 0,5 mM (concentration exprimée en fonction amine portée par le polymère) alors que la bPEI-CD 8% et bPEI-CD 16% possèdent respectivement un IC₅₀ de 1,6 mM et de 6,7 mM en fonctions amine, plus élevé, indiquant une diminution de la cytotoxicité du vecteur.

Forrest¹⁶¹ s'est lui aussi intéressé à la modification de la bPEI 25000 g.mol⁻¹ par de la cyclodextrine tosylée, selon la même méthode que Pun (figure 1-24B). Les complexes vecteur/ADN sont réalisés dans 20 mM de tampon PIPE (tampon pipérazine-N, N'-bis (2-éthanesulfonique) et 150 mM de NaCl (pH=3). Les vecteurs CD-bPEI complexent totalement l'ADN à partir d'un ratio vecteur/ADN en poids de 0,7/1 (N/P=3,1/1), plus élevé que pour le bPEI 25000 g.mol⁻¹ (w/w=0,3/1) et la détermination du potentiel zêta montre que ces polyplexes sont neutres. La taille des complexes de bPEI-CD/ADN se situe entre 100 et 200 nm dans le tampon PIPE/NaCl, pour un ratio CD-bPEI/ADN (w/w)=2/1.

Forrest fait remarquer qu'*in vitro*, la bPEI 25000-βCD permet une délivrance de gène légèrement supérieure (5.10¹ ng de luciférase/ g totale de protéines) à celle de la bPEI 25000 g.mol⁻¹ (1.10¹ ng de luciférase/ g. totale de protéines), pour les cellules embryonnaires de rein humaines (HEK293). L'interprétation de ce résultat est que la présence de la βCD aide la déstabilisation de la paroi de l'endosome en formant des complexes d'inclusion avec le cholestérol composant la membrane.

Les tests cytotoxicité MTT sur les cellules HEK293 montrent une réduction de l'activité métabolique des cellules en présence de bPEI de 50% (pour une concentration de 15μg/mL), alors qu'à la même concentration, l'activité métabolique des cellules, en présence de la bPEI 25000-βCD, reste identique au témoin (cellules seules).

Depuis 2006, Tang *et al.* greffent des dérivés de β CD¹⁷ et des γ CD¹⁶² sur des poly(éthylènimines) de faible masse molaire (600 g.mol⁻¹) (figure 1-25).

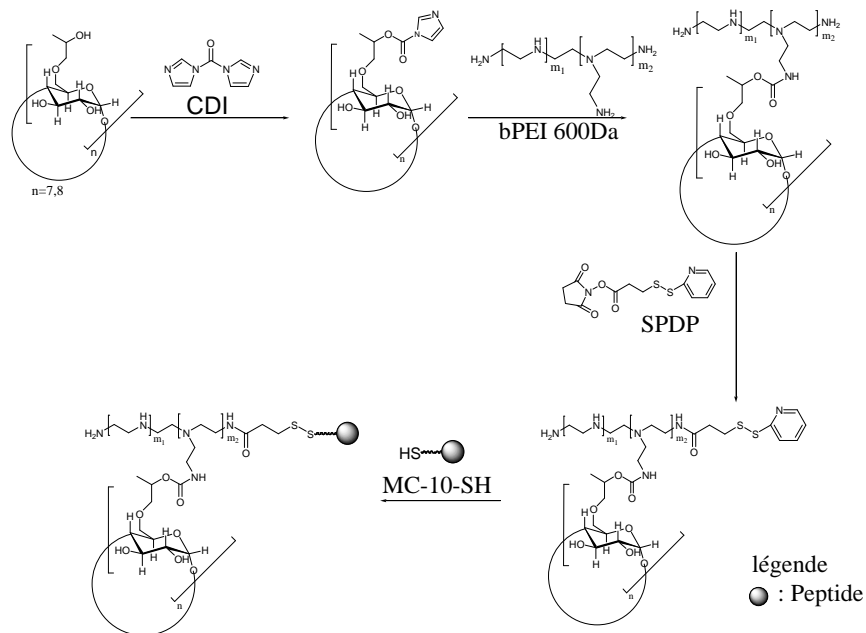


Figure 1-25 : Synthèse de la bPEI- β CD-peptide et de la bPEI- γ CD-peptide¹⁶²

L'équipe de Tang a démontré que leurs polymères, la bPEI- γ CD et la bPEI- γ CD-peptide complexent totalement l'ADN à partir d'un ratio N/P de 6 : 1. Au ratio N/P=40, la taille du complexe est de 150 nm et le potentiel zêta de 23 mV. La taille du polyplexe bPEI- γ CD-peptide/ADN est la même que celle du complexe bPEI- γ CD/ADN (150nm).

In vitro, les polyplexes bPEI- γ CD¹⁶²/ADN et bPEI- γ CD-peptide/ADN transfectent mieux les cellules d'adénocarcinome ovarien humain (SKOV-3) que la bPEI 25000 g.mol⁻¹. Ces molécules ne sont pas toxiques. Pour un ratio N/P=120, toutes les cellules transfectées sont viables. *In vivo*, les résultats du transfert de gène ne dépassent pas 5.10⁵ RLU/mg de tissus, pour les cellules SCKOV-3, qui ont été transplantées dans l'aisselle droite des souris athymiques pour établir les modèles de tumeur. L'équipe de Tang a observé une diminution de la cytotoxicité des vecteurs en utilisant de faibles masses molaires de bPEI. Ces résultats confirment ces premières remarques, concernant la modification de bPEI de faible masse molaire par la β CD¹⁷.

Le vecteur synthétisé par Tang est intéressant car il est hydrosoluble et biodégradable dans les conditions physiologiques, permettant son élimination de la cellule.

III-2. 3. 5. 2. 4 – Les PEIs acétylées

L'équipe de Pack^{163, 164} a acétylé la bPEI 25000 g.mol⁻¹ (figure 1-26) dans le but d'augmenter la transfection et de diminuer la cytotoxicité de la bPEI. Les amines primaires et secondaires de la bPEI 25000 g.mol⁻¹ sont acétylées par de l'anhydride acétique. La capacité tampon du polymère diminue avec l'augmentation du taux de greffage en substituants acétyle. Cet effet est associé à la diminution du nombre des amines primaires et secondaires par macromolécule mises en jeu lors de l'acétylation de la bPEI.

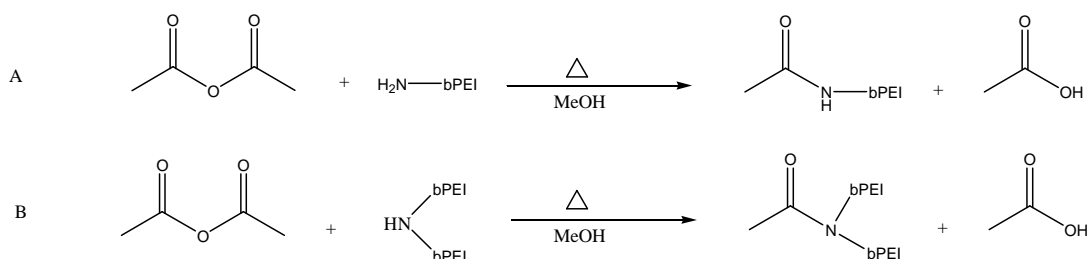


Figure 1-26 : réaction d'acétylation sur les amines primaires (A) et les amines secondaires (B) de la bPEI à 60°C durant 4 heures¹⁶⁴

L'équipe de Pack utilise l'expérience du gel retard pour montrer la complexation de l'ADN avec les bPEI-Ac par l'absence de migration du complexe vers la cathode. Ce test informe que les polymères acétylés (bPEI-Ac) complexent totalement l'ADN pour un ratio vecteur/plasmide (w/w) de 0,5/1 (complexe bPEI-Ac₃₄/ADN, N/P=2,3), plus élevé que pour la bPEI (w/w=0,17/1 donc N/P=1,35), et ce ratio augmente avec degré d'acétylation (w/w=1.7 pour le complexe bPEI-Ac₁₀₀/ADN). La modification de la bPEI fait disparaître des amines primaires et secondaires au profit de fonctions amide. De ce fait, pour un même ratio N/P=1,35, les bPEI-Ac sont moins chargées à pH=7,4, défavorisant la complexation avec le plasmide. D'après Dooby¹⁶⁵, le choix des chaînes hydrophobes est important car les chaînes pendantes courtes (acétyles et butanoïques) améliorent l'efficacité de complexation de l'ADN.

Les polyplexes bPEI acétylés/ADN sont formulés dans 20 mM de tampon PIPES, pH=7,4, contenant 150 mM de NaCl. Le diamètre des complexes, plus élevé que celui des complexes bPEI/ADN (entre 40 et 60 nm), varie entre 80 et 250 nm (ratio vecteur/ADN (w/w)=2/1), selon le degré de modification de la bPEI (entre 15 et 97%). Pour la bPEI-Ac modifiée à 97% et 100% (greffage des amines primaires et secondaires), la taille des complexes varie entre 450 et 750 nm. A ce ratio (w/w)=2/1, le potentiel zêta de la bPEI-Ac se situe entre 8 et 11 mV, alors que celui de la bPEI 25000g.mol⁻¹ (N/P=15) est plus élevé (15 mV). Cette diminution est associée à la diminution d'unités amine protonables par macromolécule.

Les auteurs ont observé que la transfection *in vitro*, sur les cellules musculaires squelettiques de souris (myoblastes, C2C12) et les cellules d'adénocarcinome du sein humaines (MDA-MB-231), augmente avec le taux croissant d'acétylation jusqu'à un optimum (respectivement 1*10⁴ et 5*10⁴ RLU/μg de protéines),

obtenu pour les bPEI-Ac modifiées par 43% et 57% de chaînes acétyles^{163, 164}. Les bPEI-Ac possédant un fort taux en groupements acétyle (> à 57%) ne transfectent plus les cellules. Forrest *et al.* ont montré que la présence du sérum diminue l'efficacité du transfert de gène, pour les bPEI-Ac (1.10^4 et 5.10^3 RLU/ μ g de protéine au lieu de $5*10^4$ RLU/ μ g de protéine pour les bPEI-Ac 43% et bPEI-Ac 57%). La transfection est possible en présence de sérum car les groupements acétyle réduisent la charge de surface de la bPEI, diminuant ainsi les interactions électrostatiques entre les complexes et les protéines du sérum.

L'étude de cytotoxicité, réalisée sur les bPEI-Ac, montre qu'à une concentration de 50 μ g/ml en polymère, toutes les bPEI-Ac sont moins toxiques que la bPEI.

Il est donc intéressant de greffer des chaînes acétyles sur la bPEI car elles améliorent le transfert de gène et diminuent la toxicité du polymère.

Nimesh *et al.*¹⁶⁶ ont réalisé un gel physique, donc dynamique, par mélange de la bPEI 750000 $g.mol^{-1}$ acétylée (bPEI-Ac) et de poly(éthylène glycol) bis phosphate (PEG-bis-P), (figure 1-27). L'objectif est d'utiliser le PEG pour rendre furtif des nanoparticules à base de ce gel et l'ADN. L'approche gel physique est utilisée afin de permettre au système auto-associé de se réorganiser en présence d'ADN de manière à générer, de façon ultime, des nanoparticules cœur-couronne, constituées d'un polyplexe ADN-PEI entouré d'une couronne de PEG.

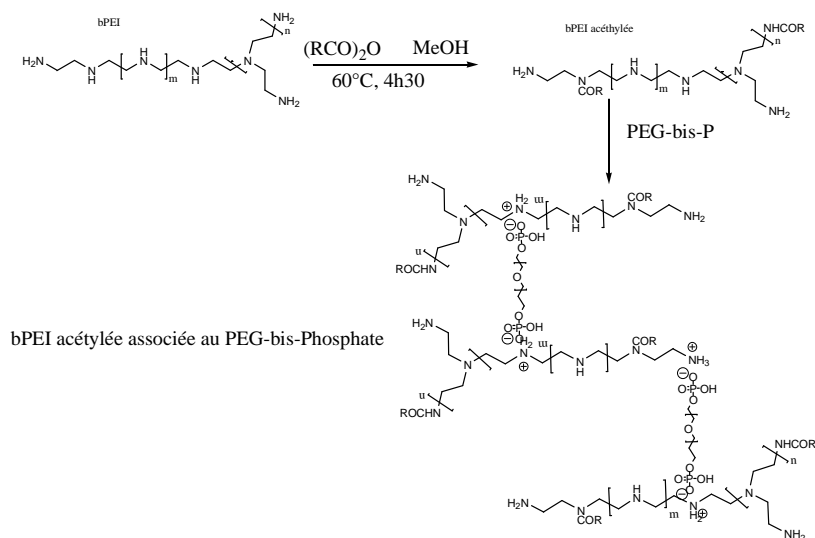


Figure 1-27 : Synthèse de la bPEI acétylée, puis association du PEG-bis-phosphate¹⁶⁶

Les amines primaires et secondaires de la bPEI sont acétylées, soit par de l'anhydride acétique, de l'anhydride propionique ou de l'anhydride butyrique pour examiner les effets de la longueur de la chaîne acétyle sur les interactions physiques et l'efficacité de transfection. Il est important de signaler que les auteurs n'ont pas déterminé le diamètre de leurs particules de gel avant de le complexer au plasmide.

La titration de la bPEI-Ac-PEG montre une réduction du pouvoir tampon de la bPEI 750000 g.mol⁻¹, impliquant une tendance de protonation des gels de bPEI qui se réduit de manière significative selon le taux d'acylation, engendrant la perte de groupes aminés disponibles pour la protonation, au pH physiologique (pH=7,4).

Les auteurs ont montré par migration sur gel retard que le gel bPEI-Ac/PEG complexe totalement l'ADN pour un ratio vecteur/ADN de 5/0,5 (w/w), quelle que soit la longueur de la chaîne acétyle, alors que la bPEI complexe l'ADN à partir du ratio bPEI/ADN de 0,15/0,5 (w/w). La nécessité d'une grande quantité de vecteur chimique est expliquée à nouveau par une diminution d'unités cationiques par macromolécule, et l'interaction entre la bPEI-ac et le PEG di phosphate.

Les auteurs démontrent que la longueur des chaînes acétyles utilisées (acétyle, propionique et butyrique) n'a pas d'influence sur la taille des polyplexes bPEI-Ac-PEG/ADN, évaluée à environ 100 nm, en milieu aqueux. En comparaison, les complexes bPEI/ADN¹⁶⁶ sont plus volumineux. La formulation des polyplexes dans un sérum ne change pas la taille des particules.

La présence des chaînes acétyles entraîne une diminution du potentiel zêta du polymère, qui reste positif lors d'une formulation avec un plasmide.

Nimesh *et al.* ont montré que la transfection *in vitro* du polyplexe bPEI-Ac-PEG/ADN est 5 à 12 fois plus importante que celle du complexe bPEI-Ac/ADN.

D'après le test de cytotoxicité MTT, le réseau bPEI-Ac-PEG est peu toxique. La concentration tolérée par les cellules de ce vecteur est de 187 µg/ml, plus élevée que celle des bPEI-Ac de Forrest (25µg/ml). Le PEG permet aussi de diminuer la toxicité du vecteur.

L'idée d'interaction physique entre la bPE-Ac et le PEG est intéressante car elle diminue le diamètre des particules, et la toxicité du vecteur.

III-2. 3. 5. 2. 5 – Les PEIs-alkylée-carboxyle

L'équipe d'Okuee a modifié la bPEI (10000 g.mol⁻¹ et 25000 g.mol⁻¹)^{167, 168} par un composé carboxylique (figure 1-28), afin de créer un nouveau vecteur dans l'objectif de transférer les neuroblastomes (Neuro2A), par des siARN (small interfering ARN). Bien que les siARN soit des macromolécules sensiblement différentes des plasmides, qui nous intéressent dans ce travail, il est possible de tirer de cette étude des renseignements pertinents pour le transfert de gène.

Le greffage de l'acide 1-bromoacétique sur la bPEI est effectué par la réaction d'alkylation entraînant une disparition d'une fraction de fonctions amine primaire et secondaire au profit de fonctions amines secondaires et tertiaires. Cela réduit l'efficacité tampon du polymère initial. Les auteurs proposent que l'augmentation du taux de greffage réduise le pouvoir tampon du polymère initial tout en permettant une augmentation de la solubilité des complexes bPEI-carboxylate/siARN.

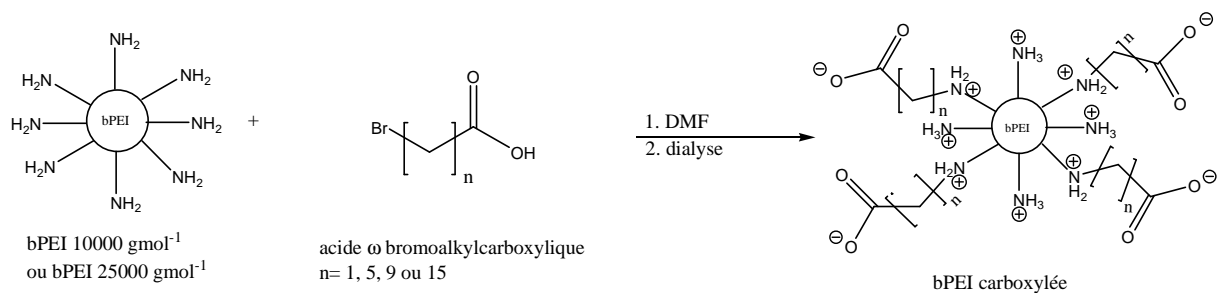


Figure 1-28 : réaction d'alkylation de la bPEI^{167, 168}

Les polymères faiblement carboxylés (6-8 %) ^{167, 168} complexent les siARN à un ratio polymère cationique/siARN de 6/1 (w/w) pour la bPEI 10000 g.mol⁻¹ carboxylate et de 2/1 pour la bPEI 25000 g.mol⁻¹ carboxylate. A pH physiologique, ce polymère possède une fraction de charges négatives équivalente au taux de greffage en unités alkylcarboxylate. Ceci entraîne une diminution du pouvoir complexant de ce polymère vis à vis des siARN dans un tampon HEPES 20 mM. Le rapport massique nécessaire à la complexation totale de siARN est donc bien supérieur à celui nécessaire dans le cas d'utilisation de bPEI de même masse molaire, et dans les mêmes conditions. Les bPEI possédant un fort taux de fonctions carboxylate par macromolécule ne complexent pas les siARN.

La taille des polyplexes formés avec les bPEI carboxylate est de 30 nm (bPEI 25000 g.mol⁻¹ 6% carboxylate) et de 195 nm (bPEI 10000 g.mol⁻¹ 8% carboxylate) pour un ratio vecteur/ADN w/w=2/1 dans un tampon HBG, pH=7,2 ; contenant 20mM d'HEPES et 5% de glucose. Les bPEI faiblement modifiées possèdent un potentiel zêta positif à pH=7,4, et complexent efficacement le polyanion. Globalement, nous pouvons imaginer qu'un faible taux de substitution des fonctions éthylène imine par les unités carboxylate induit des interactions électrostatiques attractives intramoléculaires, pouvant induire un phénomène de condensation du vecteur chimique. Les unités cationiques restantes participent à la formation de polyplexe avec l'ADN plasmidique. Pour un taux de substitution en fonctions carboxylate supérieur à 50%, alors le potentiel zêta du polymère devient négatif, empêchant toute interaction attractive avec l'ADN.

Oskue *et al.* réalisent des tests *in vitro* sur des cellules du neuroblastome de souris (Neuro2A), cultivées dans un milieu Dulbecco/Vogt modifié par un minimum essentiel d'Eagle (DMEM). Les polyplexes sont préparés dans le tampon HBG, pour des ratios entre w/w= 2/1 et 8/1. Quelque soit le ratio, les bPEIs carboxylées (bPEI 1000 g.mol⁻¹ et 25000 g.mol⁻¹) ^{167, 168} (figure 1-29) transfectent autant les cellules Neuro2A que la bPEI 25000 g.mol⁻¹. Les auteurs remarquent une diminution de la toxicité des polyplexes bPEI-carboxylate/ADN avec l'augmentation du taux de greffage de la PEI et suggèrent que cette diminution est corrélée à la présence des fonctions carboxylate sur le polymère.

Les auteurs montrent que la bPEI-carboxylate n'apporte aucun avantage sur la transfection. Cependant, ils sont moins toxiques que les bPEI non modifiées, ce qui ouvre la voie à de nouveaux polymères cationiques, peu toxiques.

Une modification ultérieure de la bPEI-carboxylate par des oligoamines (spermine, spermidine...)¹⁶⁹ a été conduite par amidation de façon à apporter des amines primaires supplémentaires et éliminer une fraction de charges négatives apportées par les fonctions carboxylate (figure 1-29). La présence des oligoamines augmente à nouveau la capacité tampon du polymère, grâce aux amines primaires des résidus greffés, et leur pouvoir tampon se rapproche de celui de la bPEI 10000 g.mol⁻¹.

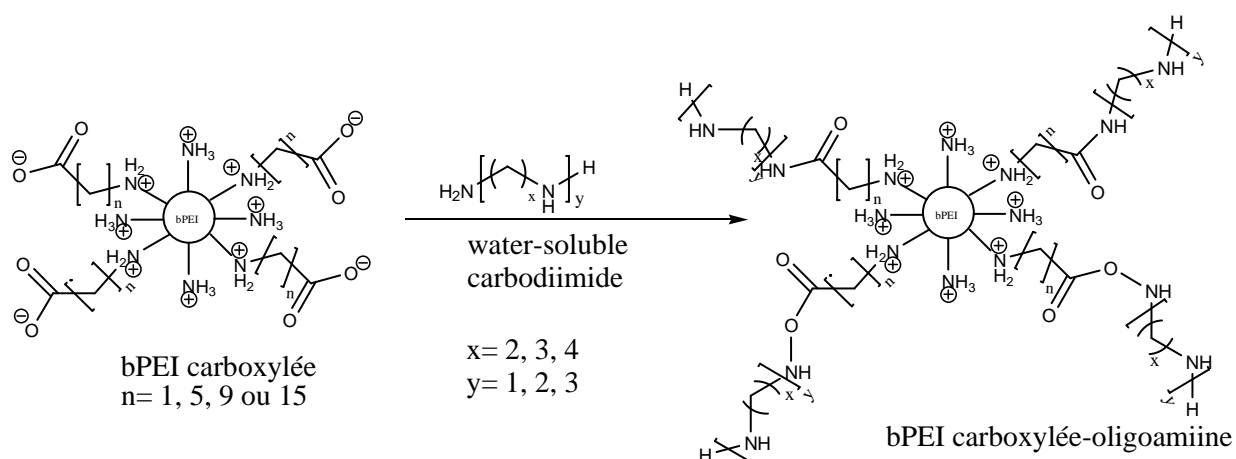


Figure 3-29 : synthèse de la bPEI carboxylate oligoaminée par réaction d'amidation

Le greffage d'une fraction d'amines primaires sur les bPEI-carboxylate-oligoamines¹⁶⁹, améliore la complexation du SiARN (ratio vecteur/SiARN (w/w=4/1), se rapprochant de celui de la bPEI non modifiée, selon le degré de substitution des fonctions carboxylates. L'étude de la taille des complexes bPEI-carboxylate-oligoamine, réalisée dans un tampon HBG, pH=7,2, contenant 20mM d'HEPES et 5% de glucose, montre qu'au ratio w/w=6/1, le diamètre de ces polyplexes (57-97 nm) est inférieur à celui des complexes de bPEI 10000 g.mol⁻¹ carboxylate (195 nm).

L'étude du potentiel zêta de ce nouveau polymère bPEI-carboxylate-oligoamine (75% en oligoamine, quelque soit le taux de modification de carboxylate sur la bPEI), montre que la b-PEI-carboxylate-oligoamine possède des valeurs sensiblement identiques à la bPEI 10000 g.mol⁻¹, et donc plus élevées que la bPEI-carboxylate. L'augmentation du potentiel s'explique par la diminution des fonctions carboxylate qui neutralise les charges positives des amines.

Dehshahri *et al.* réalisent des tests *in vitro* sur des cellules Neuro2A, cultivées dans un milieu DMEM. Les polyplexes sont préparés dans le tampon HBG, à différents ratios w/w. Les auteurs remarquent que la bPEI-oligoamine¹⁶⁹ donne les meilleurs résultats de transfection pour le ratio polymère/siARN de 6/1. Cependant,

ils observent aussi une nouvelle augmentation de la cytotoxicité ; et suggèrent que la diminution des fonctions carboxylate, provenant du greffage des oligoamines, en est la raison.

Cette étude montre que la conception d'un nouveau vecteur pour le transfert de gène résulte d'un équilibre fin entre les fonctions amine protonées à pH 7,4 impliquées dans l'interaction et la condensation de l'ADN, fonctions amines permettant de générer un pouvoir tampon important pour le relargage de l'ADN dans le cytosol, et enfin les fonctions anioniques telles que les fonctions carboxylate, outil de stabilisation des polyplexes dans le sérum physiologique, et apparemment facteur de diminution de toxicité.

III-2. 3. 5. 2. 6 – Les PEIs-sucres

La délivrance des gènes est limitée principalement par un manque de vecteurs susceptible de cibler l'ADN médicament vers des organes bien définis. Depuis quelques années, il est apparu des vecteurs pouvant cibler des cellules spécifiques. La littérature rapporte un certain nombre d'exemples utilisant des sucres comme ligands de récepteurs membranaires cellulaires. Le paragraphe suivant traitera des propriétés qu'apporte le greffage de glycosides aux bPEIs, en termes de ciblage, de transfection et de cytotoxicité.

III-2. 3. 5. 2. 6. 1 – Greffage de sucres sur la PEI

Zanta *et al.*¹⁷⁰ ont modifié la bPEI 25000 g.mol⁻¹ par 5% de galactose, afin de cibler les récepteurs ASGPR. Il a modifié la bPEI par du galactose en utilisant une réaction d'amidation réductrice. La présence du galactose sur la bPEI défavorise la complexation du vecteur avec le plasmide (une complexation totale de l'ADN est obtenue pour des ratios N/P=3/1 au lieu de N/P=2 pour la bPEI initiale), et entraîne la formation de particules de taille polydisperse, entre 100 et 400 nm. Pour des ratios vecteur/ADN de N/P inférieur à 5/1, la bPEI-galactose 5% transfecte aussi bien, voire mieux que la bPEI, les cellules embryonnaires de foie de souris (BNL CL2) et HepG2. Au delà du ratio N/P=5/1, l'activité de transfection diminue et devient identique à celle de la bPEI.

Kunath¹³⁵ a modifié la bPEI par le lactose en variant les taux de greffage pour obtenir un polymère qu'il nomme la bPEI-galactose (bPEI-gal ou GP) par une réaction d'amidation réductrice (figure 1-30). Le taux de modification maximal du polymère est de 31% de fonctions amine, ce qui correspond aux amines primaires de la bPEI 25000 g.mol⁻¹.

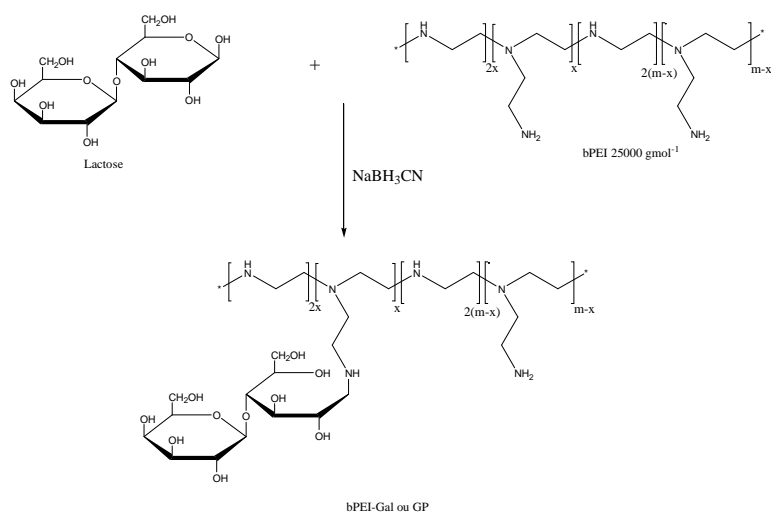


Figure 1-30 : Synthèse de la bPEI-galactose

La substitution de la bPEI par du galactose¹³⁵ (figure 1-30) influence la complexation de l'ADN. Selon le degré de substitution des bPEIs, 3,5%, 9,7% et 31%, le gel retard montre que l'ADN est totalement complexé par les vecteurs pour des ratios N/P= 2,2 (bPEI-gal 3,5%), et N/P=2,6 (bPEI-gal 9,7% et 31%) ; Les diamètres des particules au ratio N/P=6,7/1, dépendant du degré de substitution de la bPEI-gal, sont respectivement de 487 nm, 468 nm et 652 nm pour les complexes formés avec les bPEI-gal 3,5%, 9,7% et 31%. Ces tailles, déterminées dans une solution aqueuse NaCl 150 mM, pH=7,4, sont bien supérieures aux tailles des polyplexes de bPEI/ADN (156 nm).

Les tests de transfection *in vitro* sur les cellules HepG2, de polyplexes à base de bPEI-gal, formulés dans 10 mM de sérum de boeuf fœtal, montrent que le transfert de gènes est moins élevé (inférieur de 20 à 24%) que pour la bPEI 25000 g.mol⁻¹.

Kunath *et al.* démontrent par l'analyse de la déshydrogénase de lactate (LDH) et le test de cytotoxicité MTT que la cytotoxicité des polymères, réalisée sur des fibroblastes de souris, dépend du degré de substitution de la bPEI. A une concentration donnée (0,05 mg/ml) et au bout de 24h, la bPEI-gal 31%¹³⁵ est moins toxique (80% de cellules viables) que la bPEI et les bPEI-gal 3,5% (0% de cellules viables). Ces auteurs attribuent la diminution de la cytotoxicité à la présence des résidus galactosylé, fixés sur les amines primaires.

Bettinger *et al.*¹⁴¹ modifie la bPEI 25000 g.mol⁻¹ par un tétraglucide pour stabiliser les complexes et permettre à celui-ci de transfecter les hépatocytes à l'aide de récepteurs ASGPR. La synthèse est réalisée par la même méthode (figure 1-30) que Zanta¹⁷⁰ et Kunath¹³⁵.

Les polyplexes sont construits en solution aqueuse 150 mM NaCl à un ratio N/P de 5, permettant l'obtention de nanoparticules de diamètre entre 50 et 80 nm. Le potentiel zêta de ces particules est compris entre 0 et 10mV, bien inférieur à celui de la bPEI ($\zeta=15\text{mV}$). Cette observation est un argument quant à la présence des tétragalactoses en périphérie des nanoparticules ainsi formées. Les tests de transfection *in vitro*

des polyplexes IPEI-tétragalactose/ADN montrent un transfert de gène efficace pour les cellules BNL CL2 et HepG2 possédant des récepteurs au galactose, ASGPR.

III-2. 3. 5. 2. 6. 2 – Polymérisation de la PEI sur les sucres

L'équipe de Wong²² a amorcé la polymérisation de l'aziridine par le chitosane de façon à obtenir des chaînes pendantes de PEI branchée possédant des masses molaires de 200 ou 7400 g.mol⁻¹ (figure 1-31). L'objectif est l'obtention d'un polymère biocompatible et biodégradable possédant les propriétés de la bPEI et celles du chitosane.

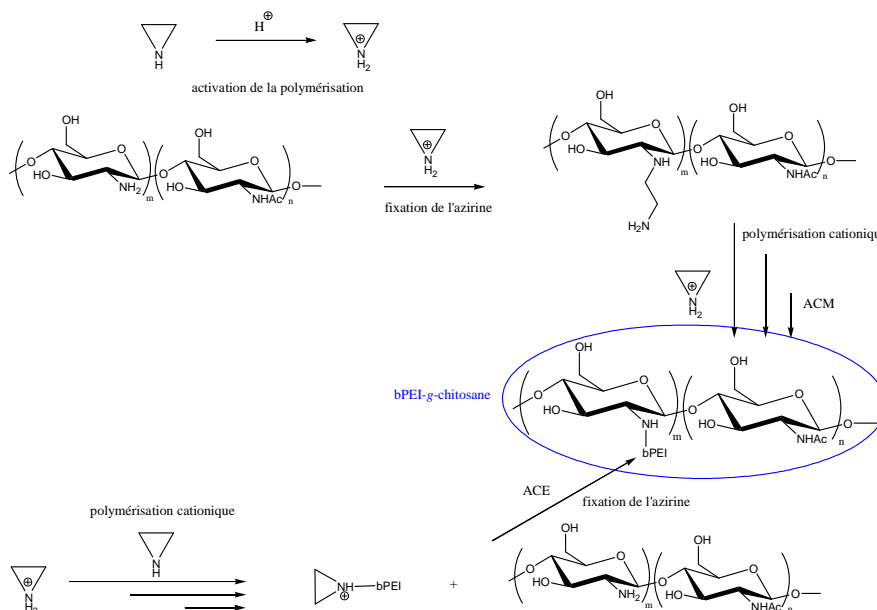


Figure 1-31 : Synthèse de la bPEI-g-chitosane

La bPEI (7400 g.mol⁻¹)-g-chitosane²² retarde complètement l'ADN à un ratio N/P identique à celui de la bPEI 25000 g.mol⁻¹ (N/P=2,5/1), probablement dû à la configuration allongée de la bPEI-g-chitosane linéaire.

Pour un ratio N/P de 10/1, les polyplexes bPEI-chitosane/ADN, formulé dans une solution aqueuse, possède de larges diamètres de particule (182-405 nm), supérieur à celui communément admis pour des expériences de transfert de gène. L'étude du potentiel zêta montre que le polyplexe est faiblement positif (2 mV) au ratio N/P=10/1. Ce potentiel augmente avec les ratios N/P mais ne dépasse pas les 10 mV (N/P=10/1).

Les tests de transfection conduits *in vitro* sur les cellules cancéreuses d'utérus humain (HeLa), cultivées dans un milieu DMEM, ont été effectués. Les complexes bPEI-g-chitosane/ADN (N/P=40/1), formulés dans 10mM de sérum de bœuf fœtal, conduisent à des niveaux de transfert de gène de 6.10⁹ RLU/mg de protéines,

supérieurs à ceux obtenus pour la bPEI 25000 g.mol⁻¹. Des expériences concluantes de transfection assistées par la bPEI-g-chitosane ont aussi été obtenues sur HepG2 (1.10⁹ RLU/mg de protéines).

Le test de cytotoxicité IC50 de la PEI-g-chitosane a été conduit sur les cellules HeLa et une concentration de 97,3 µg/ml de polymère permet encore un ratio de 50% de cellules viables, alors que ce taux n'est conservé que pour 13,7 µg/ml dans le cas de la bPEI 25000 g.mol⁻¹.

Ces auteurs ont fait l'hypothèse que le chitosane confère au polymère une nature biodégradable, qui n'a pas été démontrée, mais ce point pourrait être à l'origine de la faible toxicité de ce polymère. Bien que délicate, la stratégie de "grafting from" présente l'avantage d'une large variation de la masse molaire des bPEI sur les chaînes de polysaccharide.

III-2. 3. 5. 2. 7 – Les PEIs-sucres modifiées

III-2. 3. 5. 2. 7. 1 – La bPEI galactose poly(vinyl pyrrolidone)

L'équipe de Cook¹⁷¹ a fixé le poly(vinylpyrrolidone) sur la bPEI-galactose. L'utilisation du poly(vinylpyrrolidone) est intéressante car ce polymère possède les propriétés de stabilisation stérique du poly(éthylène glycol), et possède une durée de vie plus longue dans le sang que le PEG^{172, 173}. Afin de conférer à ce polymère un caractère de ciblage, ces auteurs ont aussi greffé le galactose sur la chaîne. La bPEI-gal (figure 1-32) est synthétisée par une réaction d'amination réductrice entre la bPEI et le galactose, puis le poly(vinyl pyrrolidone) monocarboxylique est greffé, par une réaction ultérieure d'amidation entre l'acide carboxylique du greffon et l'anime de la bPEI-gal. Cook synthétise trois polymères bPEI-Gal-PVP (ou GPPx) en modifiant le taux de modification en PVP de 4% (GPP4), 6% (GPP6) et 7,5% (GPP7,5).

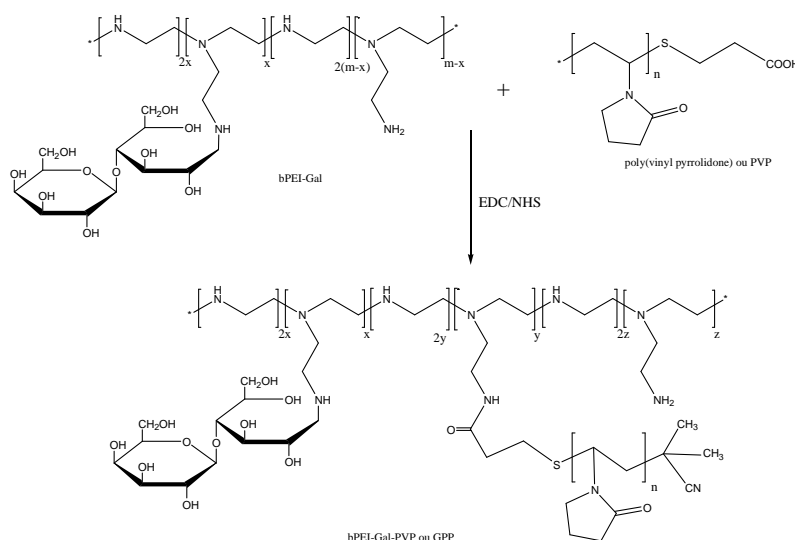


Figure 1-32 : Synthèse de la bPEI-Gal-PVP ou GPP ($x=29$, $y=44$, $z=121$)

La formation des complexes GPPx/ADN est réalisée dans le tampon phosphate salin BPS 10 mM (pH=7,4, 150mM NaCl). L'expérience sur gel retard informe que les trois polymères possèdent une force d'interaction vecteur/ADN plus faible que la bPEI, en retardant l'ADN à partir d'un ratio de charge de 5.

Les auteurs mesurent les tailles des polyplexes GPPx/ADN dans une solution aqueuse, pH=7,4 et observe leur diminution avec l'augmentation de proportion de charge (N/P=40/1) et une diminution de contenu de PVP dans le copolymère (pour GPP4). Dans le tampon BPS à pH=7,2, au ratio N/P=40/1, les auteurs montrent une augmentation de taille (de 100 nm (GPP4) à 150 nm (GPP7,5)) par rapport à la solution aqueuse (60nm (GPP4) à 100 nm (GPP7,5)). Les tailles mesurées par Cook *et al.* sont plus petites que celles pour le complexe bPEI/ADN (260nm).

L'association du PVP sur la IPEI fait diminuer le potentiel zêta des particules de 30 mV pour la bPEI à environ 20 pour les GPPx ; ce qui peut s'expliquer par la présence d'une partie des chaînes PVP à l'extérieur du polyplexe.

Les études de transfection *in vitro* sont réalisées sur des cellules HepG2 et HeLa cultivées dans le milieu DMEM. Pour un ratio N/P= 40/1, seuls les complexes GPP4/ADN (formulés dans 10 mM de sérum de bœuf fœtal) permettent des résultats supérieurs à ceux mesurés dans le cas de la bPEI 25000 g.mol⁻¹ sur les cellules HepG2 (8.10⁹ RLU/mg de protéines pour la GPP4 et 1.10⁹ RLU/mg de protéines pour la bPEI). Les résultats de transfection de GPP4/ADN et bPEI sont équivalents sur les cellules HeLa.

Les auteurs réalisent des tests de viabilité sur les cellules HepG2 et HeLa, au bout de 24 heures. Pour une concentration donnée (200µg/mL), pour les cellules HepG2, la GPP4 est plus toxique (60% de cellules viables) que les GPP6 et GPP7,5 (100% de cellules viables)¹⁷⁰. Cook *et al.* ont remarqué que la GPP4 est beaucoup plus toxique pour les cellules HeLa (à partir de 50µg/ml) que pour les cellules HepG2. Ils remarquent que la cytotoxicité des complexes est influencée par le taux de modification en poly(vinyl pyrrolidone).

La présence de la poly(vinylpyrrolidone) permet de diminuer considérablement la cytotoxicité du vecteur (à partir de 6% de substitution en PVP) et apporte aussi des résultats satisfaisants en transfert de gène, par rapport à la bPEI.

III-2. 3. 5. 2. 7. 2 – Le bPEI-chitosane-PEG

L'équipe de Jiang¹⁷⁴ a greffé la bPEI-chitosane (CHI-g-bPEI 25000 g.mol⁻¹) par un poly(éthylène glycol) galactosylé (Gal-PEG) terminal, téléchélique pour transfecter spécifiquement les cellules hépatocytes (figure 1-33), grâce à la présence du galactose. Les auteurs utilisent aussi le PEG pour améliorer la solubilité de complexes¹⁵¹ et ralentir l'apparition d'agrégation des complexes dans du sérum physiologique¹⁷⁵. L'utilisation d'un PEG téléchélique hétérofonctionnel laisse présager de l'obtention d'une structure originale concentrique. Les auteurs greffent dans un premier temps le PEG sur du galactose, à l'aide d'une réaction

d'amidification entre l'amine du PEG et la fonction carboxylate, activée par le NHS (N-hydroxysuccinimide) du galactose. Une réaction ultérieure d'amidation a permis de greffer ce composé sur les amines de la CHI-g-bPEI. Les analyses RMN ^1H de la Gal-PEG-CHI-g-bPEI ont mis en évidence un taux de modification, en groupements galactose de 14 mol%.

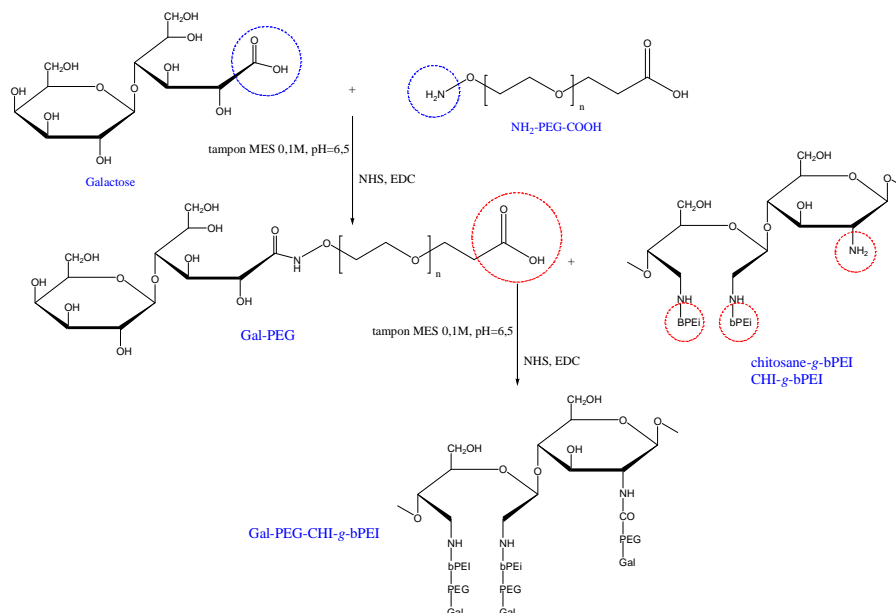


Figure 1-33 : synthèse de la Gal-PEG-CHI-g-bPEI ($Mn_{\text{chitosane}}=100000 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{\text{bPEI}}=25000 \text{ g.mol}^{-1}$, $Mn_{\text{PEG}}=5000 \text{ g.mol}^{-1}$), 14,2% mol de galactose est greffé à la CHI-g-bPEI

Les tests d'électrophorèse sur gel retard montrent que la présence du PEG sur la Gal-PEG-CHI-g-bPEI¹⁷⁴ entraîne une plus forte complexation de l'ADN (N/P=1/1) que dans le cas des bPEI-gal (N/P=2,2) et bPEI-g-chitosane ((N/P=2,5/1).

L'étude de la taille des polyplexes Gal-PEG-CHI-g-bPEI par DLS (80 nm), pour un ratio N/P=14, confirme les petites tailles des particules observées par EF-TEM. Les auteurs remarquent que cette taille tend à diminuer avec l'augmentation du ratio N/P (60 nm pour N/P=21)¹⁷⁴. Entre les ratios N/P = 7 et 21, la valeur du potentiel zêta est d'environ 20 mV, plus faible que celui de polyplexes à base de bPEI (30 mV). Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que Wong *et al.* ont mesuré des valeurs de potentiel zêta de 6 mV pour la CHI-g-bPEI (ratio N/P=20/1)²². Donc, la présence du Gal-PEG sur ce nouveau vecteur favorise l'apparition de charges positives à la surface des polyplexes Gal-PEG-CHI-g-bPEI/plasmide. Il semblerait que le Gal-PEG soit confiné dans le polyplexe, phénomène déjà observé dans les travaux de Brissault¹⁵⁷ *et al.* et Nimesh¹⁶⁶ *et al.*

Les tests de transfection sur les cellules HepG2 ont montré que le maximum de transfection, obtenu pour la Gal-PEG-CHI-g-bPEI est de $1,5 \cdot 10^5$ RLU/mg de protéine pour le ratio N/P=14/1, ce qui est identique à ceux de la bPEI ($2 \cdot 10^5$ RLU/mg de protéine). Ce polymère ne semble pas apporter de réelle avancée, comparé aux polyplexes CHI-g-bPEI/ADN (Transfection : $3 \cdot 10^8$ RLU/ mg de protéine, pour N/P=10). Ces résultats

décevants peuvent s'expliquer par la structure du polyplexe. Toutefois, les auteurs montrent que l'activité relative de la luciférase des cellules HepG2 (activité relative en luciférase : 25) est bien supérieure (5 fois) à celle des cellules HeLa (activité relative en luciférase : 5). Cette observation montre l'activité de la fonction de ciblage du galactose, comme déjà rapporté¹⁴¹.

L'équipe de Jiang a déterminé la cytotoxicité de Gal-PEG-CHI-g-bPEI par un test Elisa, en détectant l'absorbance de l'activité métabolique des cellules, à 570 nm. Les auteurs ont montré qu'à une concentration de 100 µg/mL en Gal-PEG-CHI-g-bPEI ou en polyplexes Gal-PEU-CHI-g-bPEI/ADN (N/P=21/1), 100% des cellules HepG2 sont viables, alors qu'il ne reste que 70% de cellules viables pour la CHI-g-bPEI et 40% pour le bPEI 25000 g.mol⁻¹. Les tests de cytotoxicité sur les cellules HeLa confirment cette tendance. La présence du Gal-PEG diminue la cytotoxicité du CHI-g-PEI.

La conception concentrique du polymère permet effectivement d'obtenir un vecteur possédant une large quantité de fonctions de ciblage disponible, tout en maintenant les qualités de stabilisation stérique du PEG.

III-2. 3. 5. 2. 8 – Les PEIs-lipides

Kim *et al.*¹⁷⁶ ont modifié la bPEI 2000 g.mol⁻¹ par des lipides (figure 1-34). Ces auteurs prévoient d'utiliser les propriétés d'insertion des lipides dans une bicouche lipidique pour faciliter l'internalisation des polyplexes dans les cellules. Les lipides utilisés sont :

- le cholestérol. Il est greffé sur la bPEI à l'aide d'une réaction d'addition élimination entre le chloroformiate de cholesteryl et les amines de la bPEI (2000 et 25000 g.mol⁻¹). A la fin de la synthèse, la caractérisation du produit montre un groupement cholestérol pour 17 unités éthylènimines.

- l'éthyle myristate. Présent dans le corps humain sous forme d'acide gras (l'acide tétradécanoïque ou acide miristique), il est localisé dans les bicouches lipidiques, comme le cholestérol. Il peut aussi interagir, de façon covalente, avec des protéines. L'éthyle de myristate est greffé à la bPEI par une réaction d'amidation.

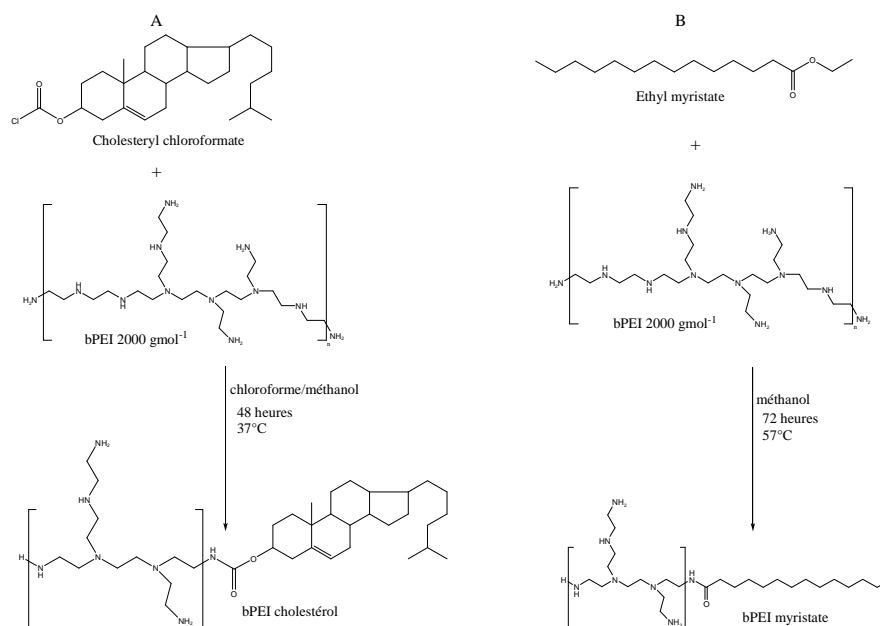


Figure 1-34 : synthèse de la bPEI cholestérol et de la bPEI myristate

La formation des complexes bPEI-cholestérol/ADN et bPEI-myristate/ADN¹⁷⁶ est réalisée dans le tampon HEPES (pH=7,4), puis analysée par expérience de gel retard. La complexation totale de l'ADN est obtenue au ratio N/P=1/1, pour la bPEI-cholestérol et N/P=0,5/1 pour la bPEI-myristate. La chaîne linéaire du groupement myristate semble plus favorable pour la complexation de l'ADN que le cholestérol.

L'équipe de Kim a réalisé des tests *in vitro* sur des cellules embryonnaires de rein humaines 293T, cultivées en DMEM. Les complexes bPEI-cholestérol/ADN et bPEI-myristate/ADN sont formulés dans 10mM de sérum de bœuf foetal. Le transfert de gènes dans les cellules 293T est déterminé par le test utilisant la β -galactosidase. Les complexes formés par la bPEI-cholestérol (activité de la β -galactosidase : 2500 milliunités (mU)/mg de protéine) et la PEI-myristate (500 mU/mg de protéine) transfectent mieux les cellules 293T que la bPEI 2000 g.mol⁻¹ (0 mU/mg de protéine), démontrant ainsi l'intérêt de l'ancrage lipidique suggéré initialement.

Malheureusement, ces polymères sont beaucoup plus toxiques que la bPEI. L'idée d'utiliser des chaînes myristyles et du cholestérol pour transfecter *in vitro* les cellules est certes intéressante, mais nécessite des améliorations en termes de toxicité.

III-2. 3. 5. 2. 9 – Les PEIs-polycaprolactones (PEI-PCL)

L'équipe de Arote¹⁷⁷ a modifié des bPEIs de faible masse molaire (600 g.mol⁻¹ (bPEI-0,6), 1200 g.mol⁻¹ (bPEI-1,2) et 1800 g.mol⁻¹ (bPEI1,8)) par l' α,ω -divinyl-poly(caprolactone). La poly(caprolactone) (PCL), étant hydrophobe, possède une cinétique de dégradation plus lente que certains polyesters

(poly(lactide)), et permet d'augmenter la demi-vie de circulation des complexes vecteur/ADN. Les auteurs ont greffé ce polymère à la bPEI par une réaction de Michaël¹⁷⁸ entre les amines de la bPEI et les doubles liaisons du dérivé de la polycaprolactone (figure 1-35), diminuant l'effet tampon de la bPEI. L' α,ω -divinyle polycaprolactone étant di fonctionnelle, elle permet la création de ponts de réticulation entre deux molécules de bPEI, formant ainsi un réseau. Les auteurs ont constaté qu'un réseau apparaît quand le rapport entre la bPEI à PCL est approximativement 2.

Les auteurs indiquent seulement que les polymères bPEI-PCL étudiés possèdent environ 70% de bPEI par rapport à la poly(caprolactone) ; mais la caractérisation fine des structures formées n'a pas été conduite.

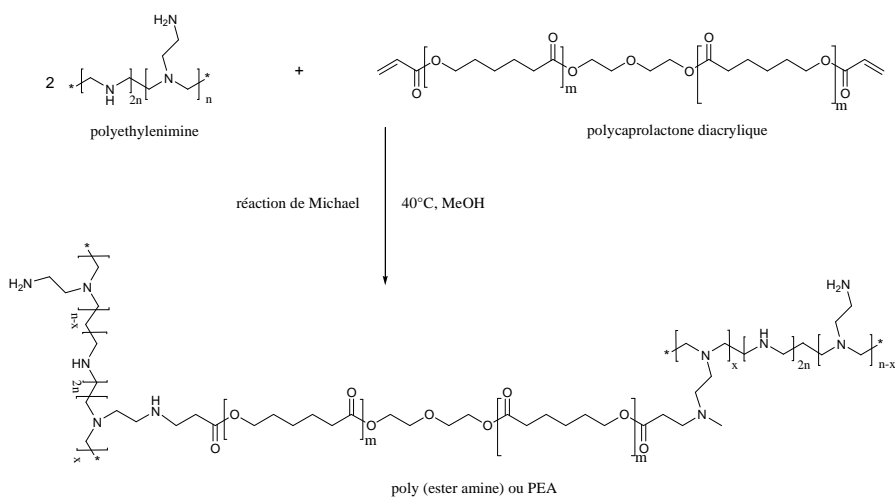


Figure 1-35 : synthèse de la PEI-co-polycaprolactone par réaction de Michaël

Les auteurs utilisent la méthode de l'électrophorèse sur gel d'agarose (ou gel retard) pour évaluer la complexation de l'ADN par les bPEI-co-polycaprolactone (bPEI-PCL). Les complexes bPEI-PCL /ADN sont formulés dans un tampon phosphate salin (PBS, pH=7,4). Quelque soit la masse molaire initiale de la bPEI (0,6kDa, 1,2kDa ou 1,8kDa), les vecteurs possèdent une grande capacité de complexation de l'ADN. Les bPEI-PCL complexent totalement l'ADN pour les ratios N/P=3 (bPEI 1,2kDa-PCL et bPEI 1,8kDa-PCL) et N/P=5 (bPEI 0,6kda-PCL). Cependant, Arote *et al.* ne comparent pas ces résultats avec les complexes bPEI 25kDa/ADN formulés dans le tampon PBS.

Les auteurs remarquent qu'au ratio N/P=5, le diamètre hydrodynamique des nanoparticules mesuré par diffusion de la lumière est compris entre 120 et 180 nm pour les bPEI 1,2kDa-PCL et bPEI 1,8kDa. La diminution de la masse molaire de la bPEI (0,6kDa) initiale conduit à des diamètres hydrodynamiques de polyplexes de 400nm. Cette étude est toutefois à mettre en relation avec une possible existence de nanoparticules de bPEI-PCL initiale, pouvant alors intervenir sur le diamètre des polyplexes finaux. N'ayant

pas déterminé la taille du gel initial, nous pouvons faire l'hypothèse que la taille du gel a peu d'influence sur le diamètre du polyplexe. Pour tous les polyplexes de cette étude, le potentiel zêta mesuré est positif.

Les tests de transfection *in vitro* sur des cellules 293T montrent qu'au ratio N/P=5, la bPEI 0,6kDa-PCL possède un niveau d'expression de gène inférieur (exemple : 1.10^6 RUL/mg de protéine) à celui des autres complexes bPEI 25kDa, bPEI 1,2kDa-PCL/ADN et bPEI 1,8kDa-PCL/ADN (8.10^7 RLU/mg de protéine (bPEI) et 5.10^8 RLU/mg de protéine (bPEI 1,2kDa-PCL et bPEI 1,8kDa-PCL)). Le même phénomène se produit pour les cellules HeLa et 293T. Cette baisse d'activité est probablement due à la faible masse molaire de la bPEI. Les auteurs concluent aussi que l'utilisation d'une bPEI de plus haute masse molaire permettrait une meilleure efficacité de transfection.

Le test de cytotoxicité MTT¹⁷⁷ conduit sur les lignées HepG2 et HeLa avec des polyplexes de N/P=30, révèle une très faible toxicité puisque 100% de cellules sont viables avec ce nouveau polymère, et seulement 40% avec la bPEI 25kDa dans les mêmes conditions.

L'utilisation d'un réseau de PCL/bPEI permet de diminuer la cytotoxicité du vecteur et apporte aussi des résultats satisfaisants en transfert de gène, par rapport à la bPEI.

Shuai *et al.*¹⁷⁹ ont modifié des bPEIs 800, 2000 et 25000 $g.mol^{-1}$ avec un copolymère de poly(caprolactone) et de poly(éthylène glycol) (PCL-*b*-PEG). Le PEG permet de rendre furtif les complexes vecteur/ADN, et la présence de poly(caprolactone) permet d'augmenter le temps de demi-vie de circulation du complexe. Le bloc bPEI du vecteur permet la formation de complexe avec l'ADN et agit sur la libération de l'ADN dans le cytosol par le mécanisme d'éponge à protons. Le copolymère PEG-*b*-PCL est obtenu par une réaction d'estérification par ouverture de cycles de la caprolactone. Ultérieurement, ce copolymère, activé par le NHS est greffé à la bPEI selon un couplage amine/ acide carboxylique activé (figure 1-36).

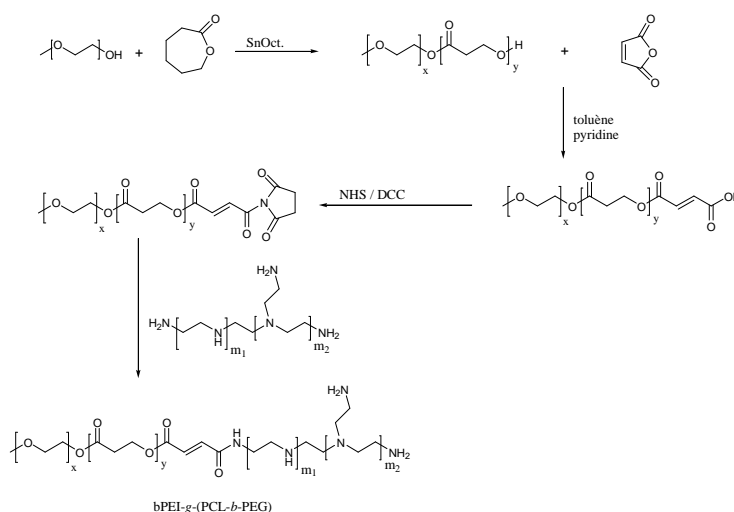


Figure 1-36 : synthèse de la poly(éthylèneimine) branchée-g-(polycaprolactone-*b*-poly(éthylène glycol)) (bPEI-(PCL-*b*-PEG), masse molaire utilisée : $Mn_{PEG}=5000 g.mol^{-1}$, $Mn_{polycaprolacton}=1800, 3800 \text{ et } 5500 g.mol^{-1}$, $Mn_{bPEI}=800, 2000 \text{ et } 25000 g.mol^{-1}$ ¹⁷⁹.

Shuai *et al.*¹⁷⁹ ont remarqué que les polymères bPEI-(PCL-*b*-PEG) forment des micelles dans une solution aqueuse, pour les cas spécifiques de bPEI 0,8kDa et 25kDa et les blocs de PCL de 1,2kDa et 2 kDa (répertorié dans le tableau 1-1). Les auteurs suggèrent que la présence de courtes chaînes de PCL empêche une bonne solubilisation du copolymère (bPEI-(PCL-*b*-PEG). Avec l'utilisation d'une polycaprolactone de 2kDa, la taille des polymères est beaucoup plus petite (77nm) que celle obtenue pour les polymères utilisant une polycaprolactone de 1,2kDa (tableau 1-1).

Tableau 1-1 : récapitulatif des cmc et des taille de trois polymères bPEI-(PCL-*b*-PEG) réalisée en solution aqueuse, et des tailles et du potentiel zêta des complexes bPEI-(PCL-*b*-PEG)/ADN formulés en solution aqueuse 150mM NaCl (pH=7) (N/P=7)¹⁷⁹

Composition des polymères	Copolymères		Complexes vecteur/ADN	
	Cmc (mmol/L)	Taille (nm)	Taille (nm)	Zêta (mV)
bPEI 0,8kDa	Non déterminé	Non déterminé	320	-16
bPEI 25kDa	Non déterminé	Non déterminé	160	20
bPEI 0,8kDa-(PCL 1,2kDa- <i>b</i> -PEG 2kDa)	2,07	126	190	-2
bPEI 25kDa-(PCL 1,2kDa- <i>b</i> -PEG 2kDa)	<0,012	253	200	-3
bPEI 25kDa-(PCL 2kDa- <i>b</i> -PEG 2kDa)	0,031	77	230	-3,5

L'équipe de Shuai ne présente pas d'expérience de gel retard qui permet de déterminer le ratio N/P de complexation entre l'ADN avec les bPEI-(PCL-*b*-PEG). Ils déterminent la taille des particules et leur potentiel zêta seulement pour trois complexes vecteur/ADN au ratio N/P=3, 7, et 20, formulés dans une solution aqueuse contenant 150 mM de NaCl ; mais ne donnent les résultats que pour le ratio N/P=7.

La taille des complexes micelle/ADN (N/P=7) varie entre 190 et 250 nm. Cette gamme de taille se situe entre la taille des complexes bPEI 0,8kDa/ADN (320 nm) et bPEI 25kDa/ADN. Les valeurs du potentiel zêta des particules sont faiblement négatives, ce qui peut s'expliquer par la présence d'ADN en surface du complexe.

Les tests de transfection *in vitro* par ces polymères sur des cellules 3T3, cultivées dans un tampon DMEM, sont déterminés par la méthode « BC Assay ». Les complexes bPEI-(PCL-*b*-PEG)/ADN sont formulés dans une solution saline (150mM NaCl). Par rapport à la bPEI 25000 gmol^{-1} , les bPEI25k(PCL1.2k-*g*-PEG5k)_{2,9} et bPEI25k(PCL2k-*g*-PEG2k)_{2,8} permettent une transfection efficace des cellules 3T3 pour un ratio N/P=20 (respectivement 0, 30 et 20 ng de luciférase/mg de protéine).

Les auteurs montrent, par les tests MTT, que ces vecteurs sont moins toxique (46% de cellules viable) que la bPEI (0%), pour le ratio N/P=20/1.

Les auteurs ont mis à profit la formation de complexes d'inclusion entre la cyclodextrine et le PCL-*b*-PEG pour permettre de moduler la solubilité du vecteur en milieu aqueux¹⁸⁰.

Pour obtenir un complexe d'inclusion, Shuai solubilise, à la concentration micellaire critique (cmc), la bPEI-(PCL-*b*-PEG) dans une solution aqueuse, qui devient trouble. Il dilue les micelles par addition successive

d' α -cyclodextrine (α CD). Il mesure la disparition des micelles par diffusion de la lumière statique. Ensuite, le taux d' α CD, utilisé pour détruire les micelles, est déterminé par RMN ^1H , et varie entre 27% et 40% selon les chaînes de bPEI utilisées (800 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et 25000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). La présence d' α CD sur le copolymère ne semble pas influencer sur le ratio de complexation N/P, car ces auteurs poursuivent l'étude des complexes bPEI-(PCL-*b*-PEG)- α CD/ADN aux ratios N/P=3, 7 et 20. Le diamètre des polyplexes (N/P=7) reste aux alentours de 200 nm et le potentiel zêta augmente vers la neutralité des complexes (-3,5 à 1,4 mV). Ces résultats sont étonnants. Ils suggèrent que la polycaprolactone-CD se situe à l'intérieur du complexe vecteur/ADN. La présence des CD sur ce polymère diminue les charges négatives du vecteur, expliquant que celui-ci devienne positif.

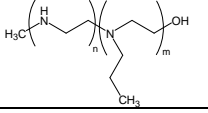
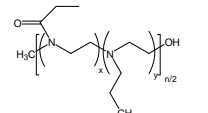
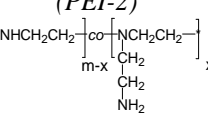
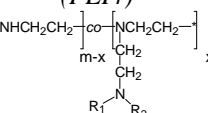
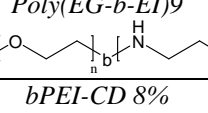
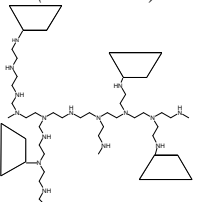
Les auteurs montrent que la présence d' α CD sur les PCL-*g*-PEG-bPEI augmente l'efficacité de transfection *in vitro* des cellules 3T3 (80 ng de luciférase/mg de protéines) par rapport à la bPEI25k(PCL2k-*g*-PEG2k)_{2.8} (30 ng de luciférase/ mg de protéine). Shuai *et al.* ont montré, par le test de cytotoxicité MTT, que ces structures originales permettent de diminuer drastiquement la toxicité cellulaire, qui est environ 100 fois plus faible que la toxicité engendrée par la PEI (25000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

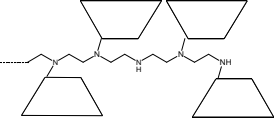
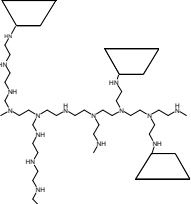
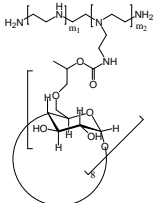
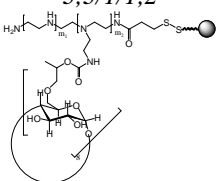
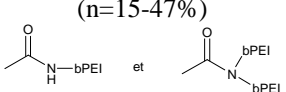
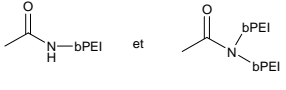
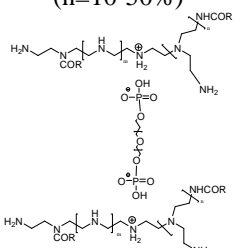
En conclusion, la formation des complexes d'inclusion entre l' α -CD et les chaînes de PCL du copolymère bPEI-(PCL-*b*-PEG) ont rendu le copolymère plus hydrophile, détruisant les micelles formées dans les solutions aqueuses. La présence des cyclodextrines a aussi permis à augmenter l'efficacité du transfert de gène, particulièrement pour les copolymères bPEI-(PCL-*b*-PEG) possédant une cmc.

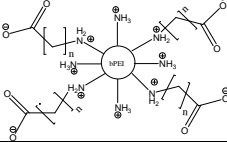
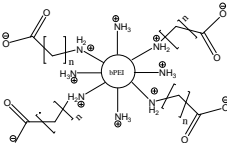
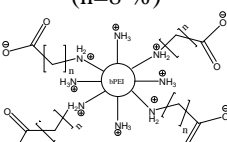
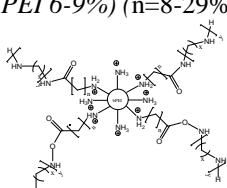
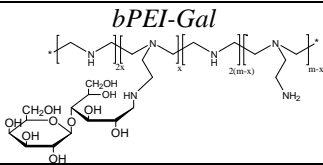
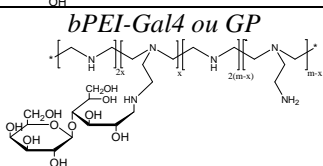
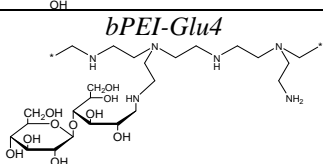
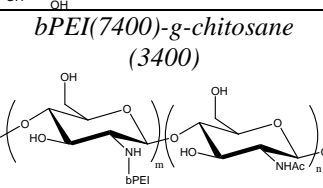
IV – Résumé des modifications des PEIs représentatives pour la transfection

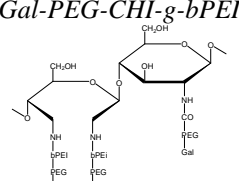
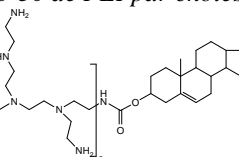
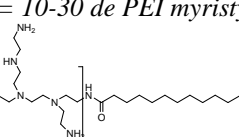
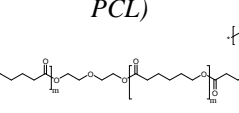
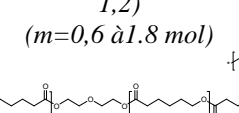
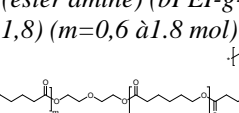
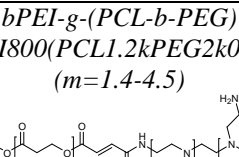
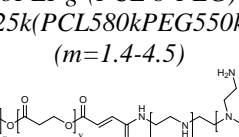
Le tableau 1-2 récapitule les modifications des PEI ainsi que leur efficacité de transfection selon les différents types de lignées cellulaires utilisées.

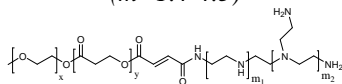
Tableau 1-2 : Récapitulatif exhaustif des modifications des PEIs et de leur efficacité de transfection, in vitro et in vivo

Molécules PEI modifiée	Type l ou b	Mn (PEI) (g.mol ⁻¹)	Ratio transfection polymère/A DN	RLU/ mg protéines (in vitro)	cellules	Viabilité (%)	RLU/ mg tissus (in vivo)	Ref
PEI	b	25000	Optimal ratio N/P	2 en efficacité relative de transfection	3T3	30%	-	Rémy et al. ¹⁴¹ , Fischer et al. ¹⁵¹
PEI	b	25000	N/P=2	1.10 ⁴ 3.10 ⁴ 2.10 ⁵ LU/mg de protéine	BNL CL2 HepG2 3T3	-	-	Zanta et al. ¹⁷⁰
PEI	b	25000	N/P=10/1	1.10 ⁹	HeLa	20% (50 µg/mL)	-	Wong et al. ²²
PEI	l	22000	Optimal ratio N/P	2 en efficacité relative de transfection	3T3	30%	-	Rémy et al. ¹⁴¹ , Fischer et al. ¹⁵¹
PEI	l	22000	(w/w)=3/1	1.10 ¹⁰ 8.10 ⁸	HEK293 HepG2	60% 85%	-	Brissault et al. ¹⁵⁷
<i>LP(EI₃₈₀-co-NPEI₁₂₀)</i> 	l	22000	N/P 30	3.10 ⁷	HepG2	-	-	Brissault et al. ^{136, 155}
<i>LNPEI</i> 	l	22000	N/P 30	5.10 ⁵	HepG2	-	-	Brissault et al. ^{136, 155}
<i>(PEI-2)</i> 	l+b	22000	N/P 30	5.10 ⁸	HepG2	N/P=19, 5 100%	Poumons 2.10 ⁶	Brissault et al. ^{155, 156}
<i>(PEI4)</i> 	l+b	22000	N/P 30	9.10 ⁸	HepG2	N/P=19, 5 100%	Poumons 1.10 ⁶	Brissault et al. ^{155, 156}
<i>Poly(EG-b-EI)9</i> 	l	22000	N/P 30	1.10 ⁹ 2.10 ⁸	HEK293 HepG2	80% 90%	-	Brissault et al. ^{155, 157}
<i>bPEI-CD 8%</i> <i>(n=5-16%)</i> 	b	25000	N/P 20	2.10 ⁷	PC3	50% (1,45m M) (IC50)	-	Pun et al. ¹⁶⁰

Molécules PEI modifiée	Type I ou b	Mn (PEI) (g.mol ⁻¹)	Ratio transfection polymère/A DN	RLU/ mg protéines (in vitro)	cellules	viabilité	RLU/ mg tissus (in vivo)	Ref
<i>bPEI-CD 8%</i> (n=5-16%) 	I	25000	N/P 20	agrégation	PC3	50% (0,92 mM) (IC50)	-	Pun et al. ¹⁶⁰
<i>bPEI-CD</i> 	b	25000	w : w 3 : 1	(ng luc/g prot : w/w=3 :1) 38	HEK29 3	80%	-	Forrest et al. ¹⁶¹
<i>bPEI-γCD(HP γCD-PEI)ratio</i> <i>bPEI/CD : 3,3/1</i> 	b	600	N/P 40	1,7.10 ⁷	SKOV- 3	N/P=12 0 100%	8.10 ⁴	Hyang et al. ¹⁶²
<i>bPEI-γCD peptide (HP γCD-PEI-p)</i> ratio <i>bPEI/CD/peptide :</i> <i>3,3/1/1,2</i> 	b	600	N/P 40	5.10 ⁷	SKOV- 3	N/P=12 0 100%	3.10 ⁵	Hyang et al. ¹⁶²
<i>bPEI-acétylée 43%</i> (n=15-47%) 	b	25000	3 : 1 w : w 4 : 1	8.10 ⁵ 5.10 ⁴	C2C12 MDA- MD- 231	40% 80% (50μg/ ml)	-	Forrest et al. ¹⁶³
<i>bPEI-acétylée 53%</i> (n=34-100%) 	b	25000	w :w 3 : 1	5.10 ⁴ 2.10 ⁴ 1.10 ⁴	C2C12 MDA- MD- 231 HEK29 3	0 0 0 (50μg/ ml)	-	Gabrielson et al. ¹⁶⁴
<i>bPEI-PEG acétylé ou PAA30%</i> (n=10-50%) 	b	750000	w : w 30 : 1	Fluoresce nce (X 10.3/mg protéine) 5250	CCOS- 1	N/P=45: 1 80%	-	Nimesh et al. ¹⁶⁶

Molécules PEI modifiée	Type 1 ou b	Mn (PEI) (g.mol ⁻¹)	Ratio transfection polymère/A DN	RLU/ mg protéines	cellules	viabilité	RLU/ mg tissus (in vivo)	ref
<i>bPEI-carboxylée (PEI 2-30)</i> (n=8-40%) 	b	10000	w : w 6 : 1	5.10 ⁶	Neuro2 A	82%	-	Oskuee et al. ¹⁶⁷
<i>bPEI-carboxylée (PEI 6-17)</i> (n=8-35%) 	b	10000	w : w 6 : 1	1.10 ⁷	HBG	85%	-	Oskuee et al. ¹⁶⁷
<i>bPEI-carboxylée (PEI 2-52)</i> (n=8-%) 	b	25000	w : w 8 : 1	Activité luciférase (%) 100%	Neuro2 A	79% (100µ/ml)	-	Oskuee et al. ¹⁶⁸
<i>bPEI-carboxylée-oligamine (PEI 6-9%)</i> (n=8-29%) 	b	10000	w : w 4 : 1	4,5.10 ⁷	Neuro A2	(w/w)= 6 : 1 60%	-	Dehshahri et al. ¹⁶⁹
<i>bPEI-Gal</i> 	b	25000	N/P 2 : 1	6.10 ⁷ 8.10 ⁸ 1.10 ⁹	3T3 BNL CL2 HepG2	-	-	Zanta et al. ¹⁷⁰
<i>bPEI-Gal4 ou GP</i> 	b	25000	N/P 10 : 1	1.10 ⁹ 2.10 ⁹	BN L C2 HeLa	-	-	Bettinger et al. ¹⁴¹
<i>bPEI-Glu4</i> 	b	25000	N/P 10 : 1	1.10 ⁸ 2.10 ⁹	BN L C2 Hela	-	-	Bettinger et al. ¹⁴¹
<i>bPEI(7400)-g-chitosane (3400)</i> 	b	7400	N/P 40 : 1	6.10 ⁹ 1.10 ⁹ 1.10 ⁹	Hela HepG2 Hépatocytes	IC50 = 97.3 µg/mL	-	Wong et al. ²²

Molécules PEI modifiée	Type l ou b	Mn (PEI) (g.mol ⁻¹)	Ratio transfection polymère/A DN	RLU/ mg protéines	cellules	viabilité	RLU/ mg tissus (in vivo)	Ref
<p><i>Gal-PEG-CHI-g-bPEI</i></p> 	b	25000	N/P 14	2.10 ⁵	HepG2	N/P=14 :1 100%	Intensité 350%	Jiang et al. ¹⁷⁴
<p><i>bPEI-cholestérol (P17C)</i> n= 10-30 de PEI par cholesterol</p> 	b	2000		(mU/mg prot) 3750	293T	10% (50µ/ml)	-	Kim et al. ¹⁷⁶
<p><i>bPEI-myristyl (P26M)</i> n= 10-30 de PEI myristyl</p> 	b	2000		(mU/mg prot) 2400	293T	22% (50µ/ml)	-	Kim et al. ¹⁷⁶
<p><i>Poly (ester amine) (bPEI-g-PCL)</i></p> 	b	600	N/P=5 10 30	8.10 ⁵ 5.10 ⁴ 2.10 ⁶	239T HepG2 HeLa	N/P=30 :1 Non toxique	-	Arote et al. ¹⁷⁷
<p><i>Poly (ester amine) (bPEI-g-PCL 1,2)</i> (m=0,6 à1.8 mol)</p> 	b	1200	N/P=30 20 20	2.10 ⁹ 5.10 ⁵ 6.10 ⁷	239T HepG2 HeLa	N/P=30 :1 Non toxique	-	Arote et al. ¹⁷⁷
<p><i>Poly (ester amine) (bPEI-g-PCL 1,8)</i> (m=0,6 à1.8 mol)</p> 	b	1800	N/P=20 10 30	8.10 ⁸ 2.10 ⁶ 8.10 ⁷	239T HepG2 HeLa	N/P=30 :1 Non toxique	-	Arote et al. ¹⁷⁷
<p><i>bPEI-g-(PCL-b-PEG)</i> (PEI800(PCL1.2kPEG2k)1.4 (m=1.4-4.5)</p> 	b	800	N/P=20	(ng luc/mg prot) 0,1	3T3	N/P=20 :1 50%	-	Shuai et al. ¹⁷⁹
<p><i>bPEI-g-(PCL-b-PEG)</i> (PEI25k(PCL580kPEG550k)2.9) (m=1.4-4.5)</p> 	b	25000	N/P=20	(ng luc/mg prot) 15	3T3	N/P=20 :1 97%	-	Shuai et al. ¹⁷⁹

Molécules PEI modifiée	Type l ou b	Mn (PEI) (g.mol ⁻¹)	Ratio transfection polymère/ADN	RLU/ mg protéines	cellules	viabilité	RLU/ mg tissus (in vivo)	Ref
<i>bPEI-g-(PCL-b-PEG)+CD</i> <i>(PEI25k-g-(PCL580-b-PEG5k)2.9)</i> <i>(m=1.4-4.5)</i> 	b	25000	N/P=20	(ng luc/mg prot) 80	3T3	-	-	Shuai et al. ¹⁸⁰

V – Conclusion

Ce chapitre présente la difficulté du transfert de gène dans le corps d'une souris ou d'un patient ; et rappelle les différentes barrières biologiques qu'un gène médicament doit surmonter pour arriver au noyau, avant sa dégradation. Il relate aussi que l'utilisation d'ADN nu en transfection *in vitro* et *in vivo* est peu efficace car celui-ci est détruit rapidement par le système immunitaire ou les enzymes de dégradation (du cytosol de la cellule). Dans l'objectif d'augmenter la demi-vie de circulation, et aussi l'efficacité de transfection du gène médicament, durant son cheminement vers le noyau, les chercheurs ont synthétisés des outils de protection, les vecteurs.

Les premiers vecteurs apparus en thérapie génique sont des vecteurs viraux, à l'image des virus, dont leurs propriétés pathogènes ont été éliminées. Le développement de ces systèmes de transfert de gènes performants offre de nombreuses perspectives, et leurs propriétés (similaires aux virus) en font les vecteurs les plus utilisés pour des essais cliniques. Cependant avec la limite de complexer des gènes de petite taille (< 8kpb) et leur potentiel oncogène ont fait naître une autre catégorie de vecteurs, les vecteurs synthétiques.

Nous nous sommes intéressés alors aux vecteurs synthétiques et plus particulièrement aux polymères cationiques, à bases d'acide aminés (la poly(L-lysine) (PLL)) ou de polyamine (la poly(éthylènimine) (PEI) (branchée ou linéaire). Avec les PEIs, les chercheurs ont synthétisé des vecteurs non viraux originaux qui transfectent très efficacement les cellules *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les tests de cytotoxicité des ces PEIs montrent qu'elles sont toxiques, autant que la PLL, qui est problématiques pour le transfert de gène. C'est dans l'objectif de diminuer la cytotoxicité des PEIs que les auteurs ont élaboré des systèmes à base de PEI capables de délivrer des gènes *in vitro* avec une efficacité comparable ou supérieure, voir inférieure à la PEI ; tout en diminuant la toxicité du vecteur.

Depuis quelques années, certains auteurs modifient la poly(éthylènimine) branchée et linéaire par différentes molécules (chaînes acétyles, cyclodextrines, PEG ...) mais n'obtiennent pas de vecteurs dont la toxicité et la transfection de gène seraient supérieur à celles des PEIs. Depuis peu, la nouvelle stratégie est de synthétiser des vecteurs à bases de peptides. Les peptides chargés négativement sont principalement utilisés pour

augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* d'un vecteur synthétique (par ajout durant formulation, par modification chimique du vecteur synthétique¹²¹). Certains auteurs^{181, 182} ont mis en évidence les capacités des vecteurs cationiques à internaliser des oligonucléotides dans les fibroblastes souris (3T3) et des cellules gliales avec une faible toxicité.

L'utilisation des peptides amphipatiques est peu courante malgré leur fort potentiel. Outre le fait qu'ils déstabilisent la membrane, leurs séquences aminées, chargées positivement, complexent efficacement l'ADN. De plus, certains de ces vecteurs possèdent des propriétés antibiotiques^{183, 184}.

C'est dans cette optique que de nouveaux vecteurs non viraux originaux constitués de poly(éthylèneimine) linéaire et de résidus histidinilés ont été synthétisés. Les propriétés de complexation de la IPEI avec ceux des synthons, utilisés pour modifier ce polymère, permettent d'élaborer de nouveaux polymères cationiques modulables dont les propriétés sont comparées aux efficacités de transfection *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 2 :

Techniques expérimentales

Ce chapitre est consacré à la description des protocoles utilisés durant cette thèse. Le premier paragraphe concernera les protocoles de synthèse des vecteurs en vue de leur application en thérapie génique. Ensuite, nous présenterons les différentes méthodes physico-chimiques utilisées pour la caractérisation de nos macromolécules. Dans le dernier paragraphe, les protocoles des tests biologiques utilisés pour la complexation des vecteurs avec l'ADN seront exposés, ainsi que ceux pour la transfection *in vitro* des cellules.

I – Préparation des synthons et des vecteurs synthétiques

I-1 – Caractéristiques des produits utilisés

Les tableaux 2-1 et 2-2 récapitulent respectivement les caractéristiques des solvants et des réactifs utilisés lors des différentes étapes de synthèses et de purifications.

Tableau 2-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors des synthèses des synthons et des vecteurs à base de IPEI

Solvants	Provenance	Densité à 20°C	Température d'ébullition (°C)
Acétate d'éthyle	SDS	0,903	77
Acétone	Carlo Erba	0,788-0,792	55,7/56,7
Dichlorométhane	SDS	1,33	39/40
DMSO	Carlo Erba	1,101	189
Ether diéthylique	SDS	0,713	34/35
Méthanol	SDS	0,791	64,7
THF (99,9)	SDS	0,8893	65/66

Tous les solvants sont utilisés tels quels.

Tableau 2-2 : Caractéristiques des réactifs utilisés lors des synthèses des synthons et des vecteurs à base de IPEI

Réactifs	Provenance	Densité à 25°C	Température de fusion (°C)	Température d'ébullition (°C)
1-adamantane éthanol	Aldrich	-	114-117	-
1-adamantane méthylamine	Aldrich	0,933	83-85	-
Alcool propargylique	Aldrich	0,963	-51	114/115
Acide chlorhydrique 12N	ACROS Organics	1,18	-30	48
Acide trifluoroacétique TFA (99%)	Alfa Aesar	1,489	-15,4	72
Carbonate de sodium	Sigma	-	851	-
Chlorure d'acryloyle	Aldrich	1,114	-	72-76
L-arginine	Sigma	-	222	-
L-histidine	Sigma-Aldrich	-	285	-
L-histidine boc	Merck	-	-	-
L-histidine méthyle ester	Aldrich	-	207	-
Fluorure d'ammonium (FNH ₄)	Aldrich	-	sublimation	-
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Sigma-Aldrich	1.009	-	-
N-hydroxysuccinimide	Aldrich	-	-	-
N-N-dicyclohexylcarbodiimide	Aldrich	1,325	34	122-124
Poly(2-éthyle-2oxazoline) (50000 g.mol ⁻¹)	Aldrich	1.14	Tg : 69-71	-
Spermine	Fulka	0,937	29	130
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	Fulka	2,69	1124	-
Tétra-N-butylammonium fluoride (TBAF)	Aldrich	0,903	58/60	-
Triéthylamine	ACROS Organics	0,72	-115	89

Tous les réactifs sont utilisés tels quels.

I-2 - Synthèse des synthons précurseurs

I-2. 1 Synthèse de la poly(éthylènimine)linéaire

Dans un tricol de 500 mL équipé d'un réfrigérant, 10g de poly(2-éthyle-2-oxazoline) de masse molaire de 50000 g.mol⁻¹ (0,2 mmol) sont dissous dans 115 mL d'eau distillée. A ce mélange, est additionné l'acide chlorhydrique 12N (75 ml ; 2,44 mol), et l'hydrolyse est menée durant 48 heures, à reflux sous azote (figure 2-1).

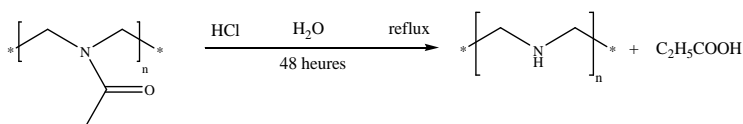


Figure 2-1 : Synthèse de la Poly (Ethylènimine)

Des pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH) sont alors introduites dans le milieu réactionnel pour augmenter le pH de la solution jusqu'à pH=12 permettant la précipitation totale du polymère souhaité. Le milieu réactionnel est filtré sur un verre fritté de porosité 4, puis lavé avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage atteigne un pH=7. Le précipité blanc est récupéré et séché au lyophilisateur. Le polymère est ainsi obtenu sous la forme d'une poudre blanchâtre. Sa structure est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C), en solution dans D_2O (0,5 mL) contenant 5 μL de TFA, et sa masse molaire est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Rendement : 4,232 g (96,3%), RMN ^1H (300 MHz, D_2O + 5 μL TAF) : δ (ppm) = 3,50 (s, 4H, NHCH_2CH_2).
 ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O + 5 μL TAF): δ (ppm) = 48,97 (s, 2C, NHCH_2CH_2); 0 (s, TSP : ref).

I-2. 3 Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle

Dans un tricol, 3,1g de L-histidine (20 mmol) sont additionnés à une solution alcaline contenant 1g de NaOH (25 mmol) dans 10 mL d'eau. Le chlorure d'acryloyle (1,61 ml ; 20 mmol) est ajouté goutte à goutte au mélange, maintenu à 5°C dans un bain de glace. L'augmentation de la température durant l'addition ne doit pas excéder 2°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 30 minutes à 5°C puis est placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 18 heures (figure 2-2).

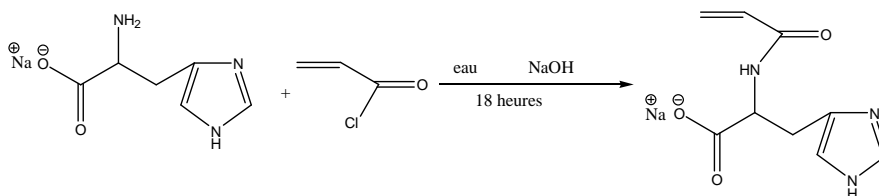


Figure 2-2 : Synthèse de l'histidine-N-acryloyle

En fin de réaction, la solution, neutre, est acidifiée par de l'HCl 6N (2mL) afin d'atteindre un pH proche de 2. Ensuite, le milieu réactionnel est précipité dans 400 mL d'acétone puis filtré sur un verre fritté de porosité 3. Le filtrat contenant le produit, est évaporé à sec, à température ambiante, séché puis resolubilisé dans 3mL d'eau acidifiée. Cette solution est reprécipitée dans 50 mL d'acétone. Après filtration, le précipité, blanc, est séché à l'étuve à vide, à température ordinaire. Sa structure est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

Rendement : 1,8 g (43%), RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8,35 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOO}$); 7,55 (s, 1H, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,78 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,31 (m, 1H, CH_2CHCONH); 6,04 (d,

1H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 5,58 (d, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 4,6 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{COOH}$); 3,10 (m, 2H, CCH_2CH). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 167,78 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}\text{COOH}$); 162,76 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CONH}}$); 127,93 (s, 1C, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 123,55 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 123,26 (s, 1C, $\underline{\text{C}}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 123,05 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 111,72 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 46,39 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}\text{COOH}$); 30,9 (s, 1C, CCH_2CHN); 0 (s, TSP : ref). ESI-MS m/z = 210,20 uma pour $[\text{M}+\text{H}^+]$.

I-2. 4 Synthèse de la l-histidine méthyle ester-N-acryloyle

Dans un bicol de 100 mL, 1g de L-histidine méthyle ester (5,9 mmol) est dissous dans 23 ml de dichlorométhane. A ce mélange est additionné 1,85 ml de triéthylamine (5,2 mmol). Le chlorure d'acryloyle (0,336 ml ; 20 mmol) est ajouté goutte à goutte au mélange, maintenu à 5°C dans un bain de glace. L'augmentation de la température durant l'addition ne doit pas excéder 2°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 30 minutes à 5°C puis est placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures (figure 2-3).

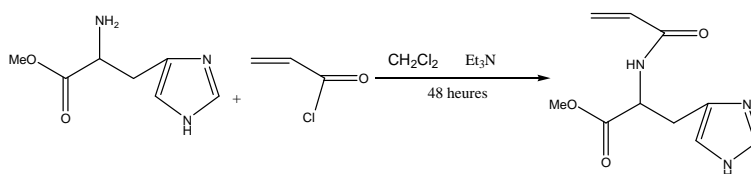


Figure 2-3 : Synthèse de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle

Le précipité apparu lors de la réaction est filtré sur un verre fritté de porosité 3 ou 4. Le filtrat est concentré puis le mélange est dissous dans 60 mL d'acétate d'éthyle et lavé 5 fois avec 30 ml de solution saturée en bicarbonate de sodium. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 et filtrées sur un verre fritté de porosité 3. Le filtrat est concentré sur l'évaporateur rotatif (à température ambiante) pour donner un résidu huileux de couleur blanchâtre et séché sous rampe à vide. La structure du composé blanchâtre obtenu est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

Rendement : 0,35 g (26,5%). ^1H NMR (300MHz, D_2O): δ (ppm) = 8,49 (d, 1H CHNHCOCH_2); 7,58 (s, 1H, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,82 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,26 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 6,09 (d, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 5,59 (d, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 4,57 (m, 1H, CCH_2CH); 3,60 (s, 3H, NHCHCOOCH_3); 2,93 (s, 3H, NHCHCOOCH_3). ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 172,39 ($\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\underline{\text{CONH}}$); 165,29 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}\text{COOCH}_3$); 135,42 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 133,23 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 126,63 (s, 1C, $\underline{\text{C}}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 131,64 (s, 1C, $\underline{\text{CH}}_2\text{CHCONH}$); 117,41 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 55,46 (s, 1C,

NHCHCOOCH₃); 52,49 (s, 1C, NHCHCOOCH₃); 29,21 (s, 1C, CCH₂CHNH); 0 (s, TSP : ref). ESI-MS m/z = 224,20 uma pour [M+H⁺].

I-2. 5 Synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle

Dans un monocol de 10 mL, 340,6 mg de 1-adamantane méthylamine (1,9 mmol) sont dissous dans 2.25 ml de THF. A ce mélange est additionné 0,590 ml de triéthylamine (4.1 mmol). Le chlorure d'acryloyle (0,121 ml ; 1,48 mmol) est ajouté goutte à goutte au mélange, maintenu à 5°C dans un bain de glace. L'augmentation de la température durant l'addition ne doit pas excéder 2°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 30 minutes à 5°C puis est placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures (figure 2-4).

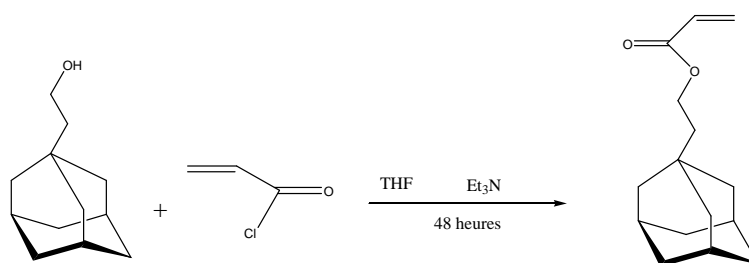


Figure 2-4 : Synthèse du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle

Le précipité apparu lors de la réaction est filtré sur un verre fritté de porosité 3 ou 4. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. La poudre jaune obtenue est dissoute dans 60 mL de chloroforme et lavée 5 fois avec 30 ml de solution saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et filtrée sur un verre fritté de porosité 3. Le filtrat est concentré sur l'évaporateur rotatif (à température ambiante) pour donner un résidu huileux de couleur jaune et séché sous rampe à vide. La structure est déterminée par RMN (¹H, ¹³C) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

Rendement : 414,1 mg (93%). RMN ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6,41 (d, 1H, CH₂CHCOOCH₂); 6,11 (m, 1H, CH₂CHCONH); 5,82 (d, 1H, CH₂CHCONH); 4,21 (t, 2H, OCH₂CH₂Cad); 1,91 (s, 3H, adamantane); 1,62, (m, 6H, adamantane); 1,49 (OCH₂CH₂Cad); 1,43 (s, 6H, adamantane). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) δ (ppm) = 165,00 (s, 1C, CCH₂CH₂OCOCHCH₂); 131,7 (s, 1C, CCH₂CH₂NHCOCHCH₂); 126,05 (s, 1C, CCH₂CH₂OCOCHCH₂); 64,20 (s, 1C, adCCH₂CH₂OCO); 42,24 (s, 1C, adCCH₂CH₂NHCO); 40,55 (s, 3C, adCCH₂CH₂NHCO); 37,2 (s, 3C, adCCH₂CH₂NHCO); 32,04 (s, 1C, adCCH₂CH₂NHCO) ; 28,54 (s, 3C, adCCH₂CH₂NHCO). ESI-MS m/z = 257,1 uma pour [M+ Na⁺].

I-2. 6 Synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle

Dans un monocol de 10 mL, 500 mg de 1-adamantane méthylamine (3,03 mmol) est dissouts dans 2.25 ml de THF. A ce mélange est additionné 0,773 ml de triéthylamine (0,55 mmol). Le chlorure d'acryloyle (0,310 ml ; 3,81 mmol) est ajouté goutte à goutte au mélange, maintenu à 5°C dans un bain de glace. L'augmentation de la température durant l'addition ne doit pas excéder 2°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 30 minutes à 5°C puis est placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures (figure 2-5).

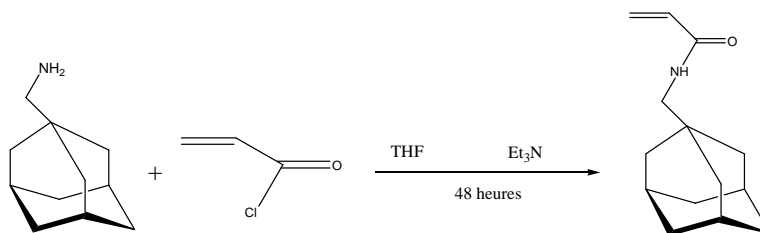


Figure 2-5 : Synthèse du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle

Le précipité apparu lors de la réaction est filtré sur un verre fritté de porosité 3 ou 4. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. La poudre jaune obtenue est dissoute dans 60 mL de chloroforme et lavée 5 fois avec 30 ml de solution saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et filtrée sur un verre fritté de porosité 3. Le filtrat est concentré sur l'évaporateur rotatif (à température ambiante) pour donner un résidu huileux de couleur jaune et séché sous rampe à vide à température ambiante. La structure est déterminée par RMN (¹H, ¹³C, 300 MHz) et par spectrométrie de masse (ESI-MS). Rendement : 500 mg (75,4%). RMN ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 6,20 (d, 1H, CH₂CHCONHCH₂ad); 6,06 (m, 1H, CH₂CHCONHCH₂ad); 5,56 (d, 1H, CH₂CHCONHCH₂ad); 2,96 (NHCH₂ad); 1,91 (s, 3H, adamantane); 1,62, (m, 6H, adamantane); 1,43 (s, 6H, adamantane). RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) = 166,5 (s, 1C, CCH₂NHCOCHCH₂); 131,7 (s, 1C, CCH₂NHCOCHCH₂); 126,05 (s, 1C, CCH₂NHCOCHCH₂); 123,55 (s, 1C, CH₂CHCONH); 123,05 (s, 1C, CH₂CHCONH); 51,41 (s, 1C, adCCH₂NHCO); 40,5 (s, 3C, adCCH₂NHCO); 37,2 (s, 3C, adCCH₂NHCO); 36,58 (s, 31, CHCOOH); 34,37 (s, 1C, adCCH₂NHCO); 30,9 (s, 1C, CCH₂CHN); 28,54 (s, 3C, adCCH₂NHCO). ESI-MS m/z = 206,20 uma pour [M+H⁺].

I-2. 7 Synthèse de la L-arginine-N-acryloyle

Dans un tricol, 1,5 g de L-arginine (8,6 mmol) sont additionnés à 10 mL de solution alcaline de pH=11. Le chlorure d'acryloyle (0,700 ml ; 8,6 mmol) est ajouté goutte à goutte au mélange, maintenu à 5°C dans un bain de glace. L'augmentation de la température durant l'addition ne doit pas excéder 2°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 30 minutes à 5°C puis est placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 18 heures (figure 2-6).

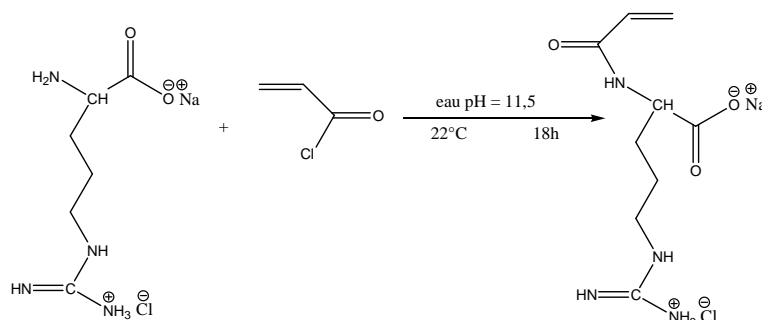


Figure 2-6 : Synthèse de l'arginine-N-acryloyle

En fin de réaction, la solution, neutre, est acidifiée par de l'HCl 6N (2mL) afin d'atteindre un pH proche de 2. Ensuite, le milieu réactionnel est précipité dans 400 mL d'acétone puis filtré sur un verre fritté de porosité 3 (cf. figure 2.4). Le filtrat contenant le produit, est séché puis resolubilisé dans 3mL d'eau acidifiée. Cette solution est précipitée une nouvelle fois dans 50 mL d'acétone. Après filtration, le précipité, blanc, est séché à l'étuve à vide et à température ambiante. Sa structure est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

Rendement 0,577 g (30%). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 6,41 (m, 1H, CH_2CHCONH); 6,04 (d, 1H, CH_2CHCONH); 5,58 (d, 1H, CH_2CHCONH); 4,31 (m, 1H, NHCHCOOH); 3,24 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{N}_2\text{H}_3)$); 1,95 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{N}_2\text{H}_3)$); 1,68 (m, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{N}_2\text{H}_3)$). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 185,05 (s, 1C, CHCOOH); 181,38 (s, 1C, CH_2CHCONH); 174,51 (s, 1C, $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$); 132,65 (s, 1C, CH_2CHCONH); 130,56 (s, 1C, CH_2CHCONH); 57,65 (s, 1C, NHCHCOOH); 43,56 (m, 1C, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$); 29,48 (m, 1C, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}$); 27,55 (m, 1C, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}$); 0 (s, TSP : ref). ESI-MS m/z = 229,20 uma pour $[\text{M}+\text{H}]^+$.

I-3 - Réactions modèles

I-3. 1 Analyse de la stabilité de la spermine à différents pH

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 402 mg de sermine (2 mmol) sont dissous dans 2 ml d'eau. Le pH de la solution est ramené à 2,3 par l'ajout de 0,728 ml de HCl 6N. La réaction est conduite, sous agitation, durant 48 heures à 100°C (cf. : figure 2-15). Deux autres réactions sont réalisées à des pH=7 et 11,3.

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis l'eau est lyophilisée. La poudre jaunâtre. Le produit brut est caractérisé par RMN 1H et spectrométrie de masse ESI-MS.

Rendement : 402 mg (100%), RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ(ppm) = 3,16 (bs, 12H, NH₂CH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂); 2,16 (bs, 4H, NH₂CH₂CH₂CH₂NH); 1,84 (bs, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm) = 51,09 (s, 2C, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH) ; 48,63 (s, 2C, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH) ; 40,64 (s, 2C, NH₂CH₂CH₂CH₂NH) ; 27,89 (s, 2C, NH₂CH₂CH₂CH₂NH) ; 26,89 (s, 2C, NH₂CH₂CH₂CH₂NH). ESI-MS m/z = 203,2 uma pour [M+H⁺].

I-3. 2 Analyse de la réaction de Michaël entre la spermine et l'histidine-N-acryloyle

Dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 406,7 mg de spermine (2 mmol) sont dissous dans 0,69 ml d'eau. A ce mélange sont additionnés, 195,6 mg d'histidine-N-acryloyle (1 mmol). Le pH de la solution est ramené à 7 par l'ajout de 0,5 ml de soude à 0,5M ; et le mélange réactionnel est dilué par 0,5 ml d'eau déminéralisée. La modification est menée, sous agitation, durant 48 heures à 100°C (figure 2-7).

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi. Une poudre est récupérée après lyophilisation. La structure est déterminée par RMN (¹H, ¹³C, 2D homonucléaire) et par spectrométrie de masse (ESI-MS).

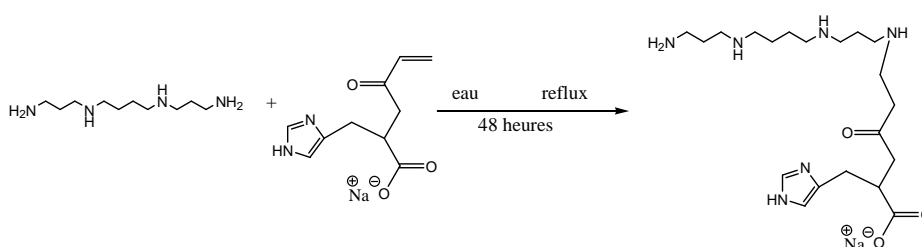


Figure 2-7 : Réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la spermine

Rendement : 402 mg (100%), RMN ^1H (300 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm}) = 8,64$ (s, 1H, imidazol); 7,33 (s, 1H, imidazol); 4,51 (bs, 1H, CHCOOH); 3,38 (bs, 2H, CCH_2CHN); 3,16 (bs, 12H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 3,14 (bs, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,79 (bs, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,16 (bs, 4H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 1,84 (bs, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 178,29 (s, 1C, CHCOOH); 174,28 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 135,97 (s, 1C, imidazol); 133,74 (s, 1C, imidazol); 118,09 (s, 1C, imidazol); 55,41 (s, 1C, CHCOOH); 48,53 (bs, 1C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 46,68 (s, 1C, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 45,87 (s, 1C, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 44,97 (s, 1C, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 38,97 (s, 1C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 38,73 (s, 1C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 35,70 (s, 1C, $\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 29,63 (s, 1C, CCH_2CHN); 28,90 (s, 1C, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 25,70 (bs, 2C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 0 (s, TSP : ref). ESI-MS $m/z = 412,2$ uma pour $[\text{M}+\text{H}^+]$.

I-3. 3 Analyse de la stabilité de la IPEI à différents pH

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 232,6 mg de IPEI (5,4 mmol en unité éthylèneimine ou EI) sont dissous dans 1 ml d'eau et 1 ml d'acide chlorhydrique 6N. Le pH de la solution est ramené à 1 par l'ajout de 2 ml de HCl 6N; et le mélange réactionnel est dilué par 0,617 ml d'eau déminéralisée pour obtenir concentration en IPEI de 1,17 M. La réaction est conduite, sous agitation, durant 48 heures à 100°C (figure 2-8). Deux autres réactions sont réalisées à des pH=6 et 8.

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis le produit est lyophilisé. La poudre jaunâtre est reprise dans de l'eau MiliQ et placée dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures. Une poudre est récupérée après lyophilisation. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire, 300 MHz) et par SEC.

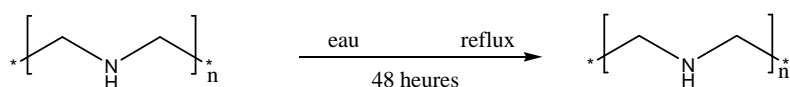


Figure 2-8 : dégradation de la poly(éthylèneimine) linéaire à différents pH dans les conditions de la réaction de Michael

Rendement : 232,6 mg (100%), RMN ^1H (D_2O): $\delta(\text{ppm}) = 3,50$ (s, 4H, NHCH_2CH_2). ^{13}C NMR (D_2O): δ (ppm) = 48,97 (s, 2C, NHCH_2CH_2); 0 (s, TSP : ref).

I-4 - Modification de la IPEI par différents synthons sur la IPEI

I-4. 1 Modification de la lPEI par précurseurs d'acide aminé (premier protocole)

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 500 mg de IPEI (11,6 mmol en unité éthylènimine ou EI) sont dissous dans 2 ml d'eau et 2 ml d'acide chlorhydrique 6N. A ce mélange sont additionné 602 mg d'histidine-N-acryloyle (2,88 mmol). La variation de la quantité de la L-histidine-N-acryloyle permet d'obtenir différents taux de modification sur la IPEI (de 2 à 67%). Le pH de la solution est ensuite ramené à 7 par l'ajout de 2,5 ml de soude à 0,5M ; et le mélange réactionnel est dilué par 3,5 ml d'eau déminéralisée pour obtenir concentration en IPEI de 1,17 M. La modification est menée, sous azote et agitation, durant 48 heures à 100°C.

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis lyophilisé. La poudre jaunâtre est précipitée dans 10 mL de méthanol acidifié par 1 mL de HCl. Le précipité jaune est filtré sur un verre fritté de porosité 3 ou 4. Ensuite, il est solubilisé dans 3 mL d'eau MiliQ et placé dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures contre l'eau miliQ. Après récupération du contenu du boudin est lyophilisé pour obtenir une poudre jaune. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,5 (s, 1H, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 7,2 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 4,32 (bs, 1H, CHCOOH); 3,2 (large singulet (ls), 4H, (NHCH_2CH_2), unité EI); 3,61 (ls, 2H, CCH_2CHN); 2,8 (lm, 4H, (NRCH_2CH_2), unité éthylènimine (EI) histidinilée); 2,57 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,35 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 179,33 (s, 1C, CHCOOH); 177,98 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 135,92 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 132,56 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 119,22 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 57,15 (s, 1C, CHCOOH); 51,92 (s, 1C, ($\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), unité EI histidinilée); 47,70 (bs, 2C, (NHCH_2CH_2), unité EI); 46,16 (s, 1C, ($\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), unité EI histidinilée); 50,63 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 35,23 (s, 1C, CCH_2CHN); 28,89 (bs, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 0 (s, TSP : ref).

I-4. 2 Modification de la lPEI par les précurseurs d'acide aminé (second protocole)

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 500 mg de IPEI (11,6 mmol en unité éthylènimine ou EI) sont dissous dans 2 ml d'eau et 2 ml d'acide chlorhydrique 6N. A ce mélange sont additionné 602 mg d'histidine-N-acryloyle (2,88 mmol). La variation de la quantité de la L-histidine-N-acryloyle permet d'obtenir différents taux de modification sur la IPEI (de 2 à 67%). Le pH de la solution est ensuite ramené à 7 par l'ajout de 2,5 ml de soude à 0,5M ; et le mélange réactionnel est dilué par 3,5 ml d'eau déminéralisée pour obtenir concentration en éthylènimine de 1,17 M. La modification est menée, sous azote et agitation, durant 48 heures à 100°C (figure 2-9).

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis l'eau est lyophilisée. La poudre jaunâtre est reprise dans de l'eau MiliQ et placée dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures. Après récupération du contenu du boudin, l'eau est lyophilisée pour obtenir une poudre jaune. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

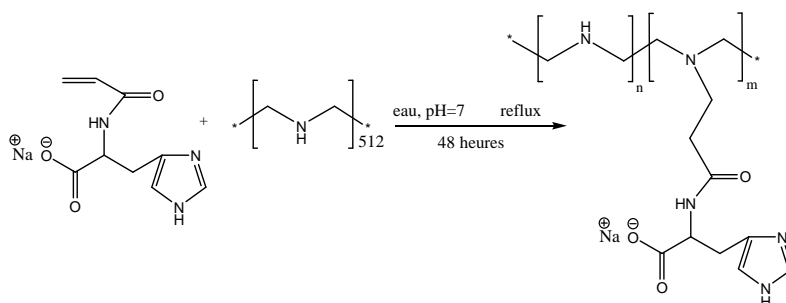


Figure 2-9 : Réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la IPEI

IPEI-N-histidine

Rendement : 620,1 mg (72%). RMN ^1H (300MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,5 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 7,2 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 4,32 (bs, 1H, CHCOOH); 3,2 (large singulet (ls), 4H, $(\text{NHCH}_2\text{CH}_2)$, unité EI); 3,61 (ls, 2H, CCH_2CHN); 2,8 (lm, 4H, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2)$, unité éthylènimine (EI) histidinilée); 2,57 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,35 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 179,33 (s, 1C, CHCOOH); 177,98 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 135,92 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 132,56 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 119,22 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 57,15 (s, 1C, CHCOOH); 51,92 (s, 1C, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH})$, unité EI histidinilée); 47,70 (bs, 2C, $(\text{NHCH}_2\text{CH}_2)$, unité EI); 46,16 (s, 1C, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH})$, unité EI histidinilée); 50,63 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 35,23 (s, 1C, CCH_2CHN); 28,89 (bs, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 0 (s, TSP : ref).

IPEI-N-Arginine

Rendement : 150 mg (32,6%). ^1H NMR spectroscopy (300 MHz, D_2O) δ = 4,01 (large multiplet (lm), 2H, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2)$, unité éthylènimine (EI) greffée arginine); 3,67 (lm, 2H, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2)$, unité EI greffée

arginine); 3,55 (ls, 1H, NHCH₂COOH); 3,17 (bs, 2H, (NHCH₂CH₂), unité EI non modifiée); 2,94 (ls, 2H, (NHCH₂CH₂), unité ED); 2,72 (lm, 2H, NRCH₂CH₂CONH); 2,60 (ls, 2H, NCH₂CH₂CONH); 1,84 (ls, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NHC(N₂H₃)); 1,67 (ls, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NHC(N₂H₃)). RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ (ppm) = 188,30 (s, 1C, CH₂COOH); 178,49 (s, 1C, CH₂CH₂CONH); 159,51 (s, 1C, NHC(NH)NH₂); 57,65 (s, 1C, NHCH₂COOH); 50,63 (s, 1C, NCH₂CH₂CONH); 48,19 (bm, 2H, (NRCH₂CH₂), unité EI non modifiée et unité EI greffée arginine); 43,43 (m, 1C, CHCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂); 29,48 (m, 1C, CHCH₂CH₂CH₂NHC); 28,89 (bs, 1C, NCH₂CH₂CONH); 27,55 (m, 1C, CHCH₂CH₂CH₂NHC); 0 (s, TSP : ref).

Etude cinétique

Le protocole utilisé pour les études cinétiques est le même que le premier protocole. Cependant, l'expérience est réalisée pour un volume de 10 mL. Des prélèvements de 2 mL sont effectués à 30 min, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures et 5 heures. La structure obtenue est déterminée par RMN (¹H, 300 MHz). Rendement de 75 à 85 % selon les prélèvements.

I-4. 3 Modification de la lPEI par de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 230 mg de lPEI (5,36 mmol en unité EI) sont dissous dans 1 ml d'eau et 2 ml d'acide chlorhydrique 6N. A ce mélange sont additionnés, 203,4 mg d'histidine méthyle ester-N-acryloyle (1,1 mmol). Le pH de la solution est ramené à 1 par l'ajout de 0,5 ml de HCl 6N ; et le mélange réactionnel est dilué par 1 ml d'eau déminéralisée. La modification est menée, sous agitation durant 48 heures à 100°C (figure 2-10).

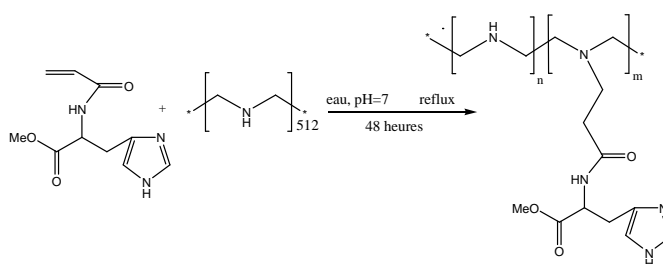


Figure 2-10 : Réaction de greffage de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle sur la lPEI

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis l'eau est lyophilisée. La poudre jaunâtre est précipitée dans 10 mL d'acétate d'éthyle. Le précipité jaune est récupéré et séché à l'étuve à vide sans

chauffage. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

Rendement : 466,6 mg (97%). RMN ^1H (300, MHz, D_2O) δ (ppm)=7,63 (s, 1H, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,87 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 4,33 (large singulet (ls), 1H, CHCOOCH_3); 3,43 (ls, 2H, CCH_2CHN); 2,86 (ls, 3H, CHCOOCH_3); 2,86 (ls, 6H, $(\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2)$, unité EI histidinilée); 2.8 (lm, 2H, NRCH_2CH_2); 2,42 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,14 (ls, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ ppm= 177,73 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 174,72 (s, 1C, CHCOOCH_3); 135,73 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 133,53 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 117,74 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 55,40 (s, 1C, CHCOOCH_3); 51,33 (s, 1C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 48,97 (s, 1C, CHCOOCH_3); 47,05-45,51 (m, 4C, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NR})$, unité EI non modifiée et unité EI histidinilée); 32,70 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 29,13 (s, 1C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}$); 0 (s, TSP : ref).

Etude cinétique

Le protocole utilisé pour les études cinétiques est le même que ci-dessus. Cependant, l'expérience est réalisée pour un volume de 10 mL. Des prélèvements de 2 mL sont effectués à 30 min, 1 heures 2 heures, 3 heures, 4 heures et 5 heures. Le solvant est lyophilisé et la structure du produit est déterminée RMN (^1H , 300 MHz). Rendement de 75 à 80% selon les prélèvements.

I-4. 4 Modification de la IPEI par les synthons adamantanes

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 43 mg de IPEI (1 mmol en unité EI) sont dissous dans 0,192 ml de DMSO. Le milieu réactionnel est mis dans un bain d'huile à 100°C. A ce mélange est additionnée, 13,1 mg du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (0,06 mmol). La variation de la quantité du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle permet d'obtenir différents taux de modification sur la IPEI (de 0,4 à 50%). La modification est menée, sous agitation durant 24 heures à 100°C (figure 2-11). En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi. Le milieu réactionnel est précipité dans 5 mL de THF. Le précipité jaune est récupéré et séché à l'étuve à vide sans chauffage. La poudre jaunâtre est reprise dans de l'eau MiliQ et placée dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures. L'eau est lyophilisée pour obtenir une poudre jaune. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

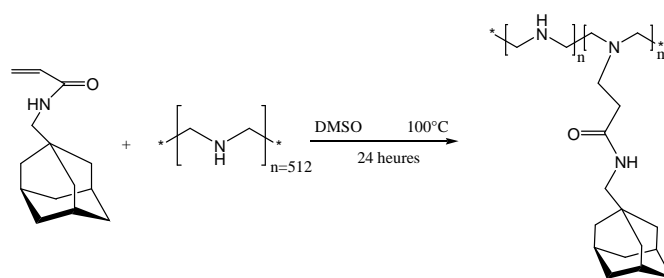


Figure 2-11 : Réaction de modification de la PEI par du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle

IPEI-N-Adamantane méthylamine

Rendement : 40,8 mg (75,6%). RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) = 4,20-3,25 (large singulet (ls), 8H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2$), unité éthylènimine (EI) non modifiée et unité EI greffée adamantane); 3,17 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,70 (NHCH_2Cad); 1,91 (s, 3H, adamantane); 1,59, (m, 6H, adamantane); 1,43 (s, 6H, adamantane). RMN ^{13}C (75MHz, D_2O): δ (ppm) = 164,72 (ls, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 48,73 (m, NHCH_2Cad); 45,53 (ls, 1C, $\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 45,53-44,68 (bs, 2C, ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, unité EI greffée adamantane); 44,66 (ls, 2C, ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, unité EI); 38,23 (ls, 1C, $\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 33,68 (m, 1C, $\text{CH}_2\text{adamantane}$); 28,18 (ls, 3C, adamantane); 27,5 (s, 3C, adamantane); 0 (s, TSP : ref).

IPEI-N-Adamantane éthanol

Rendement : 51,1 mg (77%). RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 4,20-3,25 (ls, 8H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2$), unité (EI) non modifiée et unité EI greffée adamantane); 3,17 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,70 (m, NHCH_2Cad); 1,91 (s, 3H, adamantane); 1,59, (m, 6H, adamantane); 1,43 (s, 6H, adamantane). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 173,07 (ls, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 57,72 (m, 1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cad}$); 51,19-49,45 (ls, 2C, ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, unité EI); 48,69 (ls, 1C, $\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2$); 45,53-44,68 (bs, 2C, ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, unité EI greffée adamantane); 47,52 (m, 1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cad}$); 43,06 (ls, 1C, $\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2$); 42,78 (s, 3C, $\text{adCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 37,2 (s, 3C, $\text{adCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 32,04 (s, 1C, $\text{adCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 28,18 (bs, 3C, adamantane); 0 (s, TSP : ref).

Etude cinétique

Le protocole utilisé pour les études cinétiques est le même que ci-dessus. Toutefois, des prélèvements à 30 min, 1 heures 2 heures, 3 heures, 4 heures et 5 heures sont effectués lors de la réaction. Le solvant est évaporé et le produit est séché à l'étuve à vide. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , 300 MHz). Rendement de 90 à 80% selon les prélèvements.

I-4. 5 Modification des lPEI-N-histidine par le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 100 mg de lPEI-N-histidine (2,3 mmol en unité éthylènimine ou EI) sont dissous dans 0,448 ml de DMSO. Le milieu réactionnel est mis dans un bain d'huile à 100°C. A ce mélange est additionnée, 33,5 mg de 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (0,15 mmol). La modification est menée, sous agitation, durant 24 heures (figure 2-12).

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi. Le milieu réactionnel est précipité dans 5 mL de THF. Le précipité jaune est récupéré et séché à l'étuve à vide sans chauffage. La poudre jaunâtre est reprise dans de l'eau MiliQ et placée dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures. L'eau est lyophilisée pour obtenir une poudre jaune. La structure obtenue est déterminée par RMN (^1H , ^{13}C , 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

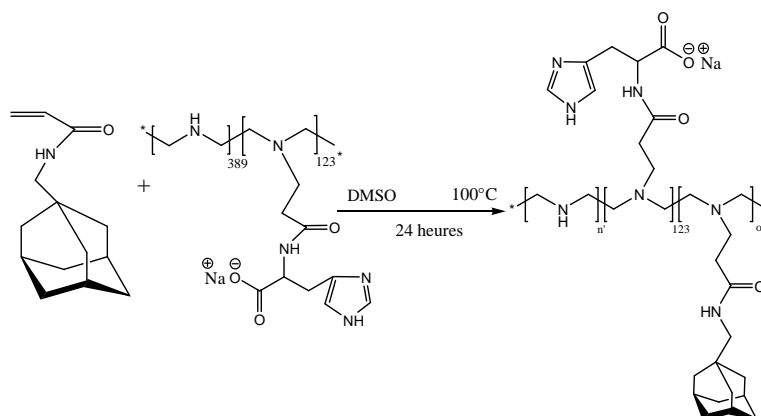


Figure 2-12 : Réaction de greffage du 1-adamantane-méthylamine-N-acryloyle sur la lPEI-N-histidine 24%

IPEI-N-histidine-N-Adamantane méthylamine

Rendement : 63 mg (56,3%). RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,66 (s, 1H, imidazole = $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,89 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 4,20 (large singulet (ls), 1H, CHCOOH); 3,46 (ls, 2H, CCH_2CHN); 3,02-2,75 (ls, 12H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2$), unité éthylènomone (EI) non modifiée, unité EI histidinilée et unité EI greffée adamantane); 2,75-2,64 (ls, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -histidine et $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{ad}$); 2,42 (NHCH_2Cad); 1,86 (s, 3H, adamantane); 1,61 (m, 6H, adamantane); 1,38 (s, 6H, adamantane). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): δ (ppm) = 179,33 (s, 1C, CHCOOH); 177,98 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHhist}$); 164,72 (ls, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{ad}$); 135,92 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 132,56 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 119,22 (s, 1C, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 57,15 (s, 1C, CHCOOH); 50,63 (s, 1C, ($\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{CONHhis}$)); 48,73 (NHCH_2Cad); 47,70 (ls, 2C, ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, unité EI); 46,16-

44,68 (ls, 4C, (NHCH₂CH₂NRCH₂CH₂NH, unité EI histidinilée et unité EI greffée adamantane); 45,53 (ls, 1C, NRCH₂CH₂CONHCH₂ad); 38,23 (ls, 1C, NRCH₂CH₂CONH); 36,58, s, 3C, adamantane); 35,23 (s, 1C, (C⁴NC²HNHC⁵H)CCH₂CHN); 33,68 (m, 1C, CH₂ad); 39,79 (s, 3C, adamantane); 28,89 (ls, 1C, NCH₂CH₂CONHhis); 28,16 (ls, 3C, adamantane);; 0 (s, TSP : ref).

IPEI-N-histidine méthyle ester-N-Adamantane méthylamine

Rendement : 56,2 mg (50%). RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) = 8,02 (s, 1H, C⁴NC²HNHC⁵H); 6,91 (s, 1H, C⁴NC²HNHC⁵H); 3,43 (large singulet (ls), 2H, CCH₂CHN); 4,33 (ls, 1H, CHCOOCH₃); 3,02-2,75 (ls, 12H, NHCH₂CH₂ NRCH₂CH₂), unité éthylènimine (EI) non modifiée, unité EI histidinilée et unité EI greffée adamantane); 3,17 (m, 4H, NCH₂CH₂CONH); 2,86 (ls, 3H, CHCOOCH₃); 2,8 (lm, 2H, NRCH₂CH₂); 2,70 (NHCH₂Cad); 2,42 (ls, 2H, NCH₂CH₂CONH); 2,14 (ls, 2H, NCH₂CH₂CONH). 1,91 (s, 3H, adamantane); 1,59, (m, 6H, adamantane); 1,43 (s, 6H, adamantane).

I-4. 6 Modification de la lPEI-N-histidine 21% par de l'arginine-N-acryloyle

Typiquement, dans un monocol de 10 mL, équipé d'un réfrigérant, 500 mg de IPEI-N-histidine (11,6 mmol en unité éthylènimine ou EI) sont dissous dans 0,348 ml d'eau. A ce mélange est additionnée, 602 mg de la L-arginine-N-acryloyle (2,8 mmol). Le pH de la solution est ramené à 7 par l'ajout de 0,1 ml de soude à 0,5M. La modification est menée, sous agitation, durant 48 heures à 100°C (figure 2-13).

En fin de réaction, le mélange réactionnel est alors refroidi puis l'eau est lyophilisée. La poudre jaunâtre est reprise dans de l'eau MiliQ et placée dans un boudin à dialyse, Spectrapore 1000WCO membranes pendant 24 heures. L'eau est lyophilisée pour obtenir une poudre jaune. La structure obtenue est déterminée par RMN (¹H, 2D homonucléaire) et sa masse molaire est déterminée par SEC.

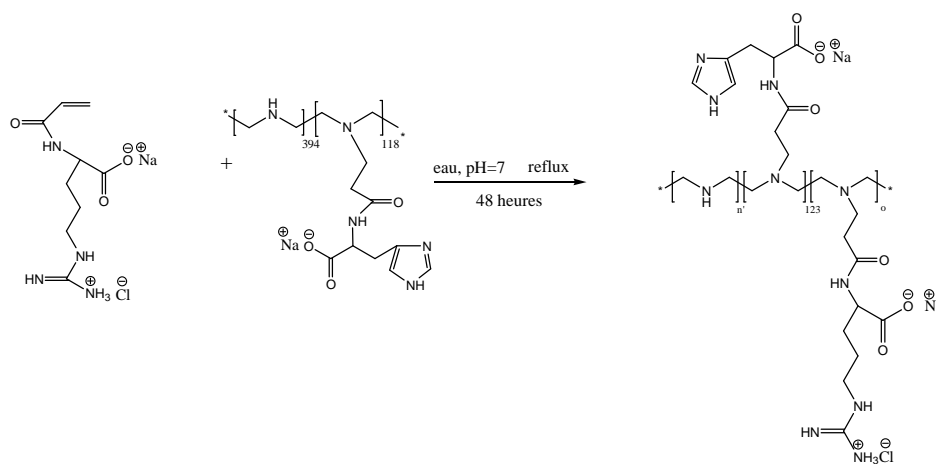


Figure2-13 : Réaction de modification de la IPEI-N-his 21% par de l'arginine-N-acryloyle

Rendement : 30,7 (53%). RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) = ,02 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 6,91 (s, 1H, $\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H}$); 4,3 (s, 1H, $\text{CONHCHCH}_2(\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H})\text{COO}$); 3,92, (lm, 1H, $\text{CONHCH}(\text{COO})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$); 3,62-2,56 (lm, 2H, $(\text{NRCH}_2\text{CH}_2)$, unité éthylèneimine (EI non modifiée, EI greffée arginine et EI greffée histidine); 3,55 (ls, 1H, NHCHCOOH); 3,14 (1H, $\text{CH}_2\text{CONHCHCH}_2(\text{C}^4\text{NC}^2\text{HNHC}^5\text{H})$); 2,72 (lm, 4H, $\text{NRCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 2,60 (ls, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$); 1,84 (bs, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{N}_2\text{H}_3)$); 1,67 (ls, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{N}_2\text{H}_3)$).

II – Techniques d'analyse

II-1 – Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN)

II-1. 1 RMN du proton (^1H)

Les analyses RMN ^1H ont été enregistrées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 MHz. L'expérience utilisée pour les analyses RMN 1H est zg30 obtenue avec 128 scans. Pour obtenir les expériences RMN 2D homo-nucléaire et hétéro-nucléaire, les paramètres appliqués sont ABSL=1 et ISEN=500.

II-1. 2 RMN du carbone (^{13}C)

Les analyses RMN ^{13}C ont été enregistrées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 75 MHz. Le nombre de scans utilisé pour ces expériences est de 4000 ou 16000 scans (^{13}C inversagate : zgig).

II-1. 3 Généralités sur les expériences de RMN

Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm). Par ailleurs la calibration des spectres est réalisée en utilisant comme référence l'acide triméthyle silyle 3 propionique 2, 2, 3, 3, sodium (TMP). Le tableau 2-3 répertorie tous les déplacements en proton résiduel et en carbone des solvants deutéré ayant servi aux analyses effectuées.

Tableau 2-3 : déplacements chimiques des molécules résiduelles protonées dans les solvants deutérés correspondants en RMN pour la calibration des spectres

	HOD	CHCl ₃	CD ₃ SO ₂ H	TMP
¹ H (ppm)	4,79	7,27	2,5	0
¹³ C (ppm)		77	43	0

II-1. 4 RMN DOSY

Les expériences RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ont été réalisées sur un spectromètre Avance 300 MHz Bruker dans le DMSO à 25°C. La calibration en température du spectromètre a été réalisée entre 298K et 313K à l'aide d'un échantillon 100% CH₃OH, la différence de déplacement chimique entre les deux pics du méthanol étant linéaire dans cette gamme de température. La force des gradients a été déterminée en utilisant un insert en plexiglass dont la taille a été mesurée avec précision (8mm \pm 0.01 de long, diamètre extérieur de l'insert égal au diamètre intérieur du tube RMN) ; l'insert est immergé dans un tube RMN contenant de l'eau H₂O très pure. La force des gradients a été déterminée en utilisant la séquence RMN calibgp et une valeur de 56.8 G/cm a ainsi été trouvée. Afin de vérifier la précision de la calibration en température et des gradients, une expérience DOSY a été réalisée sur un tube RMN contenant un mélange de H₂O/D₂O (10%/90% en moles) dont le coefficient de diffusion a été publié par Weingärtner and *al.* ($1.935 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Notre mesure de coefficient de diffusion sur ce tube a donné une valeur de $1.934 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Le parfait accord entre les deux valeurs a confirmé la précision des réglages du spectromètre RMN. Les expériences DOSY ont été réalisées en utilisant la séquence stepg1s avec 16 expériences et en faisant varier le pourcentage de gradient entre 5% et 95%. Avant chaque expérience, les temps de relaxation ont été mesurés puis les temps de gradient et de diffusion ont été optimisés.

II-2 - Spectrométrie de masse (ESI/MS)

L'appareil utilisé pour les mesures de spectrométrie de masse en ionisation electrospray est un spectromètre API2000.

Les produits sont solubilisés, à une concentration de 1.10^{-4} M, dans de un milieu aqueux du méthanol.

II-3 - Dosage en retour des polycations

La IPEI n'étant pas soluble dans l'eau basique, un dosage en retour sur les polyamines est réalisé. Dans un bécher, 0,23 mmol d'amine secondaire en unités EI des polymères (IPEI, IPEI histidinylée) sont pesés précisément. 9 ml d'eau distillée à pH=9 sont ajoutés puis 3 ml d'HCl à 0,1 mol/L. Le pH de cette solution est d'environ de 2. La solution obtenue est dosée par la soude à 5.10^{-2} mol/L. L'évolution du pH est suivie à l'aide d'un système automatique de dosage LogipH, d'une électrode de référence au calomel (Tacussel) et d'une électrode de verre haute alcalinité (électrode de mesure, Tacussel XG200).

La courbe de dosage pH=f (volume de soude ajoutée) est tracée et le pKa moyen est déterminé par la méthode des dérivées.

II-4 - Solubilité et masse molaire des polymère et détermination des diamètres des polyplexes par diffusion de la lumière dynamique

II-4. 1 Condition

III-4. 1. 1 Solubilité et masse molaire des polymères

La solubilité et les masse molaires des différents polymère sont déterminées par nano zétasizer (Malvern Instruments, France, laser rouge = 633 nm, angle=173°) utilisant la diffusion de la lumière dynamique, d'après la diffusion des polymères.

Cet appareil est aussi utilisé pour estimer les masses molaires des polymères, utilisant la dispersion des solutés à diverse concentration d'échantillon polymère. Les mesures permettent d'obtenir la courbe de Debye, déterminé par l'intensité moyenne de variation des échantillons en fonction de leur concentration.

L'interception de l'extrapolation à la concentration nulle peut être calculée. Le paramètre qu'il faut déterminer au préalable est la variation de l'indice de réfraction du polymère dans la solution aqueuse (dn/dc) déterminée par SEC. Ce paramètre entre dans le calcul de la masse molaire.

III-4. 1. 1 Détermination des diamètres des polyplexes polymère/plasmide

Un ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France, laser = 204 nm), utilisant aussi la diffusion de la lumière dynamique à permis pour obtenir les diamètres des polyplexes vecteurs cationiques/ADN, d'après la diffusion des particules dans la solution HEPES

II-4. 2 Protocole

Les mesures solubilité des vecteurs synthétisés sont réalisées en solution aqueuse (eau, HEPES et HEPES + 150 mM NaCl), pour une concentration de 1mg/ml de polymère.

Les mesures de tailles des complexes polymères, selon le ratio en poids) sont réalisées dans 1 mL de tampon 60 mM HEPES pH=7,4, en présence et en absence de 150 mM de NaCl.

Les mesures de masse molaire des polymères sont réalisées en solution aqueuse, avec six concentrations différentes de produits, (3 mg/mL, 2,75 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2 mg/mL, 1,75 mg/mL et 1,5 mg/mL).

II-5 - Le potentiel zêta

II-5. 1 Condition

Les zétasizer de la société Malvern (nano zétasizer) sont aussi utilisés pour caractériser le potentiel zêta des polymères et des polyplexes.

Les potentiels zêta des nouveaux polymères est déterminé par un nano zétasize series (Malvern Instruments, France, laser rouge = 633 nm, angle=173°), tandis que ceux des polyplexes sont obtenus par le ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France, laser = 204 nm).

Le potentiel zêta est mesuré en appliquant un champ électrique à travers une dispersion de polymères (ou complexes). Les particules dans la dispersion avec un potentiel de zêta émigreront vers l'électrode de la charge opposée avec une vitesse proportionnelle à l'importance du potentiel de zêta. Cette vitesse est mesurée utilisant la technique de l'anémométrie de laser Doppler. Le déplacement de fréquence ou le

déphasage d'un rayon laser d'incident provoqué par ces particules mobiles est mesuré comme mobilité de particules, et cette mobilité est convertie en potentiel de zêta en entrant la viscosité de dispersant, et application des théories de Smoluchowski et de Huckel.

II-5. 2 Protocole

Les mesures de potentiel zêta des vecteurs synthétisés sont réalisées en solution aqueuse, pour une concentration de 1mg/ml de polymère.

Les mesures de tailles des complexes polymères (selon le ratio en poids) sont réalisées dans 0,7 mL de tampon 60 mM HEPES pH=7,4.

II-6 - Chromatographie d'extrusion stérique (CES ou SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée sur deux colonnes analytiques, cationiques, monté en série, de type CAT 1000 et CAT 100 de la société E Progen Inc.

La chaîne SEC comprend une pompe shimadzu LC10Ai, un injecteur automatique SIL-20A, un détecteur spectrophotométrique (DDL, MALLS), un détecteur de viscosité (Viscostar II, Wyatt Technology Corp) et un détecteur réfractométrique différentiel (RID 10 A Shimadzu). L'injection des différents polymères (10mg/mL) est réalisée à partir d'une solution de produit dissous dans un éluant aqueux de LiNO₃ 0,1 mol/L, pH 5,5 (filtré sur 0,1µm).

L'exploitation des résultats s'effectue grâce à l'interface d'acquisition et au logiciel Astra 5.3.4.14. La méthode de calcul choisie est "Zimm ordre 1" avec les angles compris entre 52 et 142°.

III – Protocoles biologiques

III-1 - Gels d'électrophorèse

III-1. 1 Généralité sur l'électrophorèse

Pour déterminer la quantité de polymère nécessaire à une complexation complète de l'ADN, une électrophorèse est effectuée.

Le principe de l'électrophorèse réside dans le fait que l'on dépose sur un gel d'agarose de l'ADN chargé négativement et qu'il migre vers un pôle positif par application d'une tension électrique sur le gel. Si le plasmide est complexé à un polymère cationique, il devient plus gros et ne peut plus migrer dans les pores du gel. En faisant varier la quantité de polymère par rapport à la quantité du plasmide utilisé, c'est-à-dire en faisant varier le rapport N/P (quantité d'azote protonée provenant du polymère sur la quantité de phosphate présent dans l'ADN), on peut déterminer la quantité minimale de polymère nécessaire pour condenser le plasmide.

Pour visualiser l'ADN et le complexe, le bromure d'éthydiuim est utilisé. C'est un composé qui devient fluorescent lorsqu'il s'intercale entre les paires de bases de l'ADN. Il faut signaler qu'à très forte condensation, le marqueur fluorescent ne s'intercale plus dans l'ADN et les complexes ne plus visibles sous la lampe UV.

III-1. 2 Formation du gel retard d'agarose 6%

Les gels d'électrophorèse qui sont utilisés sont réalisés avec une concentration d'agarose de 6%.

3 g d'agarose sont solubilisés à chaud dans 50ml de tampon TEB (tris borate EDTA : 89 mM Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane), 89 mM d'acide borique, 2 mM EDTA, pH = 8,3). Après solubilisation totale de l'agarose, le mélange est refroidit et le bromure d'éthydiuim y est ajouté. Ensuite le gel est coulé sur une plaque.

III-1. 3 Protocole

- La capacité des vecteurs à former des complexes avec le plasmide pADN (pT11033-luc, 9514 pb de Trangène SA, Strasbourg, France) est examinée par électrophorèse à 90 mV. Le gel d'agarose (0,6%) contient le bromure d'éthydiuim.
- Pour obtenir la formation d'un complexe vecteur/ADN contenant 1µg d'ADN, pour un rapport en poids w/w = 6/1, il faut :
 - o Dans un épendorf, ajouter 6 µl de polymère à 1 mg/ml dans 6 µl de tampon Hepes 10 mM pH 7,4.
 - o Dans un autre épendorf, prendre 1 µl de plasmide (1µg/µl) et ajouter 1µl de de tampon Hepes 10 mM pH 7,4.
 - o Additionner la solution de polymère dans la solution du plasmide, mélanger 3 fois avec la pipette.
 - o vortexer 4s et laisser reposer 30 min à température du labo.

- Ajouter 5µg de bleu de charge ou BET (pour localiser l'ADN, par fluorescence)
- Mettre le mélange de polyplexes dans les puits du gel retard

La formation des polyplexes a été examinée pour les ratios w/w vecteur/ADN de 1/1 à 8/1. La complexation du plasmide est démontrée par le manque complet de migration de l'ADN.

III-2 - Transfection in vitro

Le plasmide (pADN) utilisé pour les tests *in vitro* est le plasmide pTG11033-luc possédant 9514 pb (de Trangène SA, Strasbourg, France) contenant le gène codant pour la luciférase dont l'expression est sous la dépendance du promoteur du cytomégalo virus CMV.

III-2. 1 Test luciférase

Le principe du test repose sur l'oxydation de la luciférine par la luciférase avec émission d'un photon.

En ajoutant de la luciférine au lysat des cellules transfectées, il est ainsi possible de mesurer la quantité de lumière émise et d'évaluer l'expression du gène luciférase c'est-à-dire l'efficacité de la transfection.

Les tests se font avec deux ratios de polymères ajoutés au plasmide. Ces quantités ont été préalablement déterminées par électrophorèse.

III-2. 2 Protocole de transfection

Les tests de transfection ont été réalisés pour des ratios vecteur/ADN de w/x=3/1 et 6/1.

Pour obtenir la formation d'un complexe /ADN contenant 7,5µg d'ADN, pour un rapport en poids w/w = 1/6, il faut :

- Ajouter 90 µl de polymère à 1 mg/ml dans tampon Hepes 10 mM pH 7,4 dans 7,5 µg de plasmide ADN préparé dans 100 µl de tampon Hepes 10 mM pH 7,4
- vortexer 4s et laisser reposer 30 min à température du labo.
- Ajuster à 1,5 ml avec du milieu de culture avec 10% sérum

L'efficacité du transfert de gène par les polyplexes est évaluée *in vitro* sur les lignées cellulaires HeLa et C2C12 ; utilisant le plasmide pTG11033-luc. Les cellules, placées dans des puits de transfection sont

incubées durant 4 heures à 37°C avec 0,5 ml de polyplexes (contenant 2,5 µg de pADN) dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fœtal. Ensuite, le milieu de culture est changé et remplacé par un milieu de culture fraîchement réalisé sans polyplexes.

L'activité luciférase est mesurée au bout de 48 heures de culture avec un luminomètre ($\lambda_{ex}=488$ nanomètre) et exprimée en RLU/mg de protéines.

Chapitre 3 :

Synthèse de dérivés de poly(éthylènimine) linéaire

Depuis 1987, les peptides sont utilisés pour obtenir des vecteurs efficaces en transfection, notamment en présence de chloroquine, mais ils présentent une toxicité peu compatible avec une application *in vivo*¹¹⁷. Le premier polypeptide utilisé pour cette application est la poly(L-lysine)¹⁰⁵. Un greffage d'histidine sur cette macromolécule a permis une diminution de la toxicité du polymère initial¹²¹ en améliorant les performances de transfection. L'objectif de cette partie est de réaliser des vecteurs synthétiques à base de poly(éthylènimine) linéaire (IPEI), modifiée par différents greffons, le but étant de diminuer la toxicité du polymère, en améliorant les performances de transfection de ce matériau. Ces synthèses sont conduites en utilisant la réaction de Michael, entre une fonction acrylamide ou ester activée et une fonction amine de la IPEI. La première étape de ce travail est dédiée à la démonstration de la réaction de Michael par utilisation de composés modèles de faible masse molaire, pouvant être facilement analysés selon les techniques usuelles. Ce travail sera ensuite étendu à la IPEI, polymère d'intérêt, et différents type de greffons (possédant des résidus histidines, arginines, adamantanes ...). Enfin, nous évaluerons la possibilité de conduire un double greffage sur la IPEI. Un effort particulier sera porté au cours de ce travail à l'étude d'éventuelles réactions secondaires pouvant intervenir au cours des étapes de greffage.

I – Synthèse des précurseurs

I-2 – Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle

La modification de la fonction amine par le chlorure d'acryloyle est conduite selon la réaction suivante (figure 3-1)¹⁸⁵.

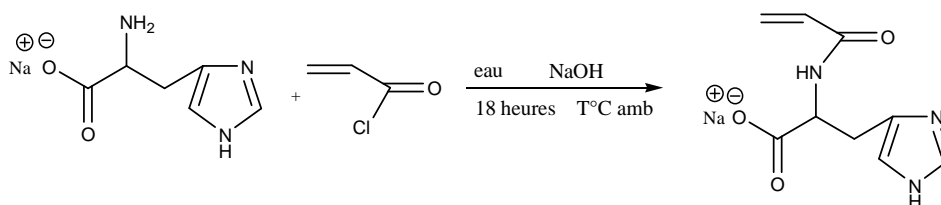


Figure 3-1 : Schéma de synthèse de la L-histidine-N-acryloyle

L'acide aminé est modifié en présence du chlorure d'acryloyle en milieu aqueux par une réaction d'addition élimination. La figure 3-2 montre l'état de protonation de la L-histidine en fonction du pH, et la nécessité de conduire cette réaction en milieu basique.

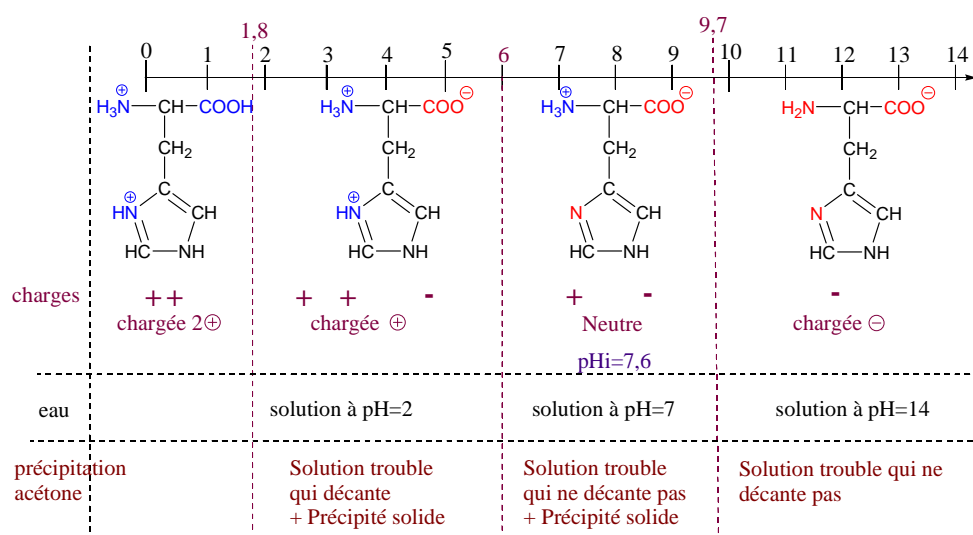


Figure 3-2 : Résultats des tests de précipitation de la L-histidine dans l'acétone en fonction du pH du mélange et de la forme protonée de l'acide aminé

Au début de la synthèse, le pH est de 14, et diminue jusque pH = 6-7 en fin de réaction. L'histidine est séparée de l'histidine-N-acryloyle par précipitation d'une solution aqueuse à pH=2 dans l'acétone puisque la charge globale de la L-histidine-N-acryloyle est nulle, alors que l'histidine est chargée positivement à ce pH (figure 3-2).

Deux précipitations doivent être menées afin d'éliminer l'acide acrylique résiduel mis en évidence par la présence d'un pic à 5,92 ppm par RMN ¹H. Le spectre RMN ¹H du produit final est présenté figure 3-3. La présence du produit attendu est mise en évidence par l'apparition de pics à 8,27, pour le proton de l'amide, et, entre 6,32 ppm et 5,61 ppm, pour les protons de la double liaison acryloyle. La présence d'un pic à 4,2 ppm, pour toutes les réactions réalisées, doit être mentionnée, son explication sera traitée plus loin dans ce manuscrit.

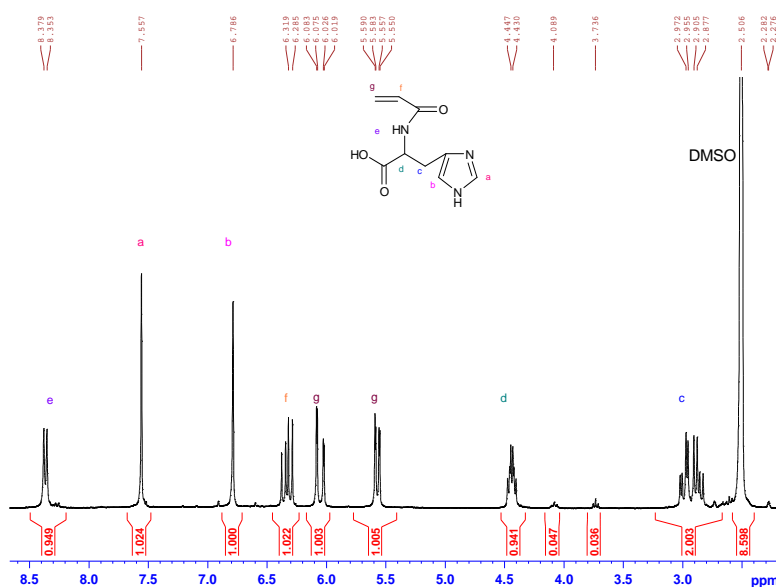


Figure 3-3 : Spectre RMN ¹H de la L-histidine-N-acryloyle (EB128e) dans le DMSO-d₆ à 25°C, ([EB128e]=20 mg/ml)

Le spectre de masse (figure 3-4) obtenu par ESI-MS confirme cette analyse. Il met en évidence essentiellement deux pics à m/z 210,2 uma et 232,2 uma attribués à la L-histidine-N-acryloyle, respectivement monochargés en proton et sodium.

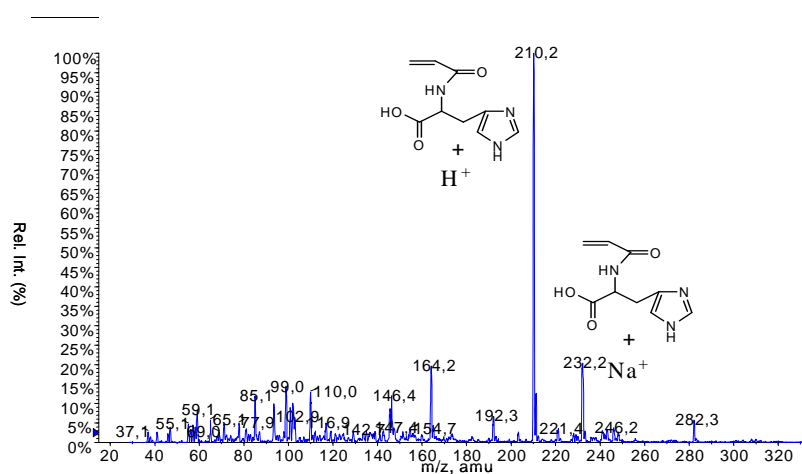


Figure 3-4 : Spectre ESI-MS de l'histidine-N-acryloyle dans H₂O ([EB128a]=1.10⁻⁴ mol.L⁻¹)

Le premier protocole, adapté des travaux de Iwakura¹⁸⁵ utilisé pour cette synthèse (EB043) aboutit à un rendement de 0,5% en L-histidine-N-acryloyle, qui est jugé trop faible. Le tableau 3-1 récapitule les expériences réalisées afin d'améliorer le rendement du produit final.

Tableau 3-1 : Conditions opératoires employées lors de la synthèse de la L-histidine-N-acryloyle en milieu aqueux

Expériences	Température mélange réactionnel lors de l'addition du chlorure d'acryloyle (°C)	Temps de réaction après addition du réactif (heures)	Concentration stoechiométrique des deux réactifs (mol.L ⁻¹)	Quantité de soude (g)	Rendement* (%)
EB043 ¹⁸⁵	25	48	0,2	3	0,5
EB068 ¹⁸⁶	5	48	0,2	3	3
EB069	5	24	0,2	3	1,1
EB073	5	24	0,66	3	3,6
EB091	5	18	0,66	3	23 non reproductible
EB094	5	18	2	3	Très faible ou nul
EB096 ¹⁸⁷	5	18	2	1	43

* rendement déterminé après double précipitation dans l'acétone.

Lorsque la température de la solution aqueuse de L-histidine est abaissée à 5°C lors de l'addition du chlorure d'acryloyle, nous observons une légère augmentation du rendement (EB068)¹⁸⁶. Une diminution du temps de réaction a aussi permis une légère amélioration du rendement. Enfin, l'augmentation des concentrations en réactif (EB091) et la diminution de la quantité de soude ajoutée (EB096) ont permis d'obtenir un rendement de 43 %, reproductible.

I-3 - Synthèse de la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle

La L-histidine méthyle ester est insoluble dans l'eau à pH=14. La réaction d'addition élimination de la L-histidine méthyle ester est réalisée dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine. La solution de L-histidine méthyle ester et de triéthylamine est placée à 5°C, puis le chlorure d'acryloyle est ajouté lentement (figure 3-5)¹⁸⁷. La réaction est alors conduite durant 48 heures.

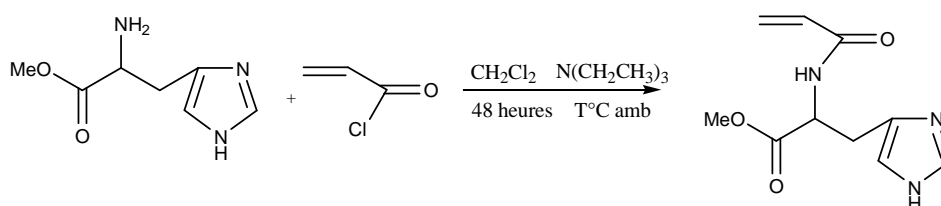


Figure 3-5 : Schéma de synthèse de l'histidine méthyle ester-N-acryloyle

Le produit de la réaction est ensuite purifié par une extraction eau-acétate d'éthyle. Ensuite, la partie organique est analysée par RMN ¹H (figure 3-6), RMN ¹³C et ESI-MS (en annexe). Le rendement de la réaction est de 35%.

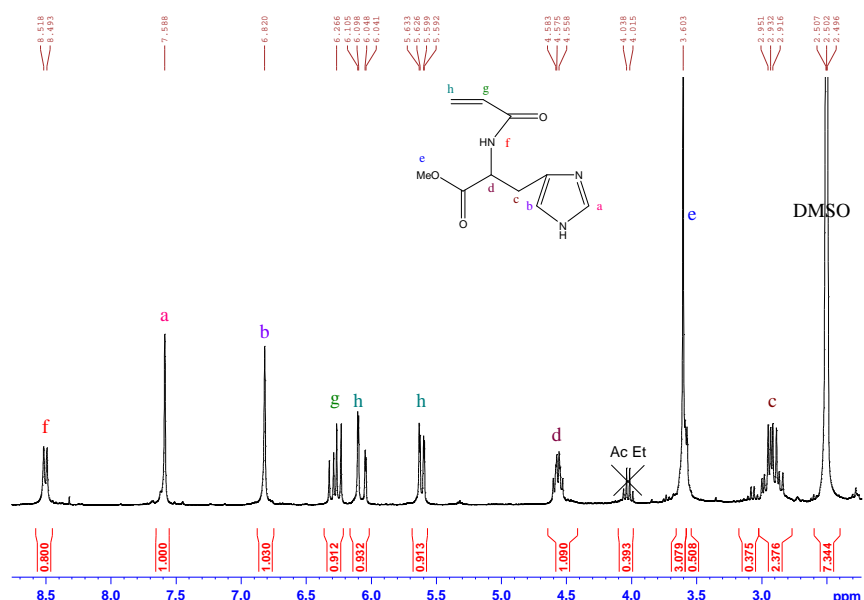


Figure 3-6 : Spectre RMN ^1H la *L*-histidine méthyle ester-*N*-acryloyle (EB061a) dans DMSO- d_6 à 25°C, ([EB061a]=20 mg/ml)

I-4 - Synthèse du 1-adamantane éthanol-*O*-acryloyle

La réaction d'addition-élimination entre le 1-adamantane éthanol et le chlorure d'acryloyle est réalisée dans le THF contenant de la triéthylamine, durant 48 heures à température ambiante (figure 3-7).

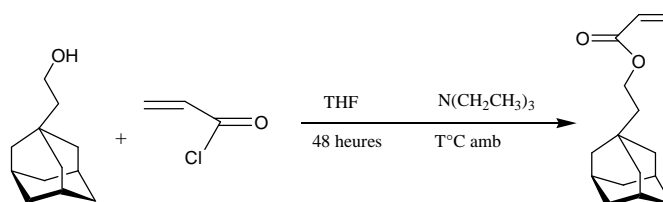


Figure 3-7 : Schéma de synthèse du 1-adamantane éthanol-*O*-acryloyle

A la fin de la réaction, le produit est purifié par une extraction dichlorométhane-eau carbonate de soude saturé. La fraction organique est séchée et le produit obtenu est caractérisé par RMN ^1H (figure 3-8), RMN ^{13}C et ESI-MS.

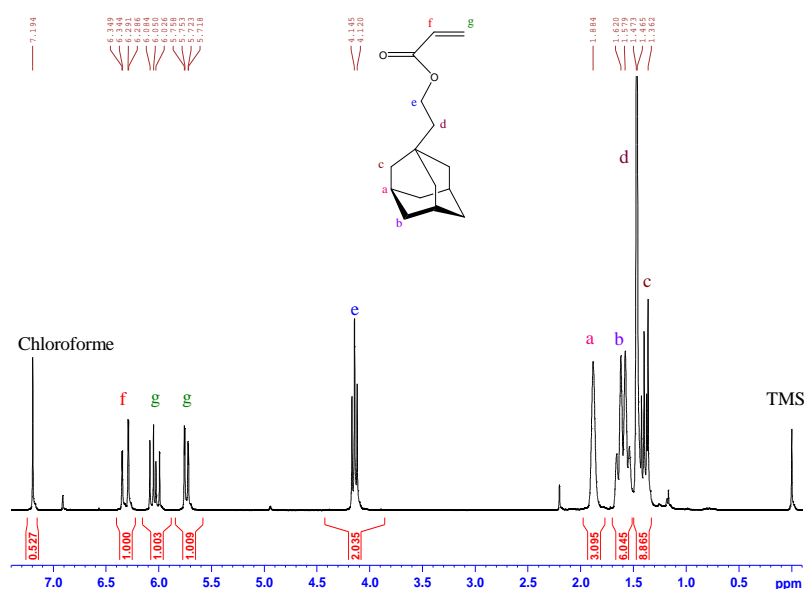


Figure 3-8 : Spectre RMN ^1H du 1-adamantane alcool-O-acryloyle (EB014a) dans CDCl_3 à 25°C , ([EB014a]=20 mg/ml)

L'analyse RMN ^1H du produit pur, le 1-adamantane éthanol-O-acryloyle, est confirmée par la spectrométrie de masse (ESI-MS). Le pic observé à $m/z=257,2$ est attribué au composé 1-adamantane éthanol-O-acryloyle sous la forme monochargée par un cation sodium (figure 3-9). Le pic à 491,4 amu est attribué à deux molécules du 1-adamantane éthanol associées à un cation sodium. Le pic à 355,3 amu peut être dû à une impureté provenant du spectromètre ; en effet aucune combinaison entre les molécules (entière et dégradée) associées à différents cations ne correspond à cette masse.

Cette synthèse a donné un rendement de 93%, elle est quasiment totale.

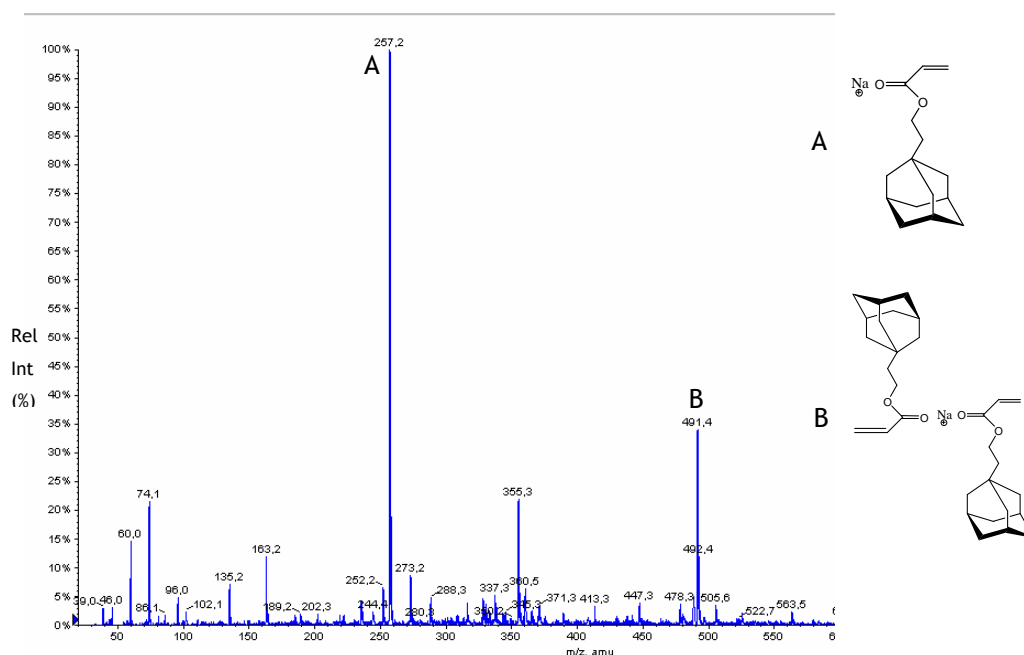


Figure 3-9 : Spectre ESI-MS du 1-adamantane éthanol-O-acryloyle ([EB014a]= 1.10^{-4} mol.L $^{-1}$)

I-4 - Synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle

La synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (figure 3-10) est réalisée dans les mêmes conditions que pour le produit précédent.

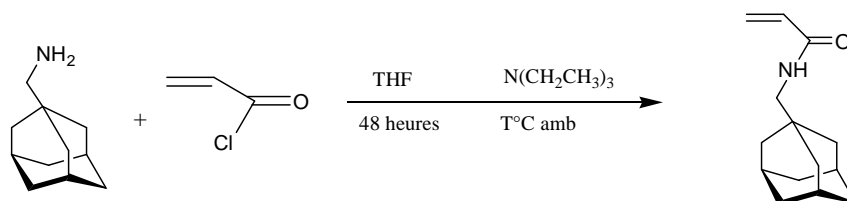


Figure 3-10 : Schéma de synthèse du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle

Après l'extraction chloroforme-eau, la fraction organique est analysée par RMH 1H (figure 3-11), RMN ^{13}C et ESI-MS. L'attribution RMN est effectuée par un spectre COSY.

Le rendement déterminé est de 96%.

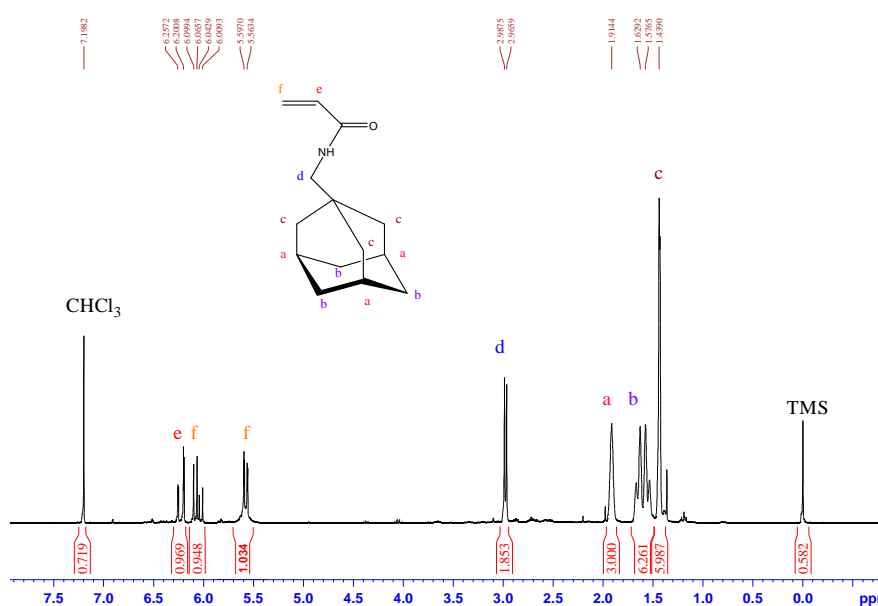


Figure 3-11 : Spectre RMN 1H du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle (EB016a) dans $CDCl_3$, à 25°C, ([EB016a]=20 mg/ml)

I-6 - Synthèse de la L-arginine-N-acryloyle

Un deuxième acide aminé, la L-arginine, est modifié en L-arginine-N-acryloyle. En effet, l'oligoarginine montre un intérêt dans une application de ciblage dans le muscle^{48, 188, 189}. La réaction

d'addition-élimination (figure 3-12) est effectuée pendant 18 heures dans l'eau à pH=11,5, pour éviter la fixation de l'acryloyle sur le groupement guanidium de l'arginine¹⁸⁷. A ce pH, ce groupement est protoné (pKa = 13,2), empêchant toute réaction secondaire, tandis que l'amine primaire (pKa=9,2) se trouve sous sa forme amine, ce qui rend favorable la réaction d'addition-élimination avec le chlorure d'acryloyle.

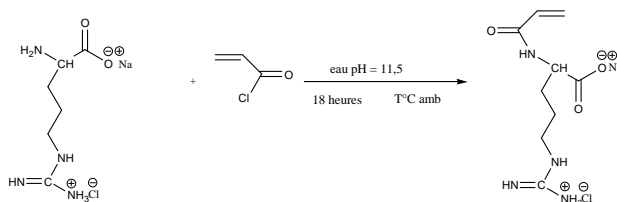


Figure 3-12 : Schéma de synthèse de la L-arginine-N-acryloyle

A la fin de la synthèse, le produit est purifié par double précipitation dans l'acétone, adapté du protocole de purification de la L-histidine-N-acryloyle (chapitre 2 paragraphes I - 2.6) puis analysé par RMN ¹H (figure 3-13), RMN ¹³C et ESI-MS.

Ce spectre RMN ¹H révèle aussi un pic à 3,85 ppm, caractéristiques de la L-arginine résiduelle.

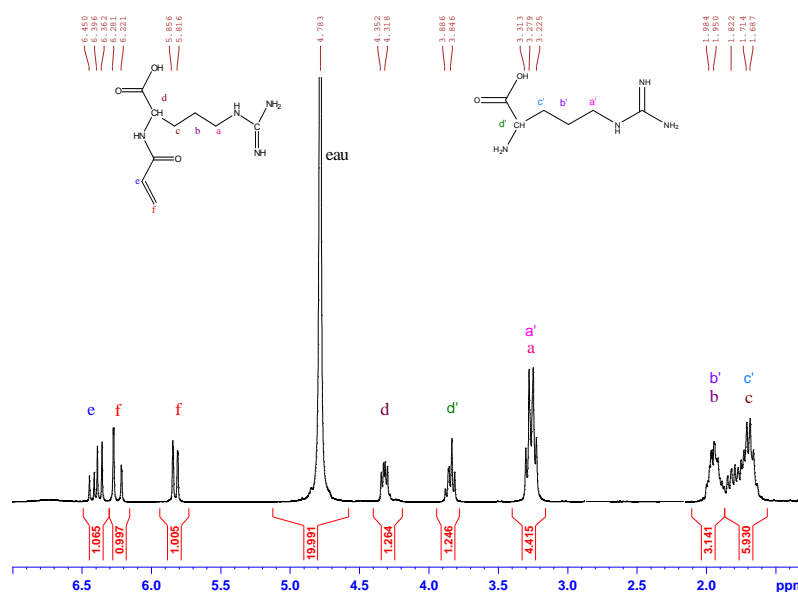


Figure 3-13 : Spectre RMN ¹H de l'arginine-N-acryloyle (EB101d) réalisé dans D₂O à 25°C, ([EB101d]=20 mg/ml)

Le rendement de récupération est de 30%, dont 50% de L-arginine résiduel. Des purifications par extraction (eau/chloroforme, eau/chlorure de méthylène et eau/THF ...) ont été réalisées, de façon à permettre l'obtention de larges quantités de produit. Seule une chromatographie aurait permis une complète purification du produit. L'arginine n'intervenant pas dans l'étape suivante de la synthèse, et pouvant être facilement éliminée à cette deuxième étape, la séparation arginine-N-acryloyle n'a pas été poursuivie.

II – Modification des polymères

II-1 – Modification de la poly(2-éthyle-2-oxazoline)

II-1 .1 Synthèse de la lPEI

Le précurseur des nouveaux polymères histidinilés est la poly(éthylènimine) linéaire obtenue à partir de la poly(2-éthyle-2-oxazoline)¹⁵⁵ de masse molaire $M_w=50000 \text{ g.mol}^{-1}$, $I_p=3-4$. Le protocole de synthèse est adapté du travail de Brissault¹⁵⁵.

L'hydrolyse acide de la pEtOx (figure 3-14) est conduite durant 48 heures à 100°C en présence d'HCl concentré (37%).

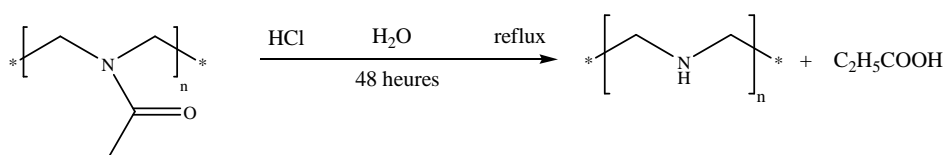


Figure 3-14 : Schéma de synthèse de la poly(éthylènimine) linéaire

Après purification du produit, l'analyse RMN ¹H dans D₂O/TFA 1%, met en évidence la disparition des pics à 2,29 et 1 ppm des motifs oxazoline pour ne révéler qu'un seul pic à 3.28 ppm (figure 3-15).

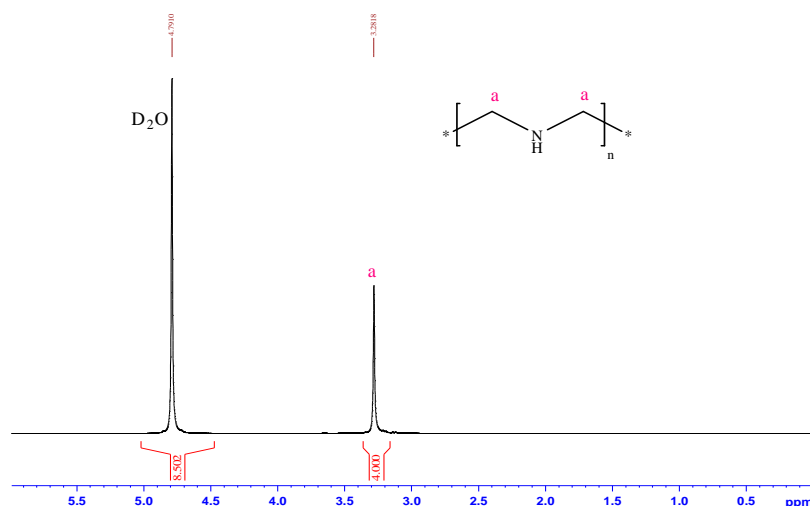


Figure 3-15 : Spectre RMN ¹H de la poly(éthylènimine) linéaire (EB017) dans D₂O contenant 5µl de TFA à 25°C, ([EB017]=20 mg/ml)

Des expériences de dosage des fonctions amine primaire par RMN ^1H ont été réalisées. Le principe est une réaction sélective entre les fonctions amine primaire et un dérivé facilement dosable par RMN ^1H . La masse molaire élevée du polymère n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Il est à noter que la littérature ne rapporte pas de réaction de dégradation de la IPEI au cours de sa synthèse à partir de la p(EtOx)^{136, 190-192}.

II-1 .2 Hydrolyse partielle de la poly(2-éthyle-2-oxazoline)

Le tableau 3-2 regroupe un ensemble d'expériences mettant en évidence l'influence du temps d'hydrolyse acide sur le taux de modification de la poly(2-éthyle-2-oxazoline). Les concentrations en polymère et en acide chlorhydrique sont fixes.

Tableau 3-2 : Conditions et résultats de l'hydrolyse de la poly(2-éthyle-2-oxazoline) dans H_2O en présence d' HCl (12N), à 100°C , à différents temps de réaction. ($[\text{PmEOx}] = 1,7 \text{ mmolL}^{-1}$)

Expériences	Temps de réaction (heures)	Rendement (%)	Taux d'hydrolyse (%)
EB180	0,5	76	5
EB189	4	90	89
EB193	5	96	90
EB001	24	96	95
EB027	48	100	100

En fin de réaction, le polymère est précipité dans l'éther, puis analysé par RMN ^1H . La réaction est totale au bout de 48 heures et le taux d'hydrolyse augmente avec le temps de réaction.

II-2 - Modification de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle

Dans un premier temps, il est nécessaire de valider la réaction de Michael entre la L-histidine-N-acryloyle et une fonction amine primaire ou secondaire, en utilisant une molécule de faible masse molaire, telle que la spermine (figure 3-16) afin de faciliter la caractérisation.

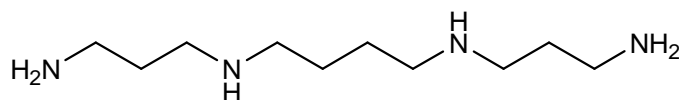


Figure 3-16 : Structure de la spermine

II-2 .1 Réaction modèle

II-2. 1. 1 Analyse de la stabilité de la spermine dans différentes conditions de stockage.

Il est connu que les sels d'ammonium peuvent subir des réactions de dégradation du type Hoffmann. Contrairement à la IPEI 22000 g mol^{-1} , la spermine est une petite molécule de masse molaire $M_n=202 \text{ g mol}^{-1}$ qui peut être caractérisée par spectrométrie de masse, devenant ainsi un bon modèle pour déterminer une possible dégradation de la IPEI. La spermine est placée en solution aqueuse à une concentration de $1,18 \text{ mol.L}^{-1}$ (concentration utilisée pour synthétiser les polymères à base de IPEI) pour trois pH différents (pH=2,3 (EB108), pH=7 (EB122), pH=8 (EB109)), durant 48 heures à 100°C .

En fin de réaction, le solvant a été évaporé, et le brut analysé par spectrométrie de masse et RMN ^1H .

Les spectres ESI-MS (figure 3-17) des produits bruts sont identiques à celui de la spermine avant traitement.

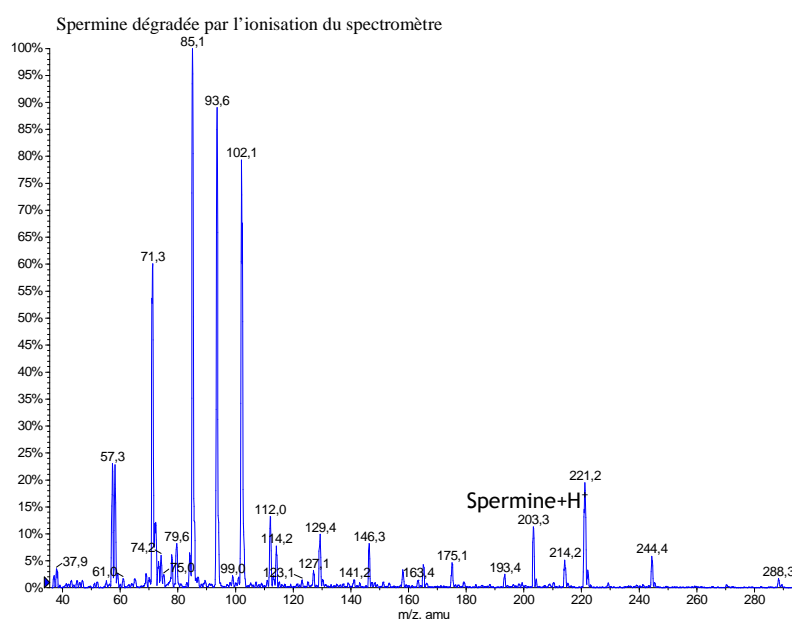


Figure 3-17 : Spectre ESI-MS après réaction à pH=2,3 (EB108) de la spermine dans l'eau à 25°C ($[\text{EB108}]=1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)

Les spectres RMN ^1H des produits traités (figure 3-18) ne présentent pas de différence avec celui de la spermine de départ, quelque soit le pH de la réaction.

La spermine ne semble pas se dégrader durant son stockage dans une solution aqueuse à 100°C, pour les trois pHs étudiés.

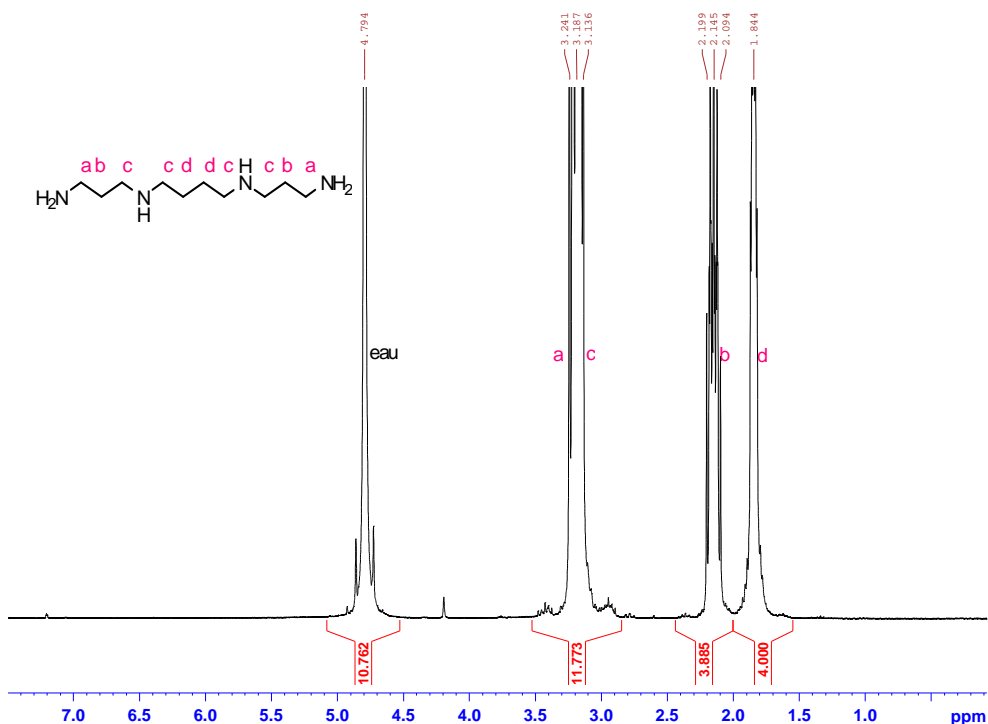


Figure 3-18 : Spectre RMN ¹H après réaction à pH=2,3 (EB108) de la spermine dans D₂O à 25°C, ([EB108]=20 mg/ml)

La stabilité de la spermine lors de conditions de réaction de Michael nous conduit à étudier la synthèse de la spermine histidinilée.

II-2. 1. 2 Analyse de la réaction modèle de Michaël entre la spermine et l'histidine-N-acryloyle

La synthèse de spermine-N-histidine (spermine-N-his) (à partir d'une solution contenant 0,18M de spermine et 0,36M de L-histidine-N-acryloyle) est conduite à 100°C durant 48 heures dans une solution aqueuse à pH=7 (figure 3-19). Après lyophilisation, le rendement de la réaction est de 98%.

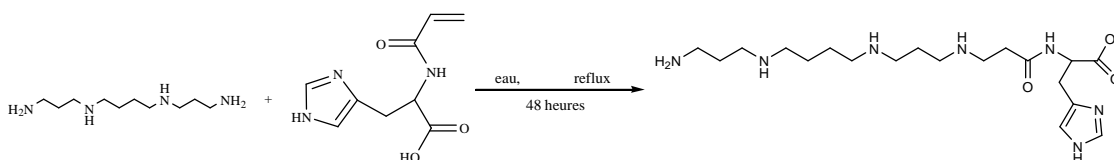


Figure 3-19 : Schéma de la réaction de Michaël de l'histidine-N-acryloyle sur la spermine

L'analyse du spectre RMN ^1H (figure 3-20) révèle la présence de nouveaux pics à 2,79 ppm et 3,38 ppm, attribués aux CH_2 provenant de l'ouverture de la double liaison, fixé sur la spermine ; ainsi que la disparition totale des signaux attribués aux doubles liaisons de la L-histidine-N-acryloyle (entre 5,5 ppm et 6,5 ppm). Les signaux sont interprétés à l'aide des spectres RMN 2D hétéronucléaire, qui permettent de conclure que la L-histidine-N-acryloyle est greffée sur les amines primaires de la spermine, selon la réaction escomptée. Le spectre RMN ^1H révèle des pics de faible intensité à 4,14 ppm, 6,72 ppm et 7,53 ppm, ne correspondant pas aux protons identifiés sur la molécule souhaitée. L'explication provient d'une réaction secondaire issue du couplage intermoléculaire entre le résidu imidazole et la fonction acrylamide de deux molécules de L-histidine-N-acryloyle.

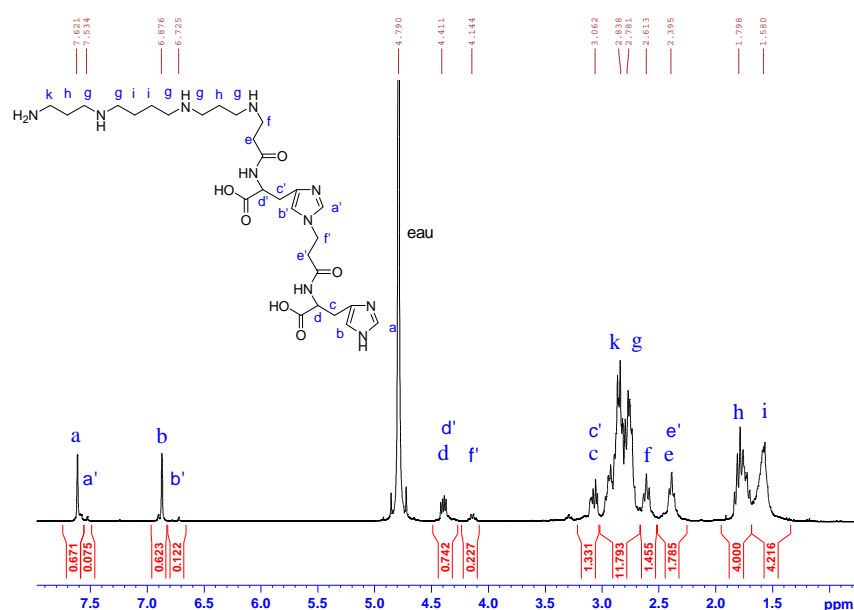


Figure 3-20 : Spectre RMN ^1H brut de la spermine-N-his (EB102) dans du D_2O pH=7, à 25°C, ([EB102]=20 mg/ml)

Le spectre COSY (figure 3-21) révèle des pics de corrélation entre les pics a (7,62 ppm) et b' (6,72 ppm) ainsi qu'une tache de corrélation entre les pics f' (4,14 ppm) et e/e' (2,32 ppm) prouvant l'homocondensation envisagée.

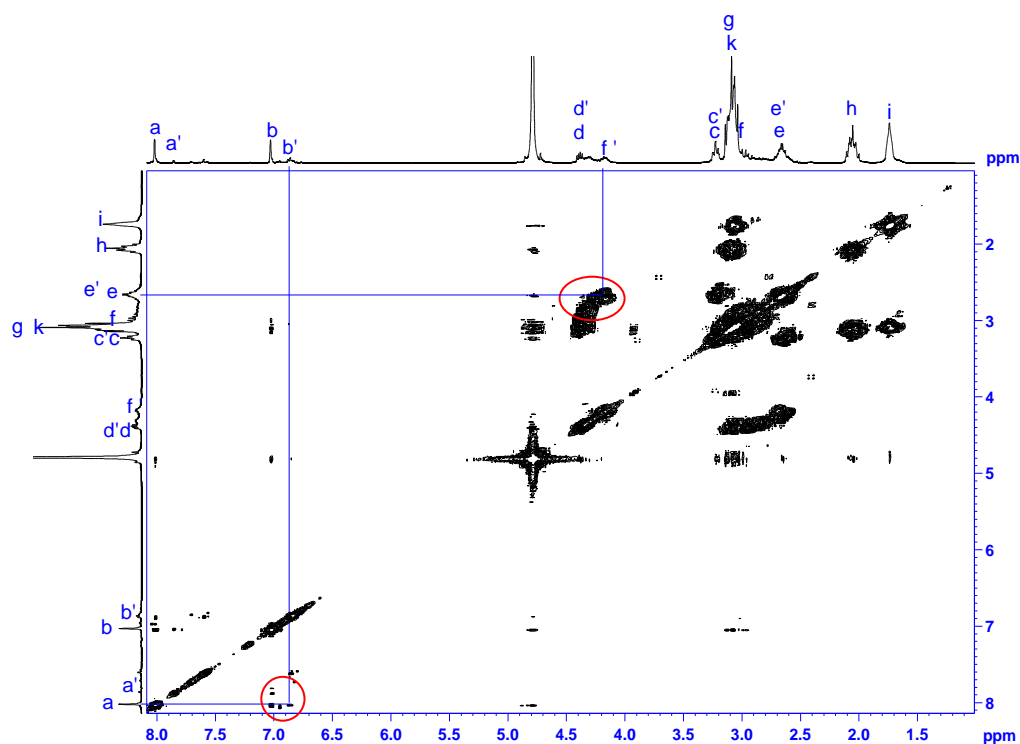


Figure 3-21 : Spectre RMN 2D COSY de la spermine-N-his (EB102 brut) dans du D₂O pH=7, à 25°C, ([EB102]=20 mg/ml)

Le produit de la synthèse de spermine-N-histidine, est alors analysé par spectrométrie de masse (ESI-MS). Le spectre ESI-MS (figure 3-22) met en évidence les pics à $m/z=206,8$ uma et $412,3$ uma qui sont respectivement attribués à la spermine-N-his dichargée et monochargée par des protons. Le spectre révèle aussi un pic à $m/z= 311,5$ amu attribué à une molécule de spermine avec deux résidus L-histidine-N-acryloyle, ou le greffage d'un dimère de la L-histidine-N acryloyle, dichargés par deux protons.

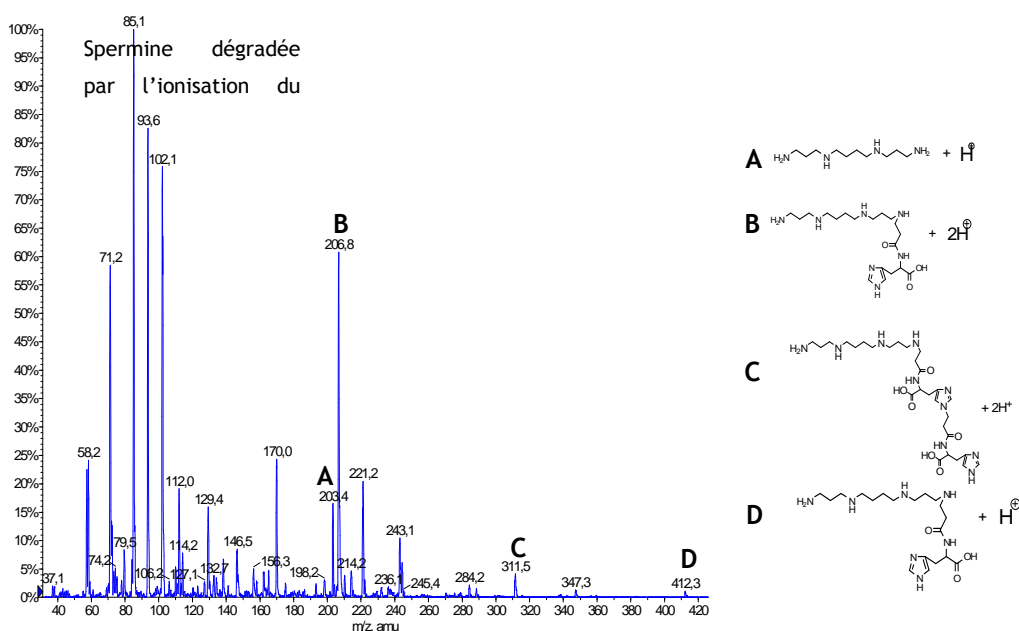


Figure 3-22 : Spectre ESI-MS brut de la spermine-N-his dans du D₂O (EB102 : synthèse réalisée à pH=7), (EB102]= 1.10⁻⁴ mol.L⁻¹)

En conclusion, nous avons démontré que la synthèse de la spermine histidinilée est réalisée par réaction de Michaël entre une fonction amine de la spermine et la fonction acryloyle de l’histidine-N-acryloyle. Nous avons pu expliquer la présence du pic à 4,24 ppm en RMN ¹H par une réaction secondaire de couplage intermoléculaire (homocondensation) entre une fonction imidazole et la fonction acryloyle de la N-histidine-N-acryloyle.

II-2. 1. 3 Analyse de la stabilité de la L-histidine-N-acryloyle

Il est connu que la L-histidine-N-acryloyle est considérée comme un monomère, permettant d’obtenir un polymère tel que la poly(L-histidine-N-acryloyle)¹⁸⁶, par polymérisation radicalaire conventionnelle de la fonction acrylamide. Nous avons placé ce monomère en solution aqueuse durant 48h à 100°C à une concentration de C=0,37 mol.L⁻¹ à pH=7. Le produit de cette réaction est ensuite analysé par RMN ¹H et ¹³C et par ESI-MS.

Le spectre RMN ¹H (figure 3-23) montre la présence des pics relatifs à la L-histidine-N-acryloyle, identiques au spectre RMN ¹H du monomère initial, ainsi que des pics à 2,06 et 4,52 (déjà observés sur le spectre RMN ¹H de la spermine-N-his, figure 3-20). L’analyse par RMN ¹³C n’a pas permis de mettre en évidence cette réaction. L’analyse RMN ¹H met en évidence une famille de pics caractéristiques d’un polyacrylamide situés entre 1 et 2 ppm. Toutefois, le faible signal mesuré nous permet de négliger cette réaction en première approche.

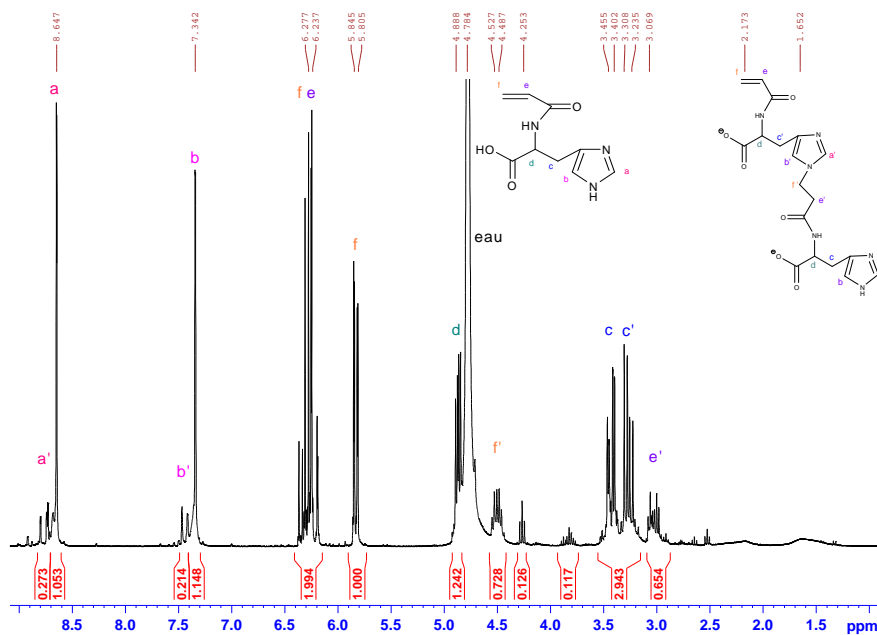


Figure 3-23 : Spectre RMN ^1H de la réaction de Michael sur la L-histidine-N-acryloyle (EB103) dans D_2O à 25°C , ($[\text{EB103e}] = 20 \text{ mg/ml}$)

Pour identifier la structure qui correspond aux pics à 3,06 et 4,2 ppm, le produit est analysé par ESI-MS (figure 3-24) : un pic à 207,6 uma correspondant au monomère initial est mis en évidence : la L-histidine-N-acryloyle, sous forme monochargée. Le spectre révèle aussi un deuxième pic d'une faible intensité (25%) à 438,40 uma, qui peut être attribué à un homocondensat de L-histidine-N-acryloyle, sous forme monochargée, associée à un cation sodium. Enfin, ce spectre révèle un pic à 301,5 uma, une molécule monochargée, attribuée au condensat (pic b) dégradé, associé à un sodium. Le pic à 532,4 uma représente aussi une molécule monochargée, attribuée à une dégradation d'un homocondensat initialement sous forme trimère.

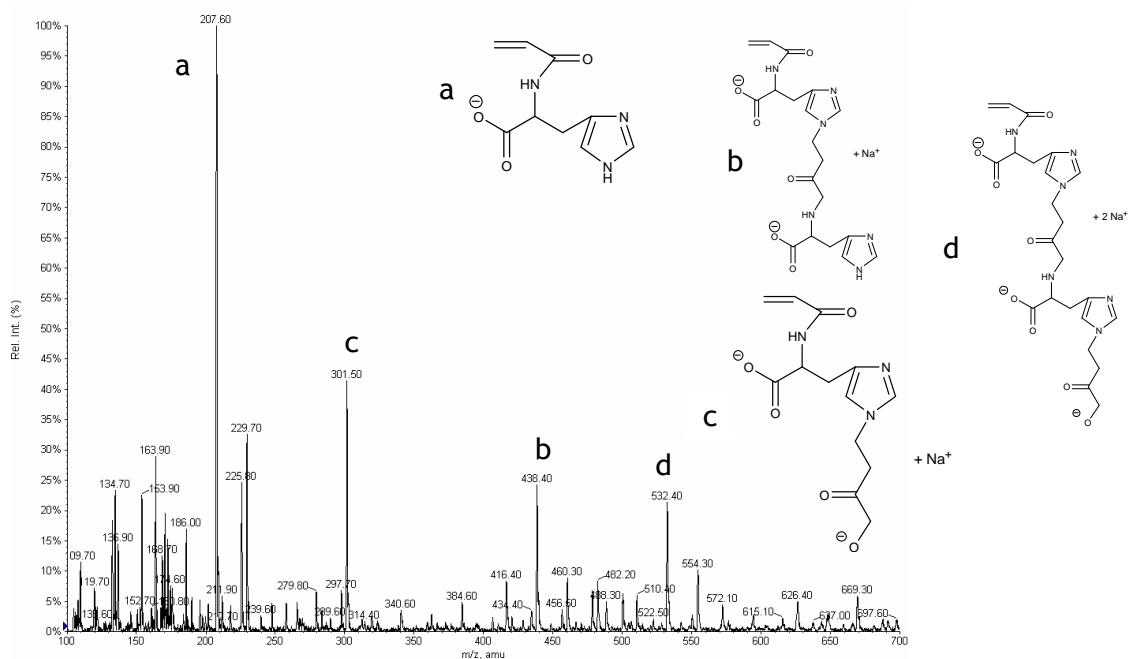


Figure 3-24 : Spectre ESI-MS de EB103 brut dans H₂O en mode anionique ([EB103]=1.10⁻⁴ mol.L⁻¹)

En conclusion, il existerait une réaction secondaire, la formation d'homopolymère par réaction de Michaël. L'analyse RMN 1H permet de déduire que la cinétique de cette réaction est lente, comparée à celle de la fonction acrylamide avec une fonction amine de la spermine. Nous ne négligeons pas dans ce travail cette réaction d'homocondensation, mais nous avons vu que la majeure partie de la L-histidine-N-acryloyle est impliquée dans la réaction de modification de la spermine.

Nous allons désormais transposer ces synthèses à la modification de la IPEI.

II-2 .2 Synthèse de la IPEI-N-his

Afin d'obtenir la IPEI greffée par des groupements histidine, la réaction de Michael entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle a été conduite en milieu aqueux, durant 48 heures à 100°C (figure 3-25). Pour cette première réaction, le pH de la solution est neutre évitant une forte concentration d'acide ou de soude dans le milieu réactionnel.

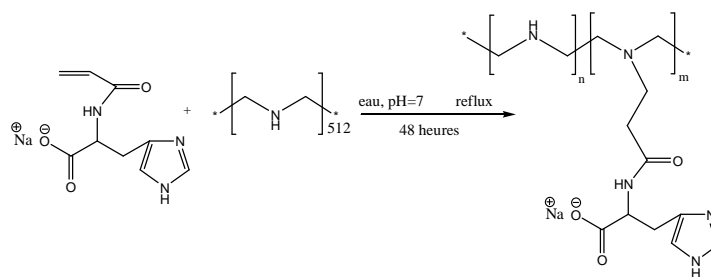


Figure 3-25 : Schéma de la Réaction d'Aza-Michaël entre la L-histidine-N-acryloyle et la IPEI

Cette Aza-Michaël (variante de la réaction de Michaël)^{193, 194} débute par l'attaque du doublet non liant de l'amine secondaire de la IPEI sur le carbone β insaturé de la L-histidine-N-acryloyle, créant la liaison covalente entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle. Un réarrangement conduit à éliminer les charges formées dans la première étape (mécanisme proposé : figure 3-26).

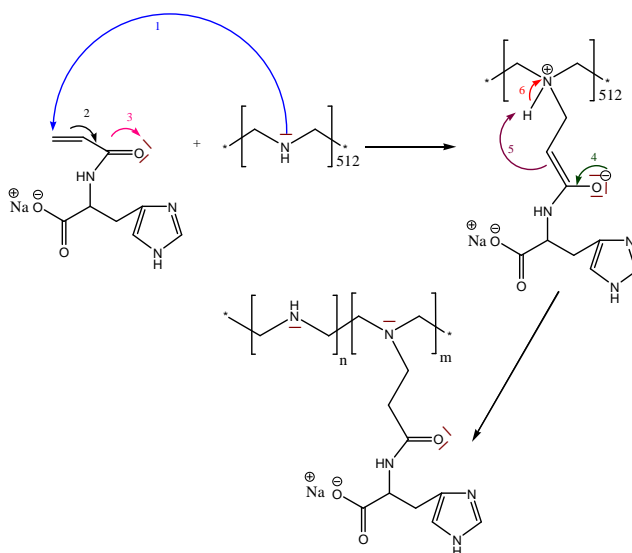


Figure 3-26 : Mécanisme de la réaction d'addition d'Aza-Michaël entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle

A la fin de la réaction, le produit est purifié par une précipitation dans 5ml de méthanol en présence de 0,5 mL d'HCl 6N, suivie d'une dialyse.

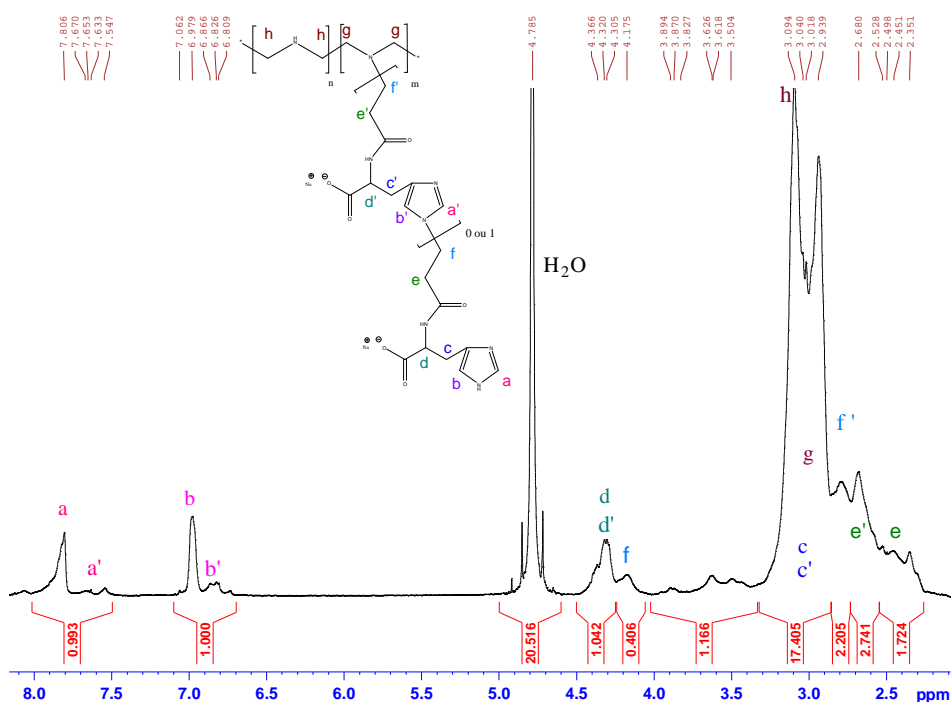


Figure 3-27 : Spectre RMN ¹H de la IPEI-N-his greffée à 19% dans D₂O pH=7, à 25°C, ([EB154a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his est schématisée.

L'analyse du spectre RMN ¹H (D₂O) (cf. : figure 3-27) révèle la présence des CH₂ des unités éthylènimine (EI) modifiées par l'acide aminé (entre 2,87 et 2,68 ppm), ainsi que les CH₂ provenant de l'ouverture de la double liaison, fixés sur la IPEI (à 2,35 ppm et 2,49 ppm). Les pics à 7,80 ppm et 7,06 ppm sont attribués à la fonction imidazole. L'attribution des pics a été facilitée par la réalisation d'une analyse RMN en deux dimensions homonucléaire (¹H-¹H) de type COSY.

L'absence de signaux entre 5,5 et 6,5 ppm attribués aux doubles liaisons de la L-histidine-N-acryloyle (présents dans le spectre RMN ¹H du produit brut) est un argument quant au greffage de la L-histidine-N-acryloyle sur la IPEI, et démontre l'élimination de la L-histidine-N-acryloyle n'ayant pas réagi.

Le spectre présente aussi trois autres pics inattendus à 4,17 ppm, 6,87 ppm et 7,54 ppm. L'origine de ces pics (démontrée au paragraphe II-2. 1. 2) est donc attribuée à une réaction secondaire intermoléculaire pouvant intervenir entre la fonction imidazole et la double liaison de la L-histidine-N-acryloyle. Les pics à 6,87 ppm et 7,54 ppm représentent les protons de l'imidazole impliqués dans la réaction entre la fonction imidazole et la double liaison de la L-histidine-N-acryloyle. Le pic à 4,17 ppm est attribué au CH₂ issu de l'ouverture de la fonction acrylamide par l'imidazole porté par le dérivé d'acide aminé. Cette réaction correspond au couplage intermoléculaire de la L-histidine-N-acryloyle dans les conditions de synthèse. Le rapport des intégrations des pics à 4,17 ppm (CH₂ d'intensité 0,56) et à 7,54 ppm (CH d'intensité 0,29) est proche de 1 ; ce qui nous indique que la cinétique de cette réaction est très inférieure à celle de la réaction de Michaël entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle.

Le spectre RMN ¹³C de EB154a (figure 3-28) confirme le greffage de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle.

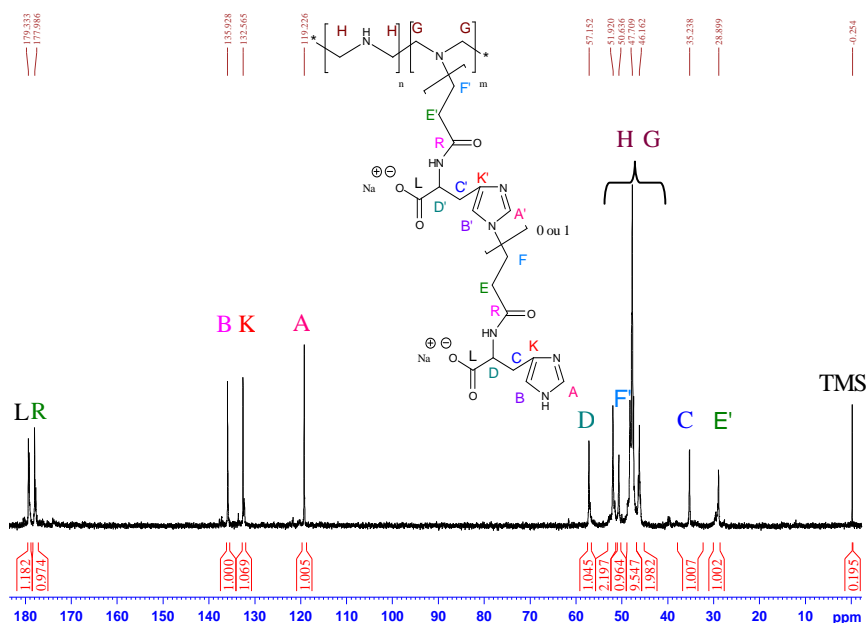


Figure 3-28 : Spectre RMN ^{13}C quantitative de la IPEI-N-his greffée à 19% (EB154a) dans D_2O pH=7 à 25°C , ([EB154a]=200 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his est schématisée.

Les pics des unités éthylènimines modifiées (à 51,91 et 46,16 ppm), les CH_2 provenant de l'ouverture de la double liaison (50,63 et 28,89 ppm) ainsi que le carbone de la fonction amide (177,98 ppm) sont identifiés. Toutefois, cette analyse ne révèle pas les pics relatifs à la réaction secondaire déjà citée.

D'après les spectres RMN ^1H et ^{13}C , la poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl) propionate de sodium) (IPEI-N-his) est isolée. Nous allons maintenant déterminer la fraction totale de L-histidine-N-acryloyle greffée sur le polymère et le nombre d'unités éthylènimine modifiées.

II-2. 2. 1 Calculs de la fraction en histidine et du taux d'unités EI modifiées

Une analyse plus fine du spectre RMN ^1H permet d'obtenir des informations sur la fraction en L-histidine-N-acryloyle par macromolécule et le nombre d'unités éthylènimine (EI) modifiées.

Tout d'abord, nous allons calculer la fraction en L-histidine-N-acryloyle contenue dans le polymère EB154a, en utilisant :

$$f = \frac{m}{n + m} \times 100 \quad \text{équation 1}$$

Avec

f : la fraction totale de L-histidine-N-acryloyle portée par le polymère,

n : le nombre moyen d'unités EI par macromolécule,

et m : le nombre moyen de L-histidine-N-acryloyle par macromolécule de IPEI.

En fixant l'intégration d'un proton de la fonction imidazole à 1 sur le spectre RMN ^1H , on en déduit l'intégration des protons attribués à l'histidine-N-acryloyle greffé dans la zone d'intégration [4,36 - 2,35] ppm notée I_{hist} . Par soustraction, on obtient l'intégration de l'ensemble des protons des unités éthylène imines, notée I_{EI} .

il est possible d'obtenir un rapport relatif des unités m et n par la relation :

$$\frac{n}{m} \cong \frac{\frac{I_{\text{EI}}}{4}}{\frac{I_{\text{his-imidazole}}}{7}} \quad \text{équation 2}$$

Or $4x+7y= I$ équation 3

avec

I : la somme des intégrations des pics entre 4,36 ppm et 2,35 ppm sur le spectre ^1H .

x : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons des unités éthylènimines (EI) par macromolécule sur le spectre RMN ^1H .

y : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons d'unité L-histidine-N-acryloyle greffées par macromolécule sur le spectre RMN ^1H , protons imidazole déduits.

A partir de ces équations, la fraction en L-histidine-N-acryloyle devient :

$$f = \frac{y}{x + y} \times 100$$

Pour le spectre présenté en figure 3-26, la valeur de f est 18,6%

Afin de tenir compte de la fraction d'unité imidazole impliquée dans la réaction secondaire mise en évidence au paragraphe précédent, il convient de déterminer parallèlement le taux d'unité éthylène imine modifiées, afin d'avoir une description complète du polymère synthétisé. Nous posons

$$\% \text{ EI modifiée} \cong \frac{q}{o + q + p} \quad \text{équation 4}$$

avec

o : le nombre d'unités monomère EI non modifiées par la L-histidine-N-acryloyle par macromolécule

q : le nombre d'unités monomère EI modifiées par L-histidine-N-acryloyle,

p : la quantité de p(L-histidine-N-acryloyle) issu de couplage intermoléculaire.

En fixant l'intégration de la fonction imidazole à 1, il est possible d'obtenir un rapport relatif des unités p, q et o par la relation :

$$\frac{o}{q+p} \cong \frac{\frac{I_{EI}}{4}}{\frac{I_{his-imidazole+EI}}{11} + \frac{I_{his-imidazole}}{7}} \quad \text{équation 5}$$

Nous pouvons en déduire : $4v+11u+7z=I$ équation 6

Avec

v : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons éthylènimine non modifiés.

u : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons éthylènimine modifiées par la L-histidine-N-acryloyle, déterminé à partir du nombre d'imidazole libre sur la macromolécule.

z : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons correspondant à la L-histidine-N-acryloyle homocondensée, protons imidazole déduits.

D'après le spectre RMN 1H (figure 3-19)) :

$$z = 0,2 \text{ et } u = 0,8$$

D'où

$$\% \text{ EI modifiée} = \frac{u}{v+u+z} * 100 = 17,6\%$$

Sachant que la IPEI possède un \overline{DP}_n de 512 :

$$o+q=512 \quad \text{équation 7}$$

d'après l'équation 5, équation 6 et équation 7, le nombre d'unités monomères pour obtenir le nombre d'unités EI modifiées par la L-histidine-N-acryloyle est de :

$$q = 512 * \frac{u}{v+u+z}$$

En prenant en compte la fraction en L-histidine-N-acryloyle de 18,6% et le taux d'unité EI modifiées de 17,6%, nous pouvons calculer le taux de la L-histidine-N-acryloyle polycondensée.

$$p = 1 - 0,176/0,186 = 5,3\%.$$

Ainsi, pour le polymère EB154a dont l'analyse est présentée en figure 3-29, la structure de la IPEI-N-his 19% est :

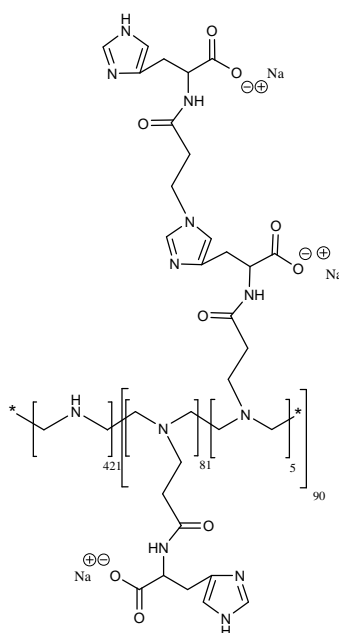


Figure 3-29 : Structure du copolymère statistique de la IPEI-N-his 18,6% (EB154a)

II-2. 2. 2 Le pH du milieu réactionnel

Dans les conditions de synthèse de la IPEI-His présentées au paragraphe précédent, nous avons remarqué que le rendement en fonctionnalisation de la IPEI n'est pas total. Cette observation peut avoir une origine cinétique, incluant le temps de réaction mais aussi la concentration instantanée en fonctions amine de la IPEI disponibles pour la réaction, qui dépend du pH auquel la réaction est menée.

L'influence du pH sur le taux de fonctionnalisation de la IPEI a été examinée, lorsque la réaction est réalisée pendant 48 heures de réaction.

Le tableau 3-3 regroupe les résultats des synthèses de IPEI-N-his (à partir d'une solution contenant 1,17M d'unités EI et 0,24M de L-histidine-N-acryloyle) conduites à différent pH.

Tableau 3-3 : modification de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle menée à différents pH [his-N-acryl] = 0,24 M ; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H₂O

Nom de la réaction	pH de la solution pendant la synthèse	Rendement massique du produit avant précipitation (%)	Rendement massique du produit après précipitation (%)	fraction d'histidine avant purification (%)	fraction d'histidine après purification (%)	Taux de EI modifiées après purification (%)
EB104b	1	97	59,6	10,9	6	non identifiable
EB112b	5	99	29,5	14	10	7,7 (homocondensat : 14,5%)
EB117b	7	100	38,2	16	13	9,6 (homocondensat : 26%)

Nous constatons que la précipitation a pour effet de diminuer largement les rendements. L'analyse par RMN ^1H des produits purifiés après précipitations dans 5 ml de méthanol en présence de 0,5 mL d'HCl 6N, montre la présence de IPEI et de L-histidine-N-acryloyle, quelque soit le pH auquel la réaction a été conduite. Nous remarquons aussi que la purification des produits bruts fait diminuer la fraction en L-histidine-N-acryloyle, qui peut provenir d'une extraction sélective.

Le taux de modification de la IPEI augmente avec le pH de la solution à laquelle est menée la réaction. Il convient de rappeler que la IPEI suit un équilibre de protonation selon le pH (figure 3-30), dont la forme active pour la réaction de Michaël est l'amine déprotonée.

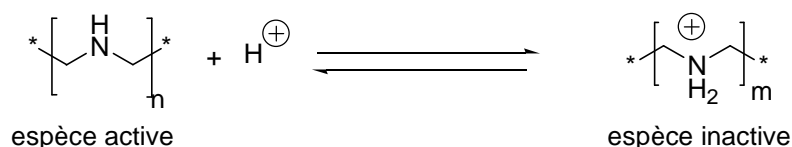


Figure 3-30 : Equilibre chimique acide base de la IPEI

Le taux de protonation de la IPEI en fonction du pH a été décrit et atteint 50% à pH =2 et seulement 20% à pH 7¹⁰⁶. Effectuer la synthèse à pH = 7 permet d'augmenter la concentration instantanée en fonction amine, ce qui se traduit par une augmentation sur un temps donné du taux de modification en L-Histidine-N-acryloyle sur la IPEI (tableau 3-3).

Ayant remarqué que la précipitation du polymère entraîne une purification sélective, le paragraphe suivant traitera de l'optimisation de la purification pour le polymère.

II-2. 2. 3 Optimisation de la purification du polymère

La purification de polyélectrolyte est souvent une étape difficile, et nous avons entamé cette partie par un protocole standard de précipitation du polymère dans le méthanol acidifié (EB131, tableau 3-4).

Tableau 3-4 : modification de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle ([his-N-acryl] = 0,24 M ; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H₂O), pH=7

Nom du polymère	Concentration his-N-acryl (molL ⁻¹)	Mode de purification	Rendement du produit avant purification (%)	Rendement du produit après purification (%)	fraction d'histidine avant purification (%)	fraction d'histidine après purification (%)	Taux de EI modifiées après purification (%)
EB131b	0,24	Méthanol acidifié puis dialyse	95	20,8	18	16	12,7 (homocondensat : 20%)
EB152a	0,24	dialyse	98	56	20	17	13,6 (homocondensat : 20%)

L'objectif de cette étape est d'éliminer la fraction de L-histidine-N-acryloyle n'ayant pas réagi. L'analyse de la fraction méthanol révèle la présence de polymère dissout expliquant en partie le faible rendement massique de cette synthèse. Le polymère EB152 est purifié par dialyse seule, et présente une augmentation significative du rendement. Une durée de 24 heures est nécessaire pour purifier parfaitement ce polymère. Ce temps élevé entraîne l'extrusion d'une fraction de polymère à travers la membrane, bien que les cut-off aient été fixés à 1000 g.mol⁻¹. Cette purification présente l'avantage de fournir un polymère aisément manipulable pour la préparation de vecteur de transfection. Aucun de ces protocoles n'est satisfaisant, mais nous garderons l'étape de dialyse seule, afin d'éliminer les molécules de faible masse molaire.

Les deux expériences menées de façon identique aboutissent au même taux de fonctionnalisation de la IPEI, et aux mêmes taux d'homocondensat quelque soit le protocole de purification. Nous concluons que la perte de produit durant l'étape de purification ne se fait pas par sélectivité chimique.

II-2. 2. 4 La concentration en L-histidine-N-acryloyle dans le milieu réactionnel

Dans les conditions de synthèse de la IPEI-His présentées dans le paragraphe précédent, nous avons pu déterminer que le pH influe sur le taux de fonctionnalisation. L'influence de la concentration en L-histidine-N-acryloyle sur le taux de fonctionnalisation est désormais examinée.

Le tableau 3-5 regroupe les résultats des synthèses de la IPEI-N-his (à partir d'une solution contenant 1,17M d'unités EI) conduites pour différentes concentrations en L-histidine-N-acryloyle.

Tableau 3-5 : modification de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle menée à différentes concentrations en his-N-acryl; [IPEI]=1,17 M (unité EI), T°= 100°C durant 48h, dans H₂O, pH=7

Nom du polymère	Concentration his-N-acryl (molL ⁻¹)	Rendement du produit brut (%)	Rendement du produit purifié (%)*	fraction d'histidine greffée avant purification** (%)	fraction d'histidine après purification (%)**	Taux d'EI modifiées après purification (%)
EB130b	0,12	85	31,9	18	7,4	5% (homocondensat 32%)
EB117b ***	0,24	95	38,2	16	13	9,6 (homocondensat : 26%)
EB131b	0,29	85	20,8	18,4	16	12,7 (homocondensat 20,5%)
EB154a	0,31	94	70	-	18,6	17,6 (homocondensat 5%)
EB135a ****	0,52	91	25	24	22	13,7 (homocondensat : 37%)
EB134a	0,45	92	46,9	26	24	17,6 (homocondensat : 26,5%)
EB146a	0,6	98	69,1	40	32	21 (homocondensat : 34%)
EB149a	0,8	96	73,4	77	66	26,5 (homocondensat : 60%)

* purifié par dialyse exclusivement

** Déterminé par RMN ¹H

*** purifié par précipitation puis dialyse

**** lors de la réaction, une partie de la L-histidine-N-acryloyle s'est gélifiée

Nous observons sur le tableau 3-5 que le taux d'unités éthylènimine modifiée augmente avec la concentration initiale en L-histidine-N-acryloyle dans le mélange réactionnel. Nous attendions une augmentation de la quantité de d'homopolymère formé avec l'augmentation de la concentration en dérivé acryloyle. De façon surprenante, cette tendance n'a pas été observée, et il ne semble pas possible actuellement de contrôler cette réaction secondaire par la cinétique.

II-2. 2. 5 Synthèse de la IPEI 2500 g.mol⁻¹-N-his

Dans l'objectif d'évaluer le rôle de la masse molaire du polymère utilisé en transfection, nous avons procédé à une réaction de greffage de la L-histidine-N-acryloyle sur la IPEI 2500 g.mol⁻¹, commerciale (tableau 3-6).

Tableau 3-6 : modification de la IPEI 2500 g.mol⁻¹ par la L-histidine-N-acryloyle menée à deux concentrations en his-N-acryl; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H₂O, pH=7

Nom du produit	Concentration his-N-acryl (molL ⁻¹)	Rendement du produit brut (%)	Rendement du produit purifié (%)	fraction d'histidine après purification*	Taux d'EI modifiées après purification* (%)
EB161a	0,29	97%	56%	6	5,3 (homocondensat : 11%)
EB204a	0,38	98%	45%	18	15,8 (homocondensat : 12%)

* Déterminé par RMN ¹H

Les synthèses conduites sur une IPEI de faible masse molaire conduisent à des résultats identiques à ceux analysés dans le cas de la IPEI de masse molaire 22 000 g.mol⁻¹. L'augmentation de la concentration initiale en L-histidine-N-acryloyle permet d'augmenter le taux de greffage, alors que la fraction d'homopolymère est indépendante de cette concentration.

II-2. 2. 6 La stabilité de la poly(éthylènimine) linéaire

Bien que la IPEI ait été largement utilisée comme précurseur de vecteur pour la thérapie génétique³, peu de données existent sur la stabilité de ce polymère dans différents solvants¹⁹⁵. La IPEI est stockée dans trois solutions aqueuses de pHs différents (pH=1 (EB115), pH=6 (EB110), pH=8 (EB116)), durant 48 heures à 100°C.

L'analyse du spectre RMN ^1H (de EB110 en figure 3-31) des produits EB110, EB115 et EB116 révèle un pic à 3,17 ppm attribué aux protons de la IPEI ; et l'apparition de pics entre 3,68 ppm et 3,96 ppm. Nous rappelons que l'utilisation d'une molécule modèle telle que la spermine ne nous a pas permis de mettre en évidence une réaction de dégradation de polyamine en fonction du pH(chapitre 3, paragraphe II-2. 1. 1). La protonation de la IPEI provoque un déblindage du signal des unités EI, ce qui pourrait en partie expliquer l'apparition de ces signaux.

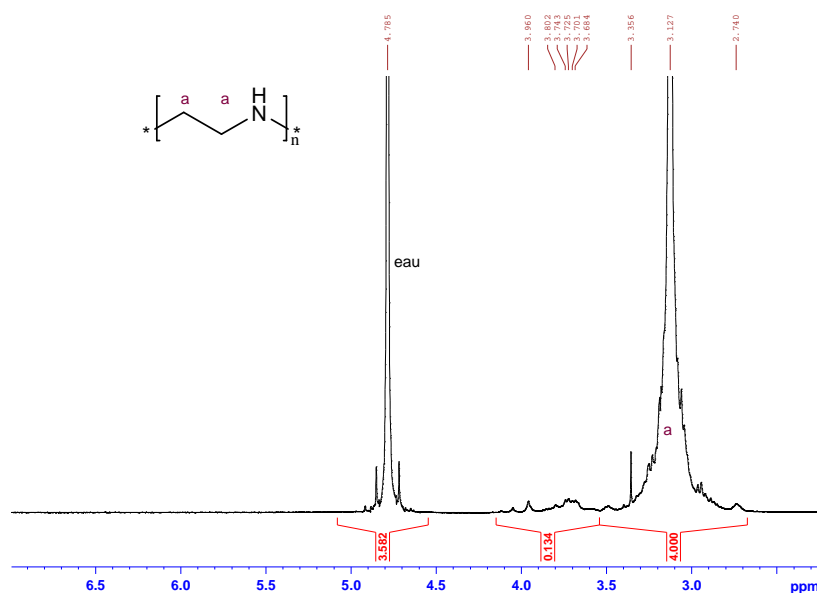


Figure 3-31 : Spectre RMN ^1H de la IPEI (EB115) dans D_2O à $\text{pH}=6$, à 25°C , ($[\text{EB115}]=20 \text{ mg/ml}$)

De façon plus standard, la dégradation de polymères est évaluée par la détermination des masses molaires. Plusieurs techniques peuvent être utilisées et la chromatographie par exclusion stérique est généralement la plus pertinente. Toutefois, les systèmes colonnes/solvants du laboratoire n'ont pas permis d'obtenir de résultats indiscutables à cause de phénomènes d'adsorption du polymère sur les phases stationnaires, phénomène régulièrement observé. Nous avons donc entrepris une détermination qualitative des masses molaires de ces composés selon deux techniques la RMN DOSY et la diffusion dynamique de la lumière. La dernière présente l'avantage de pouvoir rapidement analyser un grand nombre d'échantillons, mais est souvent décriée au profit de la réalisation de diagramme de Zimm par les techniques de diffusion statique de la lumière. La DDL peut être considérée comme fiable lorsque la taille des particules à analyser est inférieure à la longueur d'onde du faisceau incident, permettant l'obtention d'une diffusion isotropique du faisceau. Pour cette étude nous avons utilisé un nanozetasizer (Malvern), et construit pour chaque polymère un diagramme de Debye sur des concentrations comprises entre 2 et 4 mg.ml^{-1} , une gamme de concentration dans laquelle nous observons une variation linéaire de $\frac{KC}{\Delta R_\theta}$ en fonction de la concentration. Les rapports $\text{dn/d}[C]$ sont mesurés de façon indépendante, et nous permettent de déterminer une estimation de la masse

molaire moyenne en poids des macromolécules analysées. Afin de confirmer les analyses de nos polymères par DDL, nous avons effectué de la RMN DOSY sur nos échantillons, permettant de déduire un coefficient de diffusion des objets en solution. La déduction d'une masse molaire de ces mesures se fait en faisant plusieurs hypothèses peu raisonnables dans le cas de nos polymères. Nous discuterons simplement des coefficients de diffusion, proportionnels à la masse molaire. Plus récemment, nous avons identifié une ligne SEC permettant l'analyse de nos échantillons dans l'eau (LiNO₃ 0,1 M, colonne de type CAT 1000 et CAT 100 de la société E Progen Inc), avec une détection MALLS. La préparation des échantillons se fait à pH=5,5 en eau+LiNO₃ (0,1M). Ces mesures réalisées deux ans après stockage à T°C ambiante sans précaution particulière, sont aussi rapportées. Elles nous renseignent sur la stabilité des polymères dans le temps.

Le tableau 3-7 rassemble l'ensemble des résultats de ces mesures, avec une IPEI de masse molaire supposée de 22 000 g.mol⁻¹ en référence, provenant d'une hydrolyse acide de la poly(2-éthyl-2-oxaxoline) pendant 48 heures à 100°C (cf. paragraphe II-1-1 page 10).

Tableau 3-7 : Récapitulatif des masses molaires des IPEIs ($M_{n\text{théorique}} = 22000\text{g.mol}^{-1}$) dans les conditions de stockage à différents pH, obtenues par diffusion de la lumière et par SEC (phase mobile eau+détection MALLS)

Nom réaction	pH de la réaction	$M_{w\text{DDL}} (\text{g.mol}^{-1})$	$D_{\text{DOSY}} (\text{m}^2.\text{s}^{-1})$	$M_{n\text{SEC}} (\text{g.mol}^{-1})$
IPEI initiale	-	20000	$5,0.10^{-11}$	14800
EB115	1	16200	$1,0.10^{-10}$	3 500
EB110	6	14900	$1,1.10^{-10}$	3 370
EB116	8	4930	$6,8.10^{-11}$	4 800

La $M_{w\text{DDL}}$ de la IPEI de référence est estimée à 20 000 g.mol⁻¹, soit une valeur très proche de celle escomptée, et permet de valider l'hypothèse d'estimation des masses molaires par cette méthode. Le coefficient de diffusion mesuré par RMN est comparable à celui obtenu pour d'autres polymères possédant une masse molaire de cet ordre de grandeur. Nous pouvons donc déjà conclure que le mode de synthèse de cette IPEI, par voie acide, ne semble pas provoquer de dégradation significative de la chaîne macromoléculaire.

Les résultats des analyses de masse molaire des trois expériences menées à différents pH sont aussi rapportés. La $M_{w\text{DDL}}$ diminue en milieu aqueux quelque soit le pH. Ceci met en évidence l'importance de réduire les cinétiques de couplage IPEI-N-histidine (IPEI-N-his). Les résultats obtenus par les expériences de diffusion de la lumière sont en accord avec les coefficients de diffusion déterminés par RMN DOSY, excepté pour EB116, l'expérience conduite en milieu basique. Pour les expériences de RMN DOSY, le pH de chaque polymère a été fixé à 7, alors que dans le cas de la détermination de M_w , aucune précaution particulière n'a été prise. La dilution au moment de la mesure nous permet d'affirmer que les pH de EB116 sont de l'ordre de 7 dans les deux cas de figure, et ce résultat n'est pas expliqué par un état de protonation des macromolécules différent. Actuellement nous n'avons pas d'explication pour ce résultat, mais nous concluons, par précaution, que les synthèses ne doivent pas être conduites en milieu trop basique.

Dans un second temps, nous avons déterminé les masses molaires de ces échantillons par SEC équipée d'une détection MALLS. Les analyses ayant été effectuées après deux ans de stockage à T°C ambiante sur des polymères n'ayant pas été neutralisés sont toutefois porteuses d'information. Neutralisée, la IPEI se dégrade peu dans le temps et nous permet d'affirmer que son stockage ne nécessite pas ou peu de conditions particulières. En revanche les autres polymères se sont dégradés, et, pour EB116, il est difficile de conclure à quel moment est intervenue cette dégradation. Une étude systématique sur les conditions de stockage de la IPEI est en cours, en utilisant la SEC, détection MALLS, comme méthode d'analyse. Compte tenu de la masse molaire du polymère de départ, les réactions de dégradation ont des cinétiques lentes, mais ne peuvent être formellement identifiées, puisque les expériences sur modèle se sont révélées infructueuses. En première approche, nous suspectons la dégradation d'Hoffman et de nouvelles études devront être conduites de façon à le confirmer.

II-2. 2. 7 Détermination de la masse molaire des IPEI-N-his par diffusion de la lumière quasi-élastique et analyse chromatographique SEC

Comme pour la IPEI, la détermination de la masse molaire des IPEI-N-His s'est révélée difficile pour une question d'adsorption de polymère sur les phases stationnaires des colonnes SEC du laboratoire. Nous avons à nouveau débuté les analyses par une estimation de la masse molaire des IPEI-N-his en utilisant la diffusion dynamique de la lumière. Les approximations effectuées sont identiques à celle du précédent paragraphe.

Le tableau 3-8 récapitule les résultats obtenus en comparant la masse molaire moyenne en nombre théorique avec M_{wDDL} . Dans la sélection de polymères que nous avons faite, la variable essentielle est le taux de modification en L-histidine-N-acryloyle, indiqué sous forme de pourcentage d'unité histidine greffée sur la IPEI à côté de l'abréviation déjà utilisée pour la IPEI modifiée. Deux polymères ultérieurement modifiés par un résidu adamantane et arginine ont aussi été analysés, et l'expérience EB132 est indiquée, à titre de référence.

Tableau 3-8: Calcul des masses molaires théoriques et détermination des masses molaires par DDL

Exp	Nom	Mn théorique (gmol ⁻¹)	M _{wDDL} (gmol ⁻¹)
EB132	IPEI	22000	20000
EB104b	IPEI-N-his 2%	24200	22050
EB130b	IPEI-N-his 7,4%	29500	32500
EB102b	IPEI-N-his 11%	33800	29500
EB131b	IPEI-N-his 16%	39100	37600
EB134a	IPEI-N-his 24%	40200	33400
EB149b	IPEI-N-his 66%	64800	87900
EB147a	IPEI-N-his 24%-N-ad 5%	44700	47800
EB190a	IPEI-N-his 21%-N-arg 10%	62400	61900

Pour toutes les synthèses rapportées sur ce tableau, nous observons que la M_{wDDL} estimée par la diffusion dynamique de la lumière est relativement élevée, et compatible avec l'idée que peu de réaction de dégradation du polymère se produit lors de ces synthèses. Nous rappelons ici que ces synthèses ont été conduites à $pH=7$, en accord avec les conclusions du paragraphe précédent. Ces résultats encourageants doivent toutefois être confirmés par une étude plus précise par SEC, comme dans le précédent paragraphe.

Deux polymères ont déjà été testés dans le but de valider la méthode, et à nouveau, nous n'avons pas observé d'adsorption sur la phase stationnaire des colonnes utilisées. Les résultats de l'analyse sont rapportés dans le tableau 3-9, en incluant les facteurs de forme déduits grâce au détecteur viscosimétrique.

Tableau 3-9: Caractérisation de la IPEI et la IPEI-His 19% par SEC dans H_2O ($LiNO_3$ 5%) couplée MALLS.

Exp	polymères	Mn théorique ($g \cdot mol^{-1}$)	% analysé*	Mn ($g \cdot mol^{-1}$)	Mw ($g \cdot mol^{-1}$)	Ip	a** (MHS)
EB113	IPEI	22000	96	14 800	24 200	1,6	0,72
EB154a	IPEI-N-his 19%	42300	76	31 500	41 900	1,3	0,46

* Pourcentage de polymère récupéré après l'analyse chromatographique

** facteur de forme

Les résultats du tableau 3-9 montrent une masse molaire en nombre d'environ $15000 g \cdot mol^{-1}$ pour la IPEI et de $32000 g \cdot mol^{-1}$ pour la IPEI-N-his 19%. Nous indiquons que pour ces polymères, un stockage d'un an et demi à $T^\circ C$ ambiante sans précaution particulière a été effectué avant ces mesures. Nous pouvons conclure que les synthèses conduites permettent de conserver la structure macromoléculaire de nos produits, mais que la question du stockage devra être abordée, comme déjà discuté pour la IPEI. Une étude de détermination de masse molaire par SEC de produits fraîchement synthétisés est actuellement en cours et devrait confirmer les premiers résultats déjà observés.

Cette analyse a aussi permis d'obtenir le facteur de forme des polymères, donnant une information sur la conformation des vecteurs en solution aqueuse. Dans le cas de la IPEI, il est de 0,72, ce qui indique une forme expansée de la macromolécule (forme trompette¹⁹⁶) expliquée par les répulsions électrostatiques portées par le polymère à ce pH ($pH=5,5$).

Le facteur de forme de la IPEI-N-his 19% est de 0,46, signifiant une forme compacte, en pelote statistique. Cette différence est expliquée par l'apport de charge négative due à la présence des fonctions carboxylate de la L-histidine à ce pH. Nous proposons qu'à ce pH se forment des liaisons électrostatiques intramoléculaires entre fonctions carboxylates et les fonctions positifs ammoniums portés par la chaîne macromoléculaire. Le faible taux de modification du polymère explique qu'il n'y a pas de collapse ou précipitation de la macromolécule à ce pH; ces points seront plus largement abordés dans le prochain chapitre.

II-3 - Modification de la IPEI par la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle ou par la L-arginine-N-acryloyle

Les réactions de Michaël entre la IPEI et la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle (EB019a, figure 3-32, A) ou la L-arginine-N-acryloyle (EB143a, figure 3-32, B) sont réalisées dans les mêmes conditions que la IPEI-N-his.

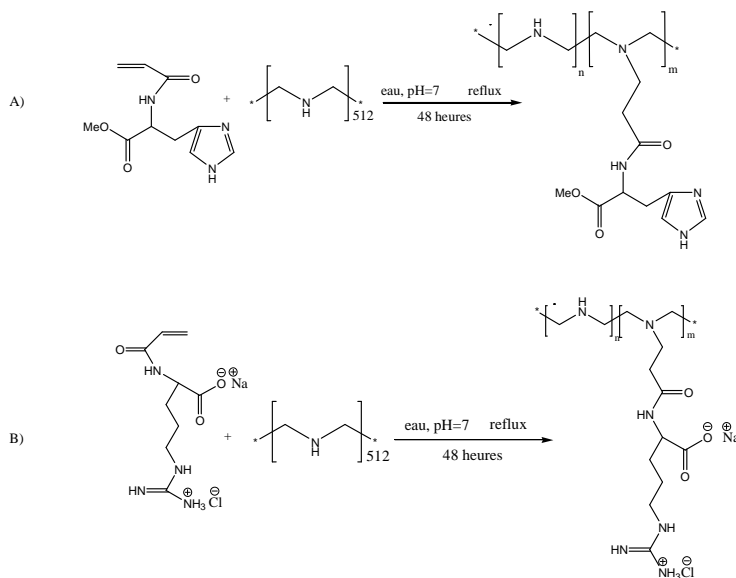


Figure 3-32 : Schéma de la réaction de Michaël de la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle (A) ou de la L-arginine-N-acryloyle (B) sur la IPEI

A la fin de la réaction, les produits sont purifiés par dialyse (après une précipitation dans l'acétate d'éthyle, pour la IPEI-N-his Me), puis caractérisés par RMN ^1H (figure 3-33 pour EB019a et figure 3-34 pour EB143a) et ^{13}C ; l'attribution est facilitée par une expérience de RMN 2D homonucléaire de type COSY (en annexe pour la IPEI-N-arginine).

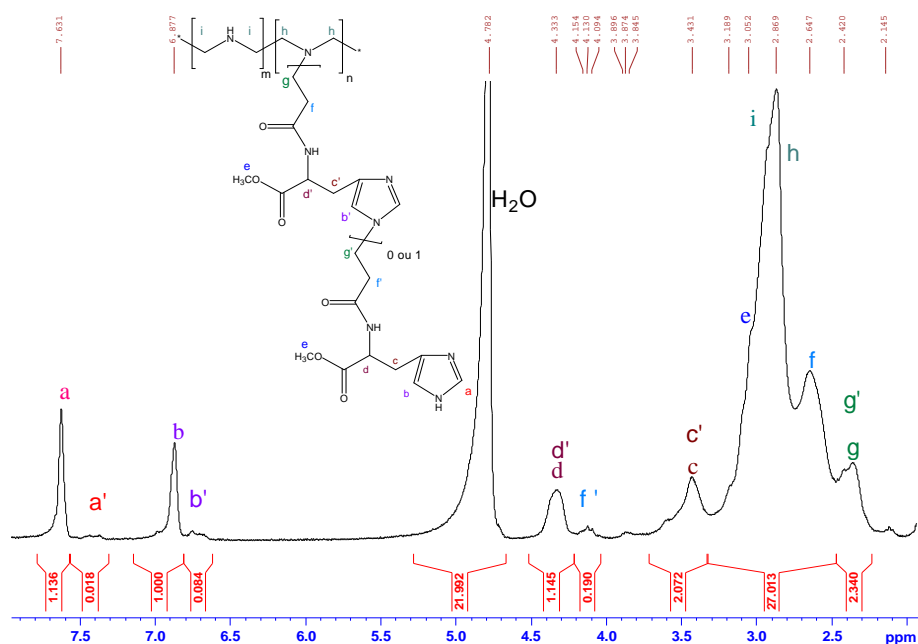


Figure 3-33 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl)propanoate méthyle ester) ou IPEI-N-his Me 19% (EB019a) dans D_2O à 25°C , ([EB019a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his Me est schématisée.

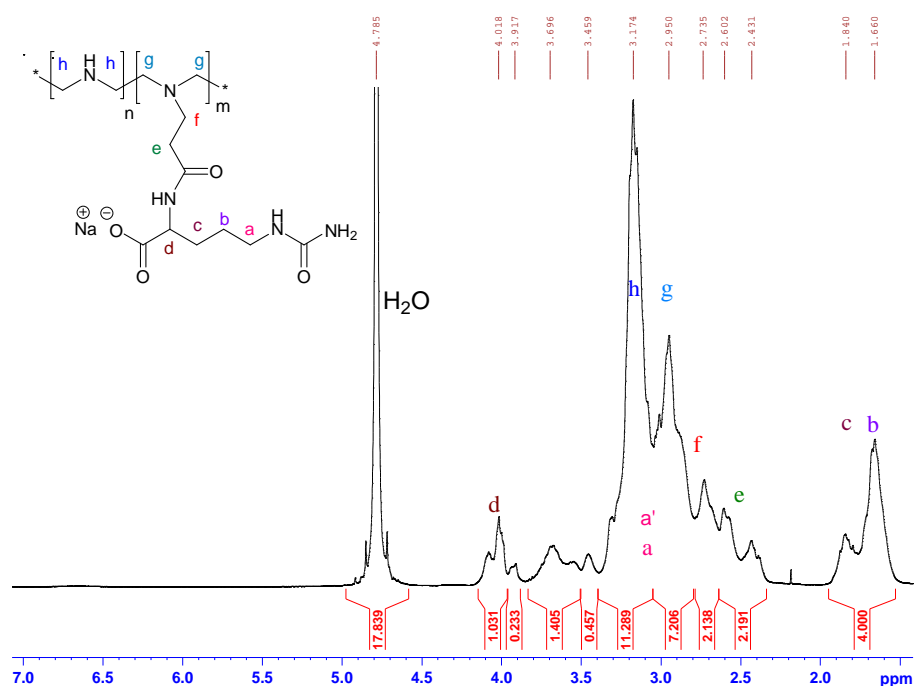


Figure 3-34 : Spectre RMN ^1H de la poly(Ethylèneimine-co-Ethylèneimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide) (IPEI-N-arg 21% (EB143a)) dans D_2O à $\text{pH}=7$ à 25°C , ([EB143a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-arg est schématisée.

L'analyse des spectres RMN ^1H des deux polymères démontre le greffage escompté des deux dérivés d'acide aminé selon une réaction de type aza-Michael. La question de l'homocondensation des deux dérivés

acrylamide nécessite un commentaire. Les observations effectuées dans le cas de réaction à base de L-histidine-N-acryloyle sont aussi valables pour cette synthèse, puisque un pic à 4,15 ppm (pour EB019a) témoigne d'une réaction d'homocondensation. En revanche, la réaction entre la fonction guanidinium (à pH =7) n'a pu être mise en évidence, mais ne peut être occultée dans ces synthèses. De plus amples caractérisations sont à conduire pour mettre en évidence cette réaction secondaire.

D'après le spectre RMN ¹³C de EB019a (en annexe), l'identification de deux pics à 48,97 et 174,72 ppm attribués au groupement méthyle de l'ester, suggère l'absence de saponification de l'ester pendant la réaction de Michaël. Cette observation est corrélée avec l'absence de pic attribué à une fonction carboxylique. L'absence de pics dans la région des insaturations montre qu'il ne reste plus de molécule résiduelle de L-histidine méthyle ester-N-acryloyle.

Le taux de modification en L-histidine méthyle ester-N-acryloyle, ou en L-arginine-N-acryloyle est défini en utilisant l'équation 1. Le calcul du taux de modification (détaillé page 18), informe que les polymères EB019a (IPEI-N-his Me) et EB143a (IPEI-N-arg) sont respectivement greffés à greffés à 19% et 21%, et que leur structure est (figure 3-35) :

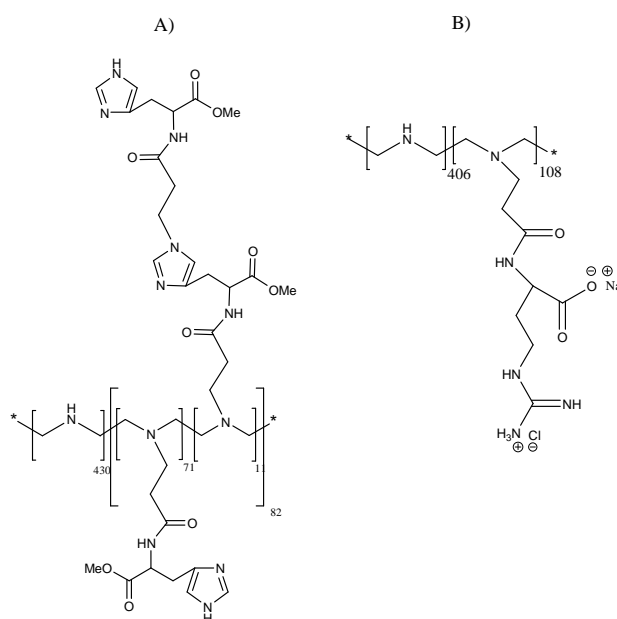


Figure 3-35 : Structure des copolymères statistiques de la IPEI-N-his Me 19% (A) et de la IPEI-N-arg 21% (B)

Les tableaux 3-10 et 3-11 regroupent les caractéristiques des expériences effectuées à partir d'une concentration en EI de 1,17 M conduites pour différentes concentrations en L-histidine méthyle ester-N-acryloyle ou en L-arginine-N-acryloyle.

Tableau 3-10 : modification de la IPEI par la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle menée à différentes concentrations en L-histidine méthyle ester-N-acryloyle; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H₂O, pH=7

Nom réaction	[L-histidine méthyle ester-N-acryloyle] (mol/L)	Rendement du produit brut (%)	Rendement du produit après lyophilisation (%)	Fraction de L-histidine méthyle ester après purification (%)	Taux d'EI modifiées après purification* (%)
EB019	0,24	97	91,9	19	16% (homocondensat : 14%)
EB044	0,22	70	51	24	15,8 (homocondensat : 12%)

Tableau 3-11 : modification de la IPEI par la L-arginine-N-acryloyle menée à différentes concentrations en L-arginine-N-acryloyle; [EI]=1,17 M, T°= 100°C durant 48h, dans H₂O, pH=7

Nom réaction	[arginine-N-acryloyle] (mol/L)	Taux de greffage théorique (%)	Rendement du produit brut (%)	Rendement molaire du produit pur (%)	Taux de greffage avant purification (%)	Taux de greffage après purification (%)
EB183a	0,3	25	75	61	Pas de spectre brut	7**
EB142a	0,37	25	96	29,5*	33	14
EB143a	0,45	39	92	70	55	21

* deux dialyses ont été réalisées.

** Cette réaction utilise 100 mg de IPEI et 139 mg d'arginine-N-acryloyle, elle donne un greffage de 7% alors qu'il devrait être de 14%. Cette réaction n'a pas correctement fonctionné.

II-4 - Modification de la IPEI par les composés adamantane acryloyle

II-4 .1 Synthèse des IPEI modifiées

Les réactions de Michaël entre la IPEI et le 1-adamantane éthanol-O-acryloyle ou le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle sont conduites dans le DMSO (figure 3-36) à 100°C, car ces deux composés ne sont pas solubles dans l'eau. Il a été observé que cette réaction est presque totale au bout de 24 heures.

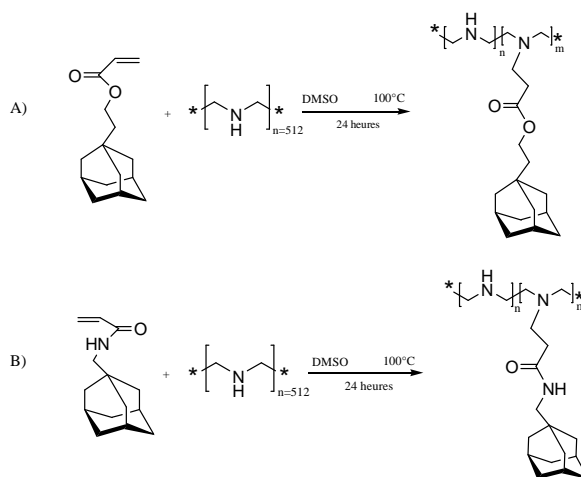


Figure 3-36 : Schéma de la réaction de Michaël des composés adamantane-acryloyle sur la IPEI

A la fin de la réaction, le produit est purifié par une précipitation dans le THF, solvant des composés portant un résidu adamantyle, et ensuite par dialyse (durant 24 heures). La purification dans le THF permet d'éliminer une grande quantité du DMSO et des synthons portant un groupement adamantane résiduel. Une purification par dialyse permet l'élimination du DMSO résiduel. Les précipités récupérés sont séchés puis caractérisés par RMN ^1H (figure 3-37 pour EB007d et figure 3-38 pour EB024a) et ^{13}C .

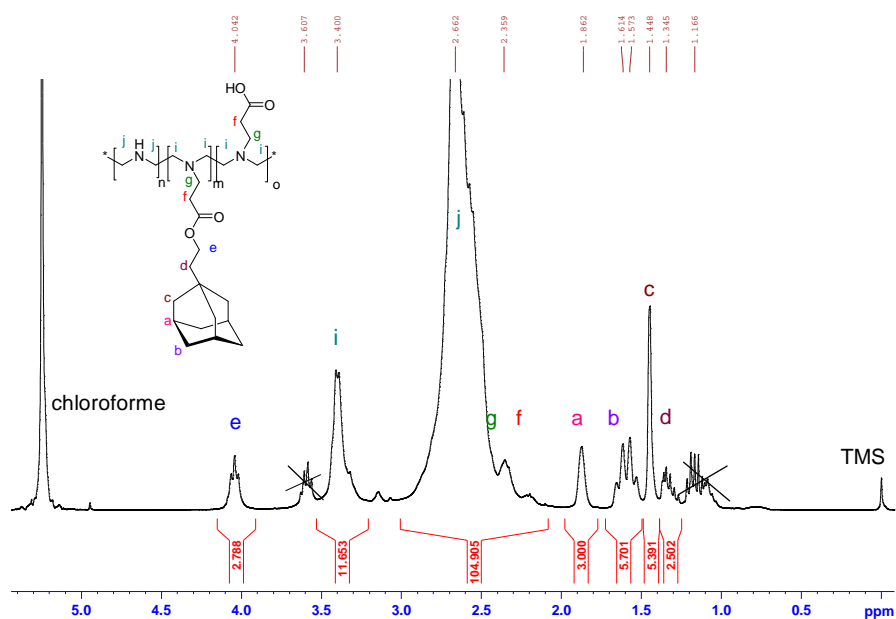


Figure 3-37 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylester-O-1-adamantane éthanol) (IPEI-O-ad :EB007d) dans CDCl_3 à 25°C , ($[\text{EB007d}]$ 20 mg/ml)

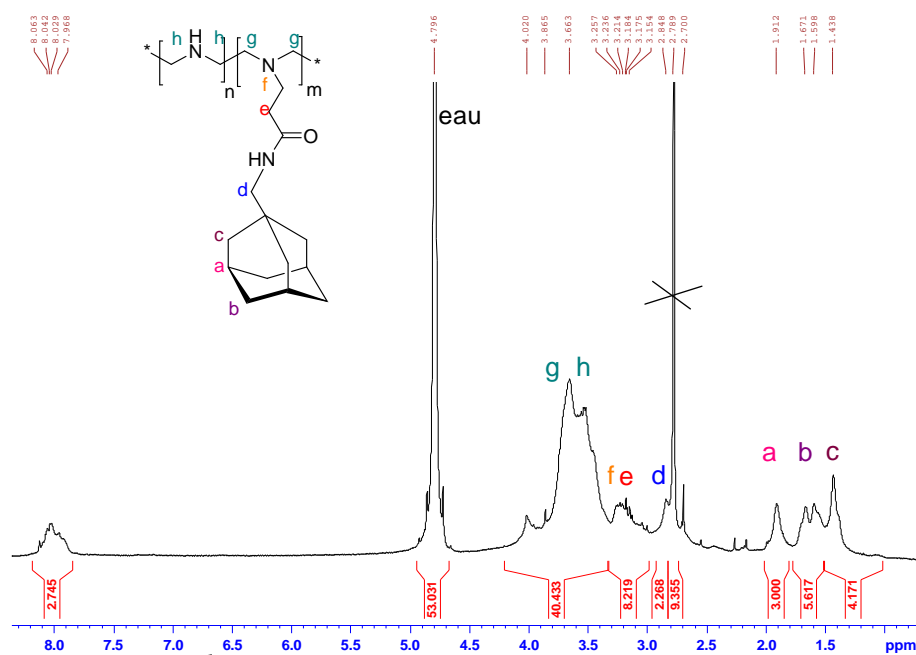


Figure 3-38 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co éthylèneimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-ad :EB024a) dans D_2O à 25°C , ($[\text{EB024a}] = 20 \text{ mg/ml}$)

Il faut souligner que l'analyse de spectre RMN ^{13}C du produit EB007d (IPEI-O-ad, en annexe) montre la présence d'un pic à 172,54 ppm, représentant un carbone d'une fonction carboxylique (pic non visible en RMN ^1H). Cette observation indique que le produit s'est dégradé pendant la modification de la IPEI. La liaison ester entre l'adamantane éthanol et l'acryloyle n'est pas stable pendant la synthèse ; ce qui nous a amené à utiliser le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle, dont la fonction acryloyle est fixée par une liaison amide, moins sensible à l'hydrolyse que la fonction ester.

Comme pour les paragraphes précédents, les spectres RMN ^1H et ^{13}C ne révèlent plus les signaux attribués aux doubles liaisons des réactifs de départ, prouvant l'élimination du dérivé portant la fonction acryloyle. Un taux de modification, déterminé pour la réaction EB024a (IPEI-N-ad) (détailé page 21), informe que ce polymère est greffé à 24%. D'après la formule chimique des synthons, ceux-ci ne possèdent pas de fonction amine pouvant entraîner la condensation du monomère sur lui-même, de ce fait, le paramètre z est nul (exprimé en page 22). La formule développée peut être écrite ainsi (figure 3-39) :

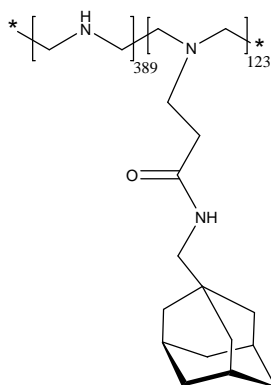


Figure 3-39 : Structure des copolymères statistiques de la IPEI-N-ad 24%

Les faibles rendements massiques sont expliqués par la faible efficacité de la précipitation, comme en témoigne la présence de polymère dans les filtrats (déterminé par RMN ^1H).

Pour améliorer le greffage du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle sur la IPEI, des expériences supplémentaires ont été réalisées en changeant la concentration en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle.

II-4 .2 Concentration en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle dans le milieu de réaction

Le tableau 3-12 regroupe les caractéristiques des expériences effectuées à partir de la IPEI et le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle. Ces expériences sont conduites dans le DMSO durant 24 heures à 100°C. Les polymères sont récupérés par précipitation dans le THF, puis dialysés contre l'eau.

Tableau 3-12 : Récapitulatif des quantités du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle utilisées pour la modification de la IPEI. $[EI] = 1,17 \text{ M}$.

Nom réaction	$n_{\text{ad-N-acryl}}$ (mol)	Rendement du produit brut (%)	Rendement après purification*	Taux de greffage après purification (%)
EB052c	0,006	93	21.3	0,4
EB051c	0,06	90	98.5	4
EB053c	0,12	91	27.8	9
EB023a	0,6	94	21.4	22
EB024a	0,6	96	40	24

* Les polymères sont précipités dans le THF puis dialysés contre l'eau

Nous observons une augmentation du taux de greffage avec la concentration initiale en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle, ce qui nous permet d'utiliser cette variable pour maîtriser le taux de greffage sur la IPEI.

II-5 - Etude cinétique de la modification de la IPEI par les synthons aminés et adamantane

D'après la littérature¹⁹³, la réaction de Michaël suit une cinétique d'ordre 2. Ce paragraphe est consacré à vérifier si les conditions de la synthèse des polymères (IPEI-N-his, IPEI-N-his Me, IPEI-N-arg et IPEI-N-arg), étudiés dans ce chapitre (II-2 et II-3), suivent bien cet ordre. Les résultats obtenus sur la figure 3-36 proviennent de l'équation 8¹⁹⁷ :

$$v = -\frac{d[\text{EI}]}{dt} = -\frac{d[\text{synthon}]}{dt} = \frac{dx}{dt} = k[\text{EI}][\text{synthon}] \quad \text{équation 8}$$

Où [EI] est la concentration en unités monomères de la IPEI, « x » la concentration en unités EI ayant réagi avec les greffons, déterminée par RMN ¹H.

Les réactions étant conduites hors stœchiométrie, on pose :

$$[\text{EI}] = [\text{EI}]_0 - x \quad \text{équation 9}$$

$$[\text{synthon}] = [\text{synthon}]_0 - x \quad \text{équation 10}$$

$$[\text{EI-N-synthon}] = x \quad \text{équation 11}$$

D'où à un temps t:
$$\frac{dx}{dt} = k([\text{EI}]_0 - x)([\text{synthon}]_0 - x)$$

Ou encore :
$$\frac{d[x]}{([\text{EI}]_0 - x)([\text{synthon}]_0 - x)} = k dt$$

Après séparation des variables, l'intégration est effectuée de t=0 à t et de x=0 à x.

$$\int_0^x \frac{d[x]}{([\text{EI}]_0 - x)([\text{synthon}]_0 - x)} = \int_0^t k dt$$

Ou encore :
$$\frac{1}{[\text{EI}]_0 - [\text{synthon}]_0} \left(\int_0^x \frac{-d[x]}{[\text{EI}]_0 - x} + \int_0^x \frac{d[x]}{[\text{synthon}]_0 - x} \right) = k \int_0^t dt$$

Soit :
$$\frac{1}{[EI]_0 - [\text{synthon}]_0} (\ln([EI]_0 - x) - \ln([\text{synthon}]_0 - x))^x = (kt)_0^t$$

Ce qui s'écrit
$$\frac{1}{[EI]_0 - [\text{synthon}]_0} \left(\ln \frac{[\text{synthon}]_0 ([EI]_0 - x)}{[EI]_0 ([\text{synthon}]_0 - x)} \right) = kt$$

ce qui conduit à :

$$\log \frac{[EI]}{[\text{synthon}]} = \log \frac{[EI]_0 - x}{[\text{synthon}]_0 - x} = ([EI]_0 - [\text{synthon}]_0) \frac{k}{2,3} t$$

Soit :
$$\log \frac{[EI]_0 - x}{[\text{synthon}]_0 - x} = ([EI]_0 - [\text{synthon}]_0) \frac{k}{2,3} t$$

Le graphique ci-dessous (figure 3-40) présente les évolutions de $\log \frac{[EI]_0 - x}{[\text{synthon}]_0 - x}$ en fonction du temps,

des couplages entre la IPEI et la L-histidine-N-acryloyle, la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle, la L-arginine-N-acryloyle et le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle.

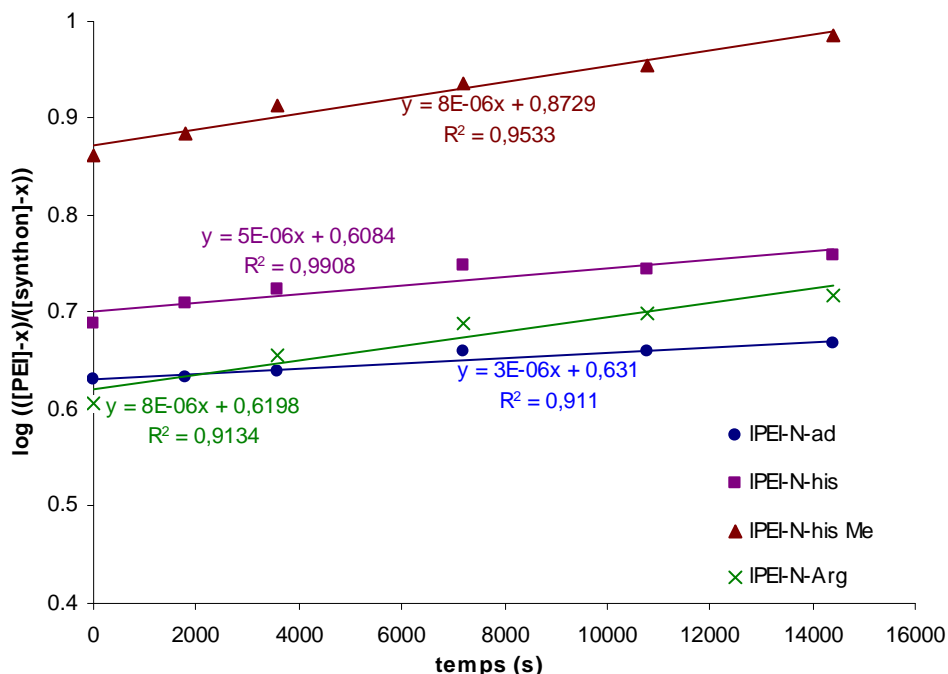


Figure 3-40 : cinétique de la réaction de Michael entre la IPEI et les précurseurs acryloyle à 100°C représentée selon un mécanisme d'ordre 2, hors stœchiométrie.

La variation de $\log \frac{[EI]_0 - x}{[ad-N-acryl]_0 - x}$ en fonction du temps est linéaire pour l'ensemble des réactions analysées, démontrant ainsi l'ordre 2 escompté. Le tableau 3-13 regroupe les constantes de vitesse des synthèses reportées dans le graphe précédent à partir des pentes selon l'équation suivante :

$$k = \frac{2,3 \times \text{pente}}{[EI] - [\text{hist - N - acryl}]} \quad \text{équation 12}$$

Tableau 3-13 : Constante de cinétique de la réaction de Michaël à 100°C.

Réactions	Constante de vitesse, k (M ⁻¹ s ⁻¹)
IPEI-N-arginine	8.10 ⁻⁶
IPEI-N-histidine	5.10 ⁻⁶
IPEI-N-histidine méthyle ester	8.10 ⁻⁶
IPEI-N-1-adamantane méthylamine	3.10 ⁻⁶

Nous observons, que pour chacun des dérivés acryloyles que nous avons utilisés, les constantes de vitesse de couplage sont de l'ordre de 10⁻⁵ M⁻¹s⁻¹ lorsque la réaction est menée dans l'eau, et nous observons une diminution de la cinétique de couplage lorsque la réaction est conduite dans le DMSO. En première approximation, l'eau favorise une cinétique élevée de la réaction aza-Michael, mais une étude systématique sans variation de la nature du dérivé N-acryloyle devrait être conduite pour pouvoir confirmer cette observation.

Les constantes cinétiques de vitesse mesurée dans nos travaux peuvent aussi être comparé à la littérature¹⁹⁸. L'équipe de Novak a déterminé la constante de vitesse de la réaction de Michaël entre le N-aryl-O-pivaloyl-hydroxylamines et le deoxyguanosine possédant une amine primaire. La constante de vitesse est de k= 3*10⁻⁴ M⁻¹s⁻¹. Cette cinétique plus rapide peut être attribuée à la nature de l'amine utilisée qui était dans leur cas primaire. Nous n'avons pas relevé d'étude cinétique de réaction de Michael utilisant un dérivé possédant amine secondaire en tant que réactif.

II-6 - Modification des IPEI-N-his et IPEI-Me par le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle ou la L-arginine-N-acryloyle

La réaction de Michaël entre le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle et la IPEI-his 24% ou la IPEI-N-his Me 24% est conduite dans le DMSO, durant 24 heures à 100°C (EB147c et EB058a, figure 3-41A), tandis que la synthèse entre la IPEI-N-his 21% et la L-arginine-N-acryloyle est conduite dans une solution aqueuse à pH=7, pendant 48 heures à 100°C (EB190a, figure 3-41B).

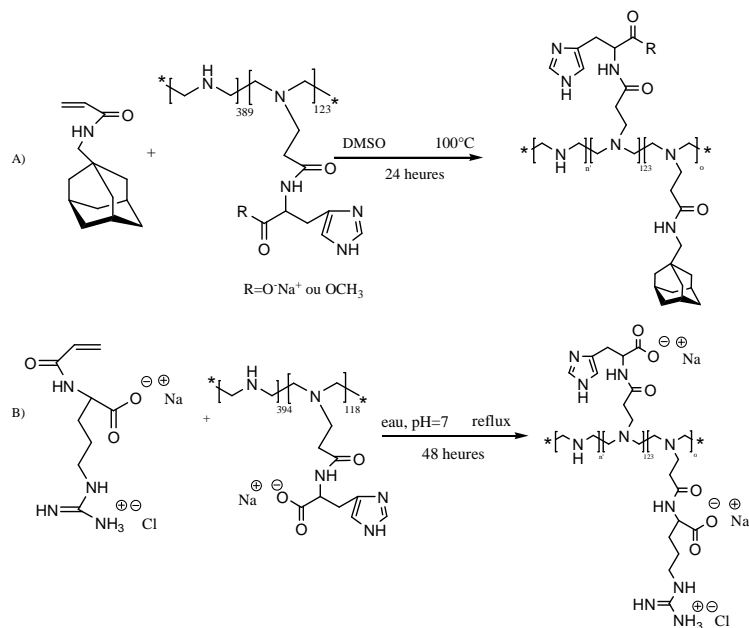


Figure 3-41 : Schéma de réaction de modification du 1-adamantane méthylamine-*N*-acryloyle (B) ou de la *L*-arginine-*N*-acryloyle (B) sur les PEI-*N*-his

A la fin de la réaction, les produits EB147c, EB058a (contenant les résidus adamantane) sont purifiés par une précipitation dans le THF (la précipitation permet de supprimer le maximum de DMSO), puis par une dialyse contre l'eau. Le rendement massique de ces réactions est d'environ 30%. Le produit EB190a est purifié seulement par dialyse ; le rendement obtenu est de 53%.

Les produits de ces trois réactions sont séchés et caractérisés par RMN ¹H (figure 3-42 pour EB147c, figure 3-43 pour EB058a et figure 3-44 pour EB190a) et ¹³C.

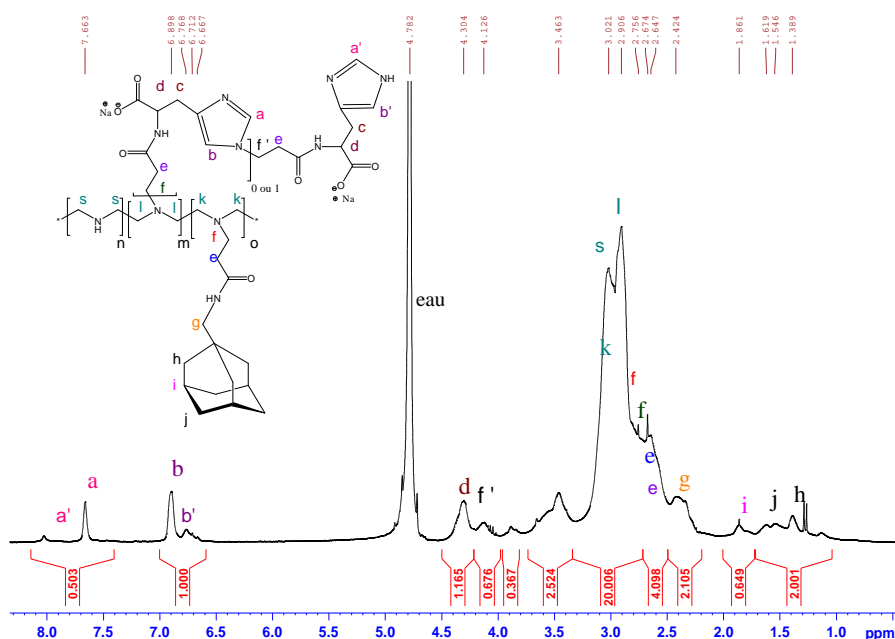


Figure 3-42 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl)propanoïque acide) -co- éthylèneimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-his 24%-N-ad 5% (EB147c)) dans D_2O à 25°C , ([EB147c]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his-N-ad est schématisée.

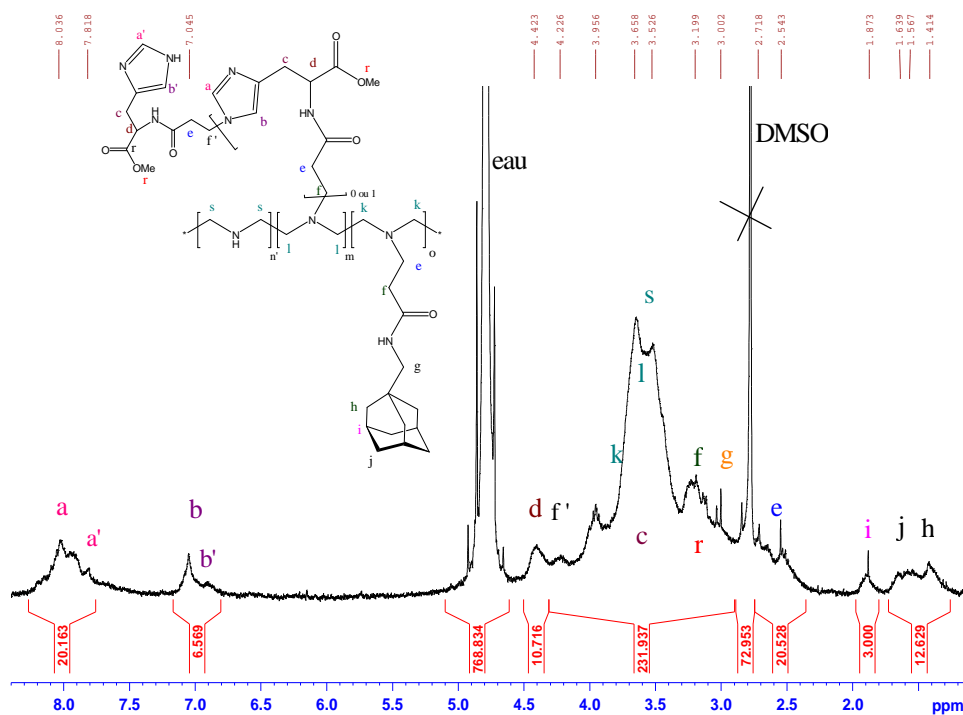


Figure 3-43 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl)propanoate méthyle ester)-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-1-adamantane méthylamine) (IPEI-N-his Me 19%-N-ad 5% (EB058a)) dans D_2O à 25°C , ([EB058a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his Me-N-ad est schématisée

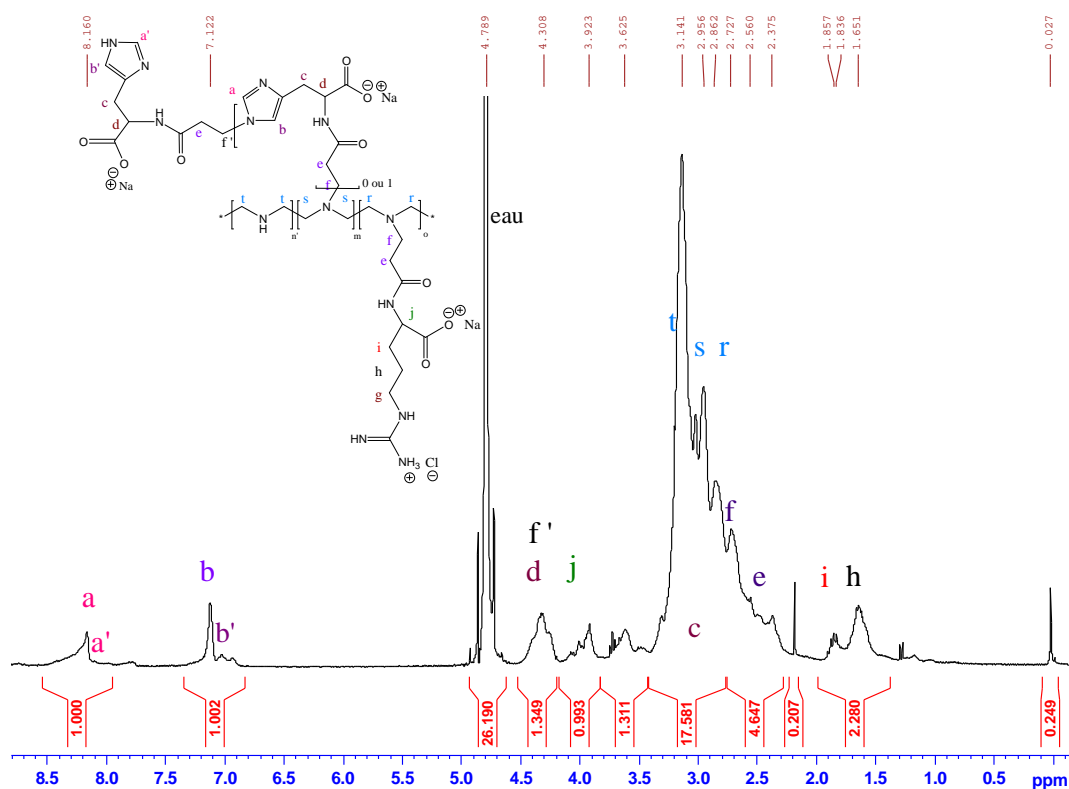


Figure 3-44 : Spectre RMN ^1H de la poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl)propanoïque acide-co-Ethylèneimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbamimidamidopentanoïque acide), (IPEI-N-his-N-arg)(IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5 (EB190a)) dans D_2O à 25°C , ([EB190a]=20 mg/ml). La molécule de IPEI-N-his-N-arg est schématisée

Nous pouvons déterminer la fraction en synthon des polymères EB058a, EB147c et EB190a à partir du taux d'unité éthylèneimine modifiée par la L-histidine-N-acryloyle. Le calcul suivant est effectué dans le cas du polymère EB147c.

En fixant l'intégration de la fonction imidazole à 1, il est possible d'obtenir un rapport relatif des unités m et n par la relation :

$$\frac{r}{s} \cong \frac{\frac{I_{ad}}{3}}{\frac{I_{his-imidazole}}{7}} \quad \text{équation 13}$$

avec

r : le nombre d'unités monomère EI modifiées par la L-histidine-N-acryloyle,

s : la fraction en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle

w : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons des greffons éthylèneimine-N-adamantane méthylamine

s : l'intégration correspondant à l'ensemble des protons d'unités EI-N-histidine par macromolécule sur le spectre RMN ^1H , protons imidazole déduits.

Il est possible d'obtenir un rapport relatif des unités w et s par la relation :

$$\frac{w}{s} = \frac{\frac{I_{ad}}{n_{ad}}}{\frac{I_{his(imidazole-libre)}}{n_{his}}} \quad \text{équation 14}$$

avec

I_{ad} : l'intégration du pic du cycle adamantane à 1,86 ppm

n_{ad} : le nombre de protons du cycle ad à 1,86,

$I_{hist(imidazole libre)}$ = intégration du pic du cycle imidazole à 6,76 ppm – l'intégration du cycle imidazole homo-condensé = 0,8 d'après le spectre 3-26

n_{his} : le nombre de proton imidazole libre à 6,89 ppm.

Les valeurs y et z obtenues par le spectre RMN ^1H sont:

$$s = \frac{0,8}{1} = 0,8 \quad \text{et} \quad w = \frac{0,649}{3} = 0,22$$

Le rapport entre l'unité monomère EI-N-his et la fraction en 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle de l'équation 14 devient :

$$\frac{w}{s} = \frac{0,22}{0,8} = 0,275$$

Il est possible de définir y par le taux de modification en L-histidine-N-acryloyle déterminé dans le paragraphe II-2. 2. 1 qui s'écrit :

$$s = \frac{u}{x + u + z} = 0,176$$

et

$$s = 0 = 0,05$$

Nous pouvons conclure que le polymère EB147c possède 5% d'adamantane méthylamine-N-acryloyle greffé. D'après le paragraphe II-2. 2. 1, il est difficile de discriminer un greffage sur le squelette IPEI ou sur le résidu histidine lors de la deuxième modification du polymère. C'est pourquoi trois structures sont possibles pour la IPEI modifiée par l'adamantane méthylamine-N-acryloyle. Dans le cas du polymère EB147c ces structures sont représentées par la figure 3-45.

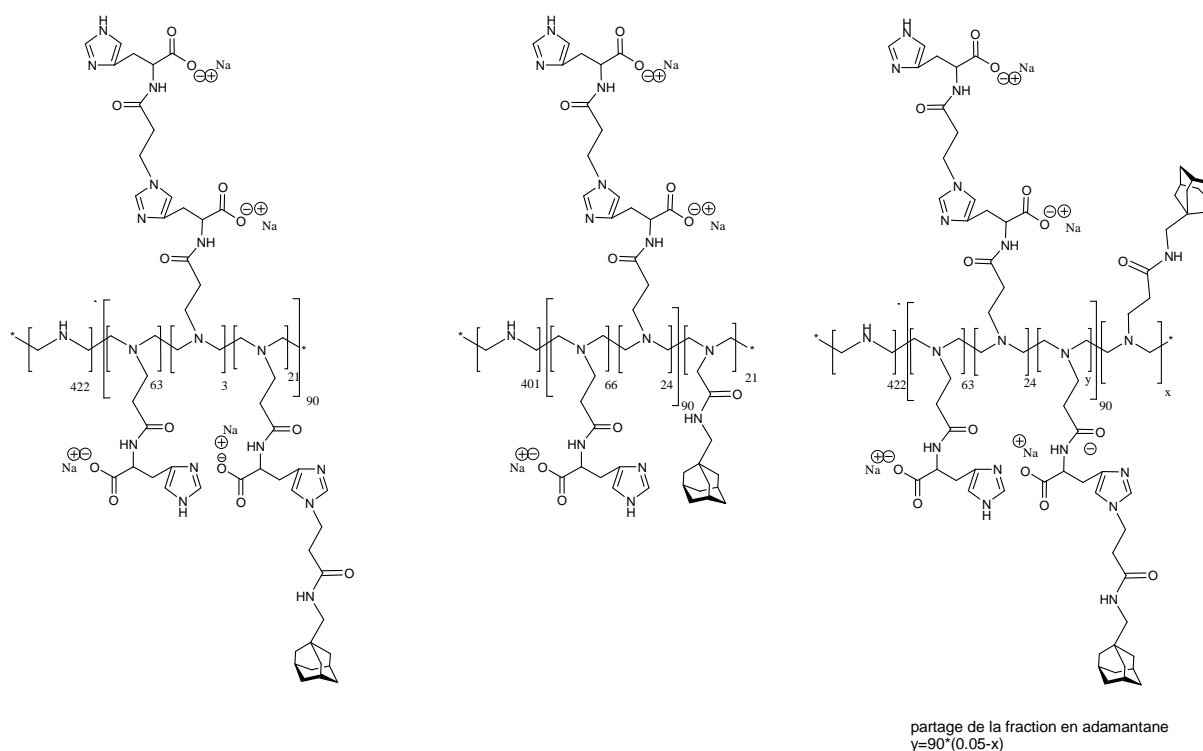


Figure 3-45 : Structure possible des copolymères statistiques en prenant pour exemple la IPEI-N-his17.6%-N-ad5% (EB147c)

Une réaction de modification de la IPEI-N-his 16% avec du 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle est réalisé, donnant aussi un pourcentage de modification de 5%.

III – Conclusion

La modification des acides aminés et de certaines molécules hydrophobes par la réaction d’addition-élimination permet d’obtenir facilement les dérivés acrylamide, utilisé pour la modification de la poly(éthylèneimine) linéaire (IPEI). Les protocoles de synthèses et de purifications des précurseurs sont optimisés pour obtenir un rendement satisfaisant (50%). Le recours à des analyses spectroscopiques (RMN ^1H , ^{13}C et 2D) et spectrométriques (ESI-MS) permet d’identifier les précurseurs escomptés et d’établir le degré de pureté des molécules.

Ce chapitre décrit aussi le greffage des différents précurseurs (adamantane-N-acryloyle, L-arginine-N-acryloyle, L-histidine-N-acryloyle, L-histidine méthyle ester) sur la IPEI par la réaction de Michaël. Les conditions opératoires des synthèses et le taux de greffage de la IPEI sont contrôlés et reproductibles, amenant à la création de nouveaux vecteurs cationiques, non toxiques, capables de complexer l’ADN et de transférer les cellules *in vitro* et *in vivo*.

Malgré la simplicité relative des synthèses présentées dans ce chapitre, il a été démontré qu'une réaction secondaire d'homocondensation se produisait sur les dérivés d'acide aminé formant des structures qui se greffent à la IPEI. D'après l'analyse des spectres de la L-histidine-N-acryloyle, l'élévation de température favorise l'apparition de ces homocondensats (lors de l'ajout du chlorure d'acryloyle ou de l'évaporation des solvants après purification). Pour limiter ces réactions secondaires, il faudrait effectuer la synthèse à une température moins élevée (50°C), ou protéger la fonction imidazole de la L-histidine-N-acryloyle par une fonction boc, lors de la réaction.

Pour comprendre les résultats de transfection *in vitro*, des études de caractérisations physico-chimique sur des nouveaux vecteurs (récapitulés dans le tableau 3-14) et des complexes vecteurs/ADN sont réalisées ultérieurement dans des solutions aqueuses, tamponnées (ex : tampon HEPES).

Tableau 3-14 : Récapitulatifs des expériences associées aux polymères synthétisés, aux synthons utilisés, aux masses molaires de la IPEI et à la fraction en synthons obtenue.

Synthon	Mn IPEI théorique (g.mol ⁻¹)	Exp.	Fraction en synthons (%)	Nom abrégé du polymère
L-histidine-N-acryloyle	22000	EB104b	6	IPEI-N-his
		EB130b EB112b	7,4	
		EB117b	10	
		EB131b	13	
		EB152a	16	
		EB154a	17	
		EB135a	19	
		EB134a	22	
		EB146a	24	
		EB149a	32	
			66	
L-histidine-N-acryloyle	2500	EB161a EB204a	6 18	IPEI2500-N-his
L-histidine méthyle ester-N-acryloyle	22000	EB019a EB044a	19 24	IPEI-N-his Me
L-arginine-N-acryloyle	22000	EB183a EB142a EB143a	7 14 21	IPEI-N-arg
1-adamantane méthylamine-N-acryloyle	22000	EB052c	0,4	IPEI-N-ad
		EB051c	4	
		EB053c	9	
		EB023a	22	
		EB024a	24	
L-histidine-N-acryloyle 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle	22000	EB147c	24 5	IPEI-N-his-N-ad
L-histidine méthyle ester-N-acryloyle 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle	22000	EB058a	19	IPEI-N-his Me-N-ad
			5	
L-histidine-N-acryloyle L-arginine-N-acryloyle	22000	EB190a	21 13,5	IPEI-N-his-N-arg

Chapitre 4 :

Propriétés physico-chimiques des nouveaux vecteurs et Tests biologiques

La protection du gène médicament est capitale lors d'une transfection *in vitro* ou *in vivo*. Sa complexation par un vecteur cationique forme un système non viral appelé polyplexe, par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques coopératives entre les groupements phosphate du fragment d'ADN et les unités cationiques du polyélectrolyte positif. Le rôle du vecteur polymère est la condensation du plasmide au moment de la réalisation du polyplexe, puis de former une nanoparticule possédant une charge de surface globalement positive afin d'améliorer l'internalisation cellulaire de la nanoparticule par interaction particules-peptidoglycane (molécules localisées en surface des membranes plasmiques de la cellule).

La connaissance initiale des propriétés physico-chimiques des polymères synthétisés est primordiale pour une utilisation ultérieure en biologie. Un ensemble d'informations concernant les polymères, tels que le rayon hydrodynamique des polymères, leur charge globale (qui doit être positive, pour complexer l'ADN) et leur effet tampon (utile pour la sortie de l'endosome) seront déterminés afin d'appréhender la formation de nanoparticules de façon contrôlée. L'acquisition de ces paramètres, en solution aqueuse ou tamponnée (ex : HEPES), se fera par titration, mesure du potentiel zêta et mesure des volumes hydrodynamiques.

La complexation/condensation de l'ADN dépend de la nature du vecteur utilisé et des conditions de formulation du polyplexe. Ces paramètres seront étudiés afin de produire des nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm, taille requise pour des expériences de transfection à l'aide de polymère¹⁵³. Les polyplexes ainsi produits devront avoir une charge de surface positive, et la capacité de complexation d'un plasmide par les différents polymères cationiques de ce travail (pTG11033 ou pCMV-luc, ADN circulaire de 9514 paires de bases, codant pour la luciférase, l'enzyme permettant de vérifier la transfection des cellules) sera menée par électrophorèse. La maîtrise de ces paramètres est essentielle dans l'objectif d'amélioration de la transfection *in vitro* et *in vivo*¹⁹⁹.

Enfin, des tests de transfection *in vitro* préliminaires à l'aide de ces nouveaux vecteurs seront présentés, en utilisant la poly(éthylèneimine) linéaire (IPEI) en tant que référence^{131, 134}.

I – Caractérisations physico-chimiques des différents polymères

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la modification chimique de la IPEI par des dérivés de la L-histidine provoque une modification du comportement des macromolécules en solution. Il nous est paru important de regarder les paramètres pouvant influencer le comportement des polymères synthétisés au chapitre précédent en fonction de différents paramètres, notamment le pH.

I-1 - Etude de la solubilité et des charges des différents polymères synthétisés en fonction du pH.

L'essentiel des polymères synthétisés durant ce travail (IPEI-N-his ou la IPEI-N-arg) sont des polyélectrolytes polyampholytes. Leur comportement change en fonction du pH. Il est important d'étudier la solubilité de ces polymères ainsi que leur charge globale en fonction du pH. Pour accéder à ces paramètres, nous déterminerons le rayon hydrodynamique des différents dérivés de IPEI, et nous mesurerons leur potentiel ζ . Ces deux paramètres seront alors corrélés afin de déterminer les conditions d'utilisation de ces polymères pour former des complexes avec un polyélectrolyte négatif tel que l'ADN. Nous utiliserons la IPEI en tant que référence, ainsi que la IPEI-N-his Me, possédant une fonction ester, qui permet au polymère de perdre son caractère polyampholyte.

I-1 .1 les IPEI-N-his

I-1. 1. 1 détermination de la solubilité des IPEI-N-his en fonction du pH

Dans l'étude suivante, nous cherchons à déterminer la solubilité des polymères en fonction du taux de greffage et du pH. Ce paramètre peut être déterminé par une mesure du rayon hydrodynamique (r_H (nm)) par diffusion dynamique de la lumière à l'aide du Zétasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd United Kingdom). Les mesures sont conduites en solutions, aqueuse et tamponnée (HEPES, avec glucose (5%) ou NaCl (150 mM)).

Les premières mesures ont été effectuées à $T = 25^\circ\text{C}$, en solution aqueuse, sans force ionique pour une concentration en polymère fixée à 1 g.L^{-1} . Les valeurs sont présentées par des mesures en intensité. Après cinq mesures réalisées, l'incertitude est obtenue par le calcul de l'écart type moyen.

La figure 4-1 montre la variation du rayon hydrodynamique de la IPEI en fonction du pH, en solution aqueuse. Le rayon hydrodynamique est de l'ordre de 15nm à pH acide.

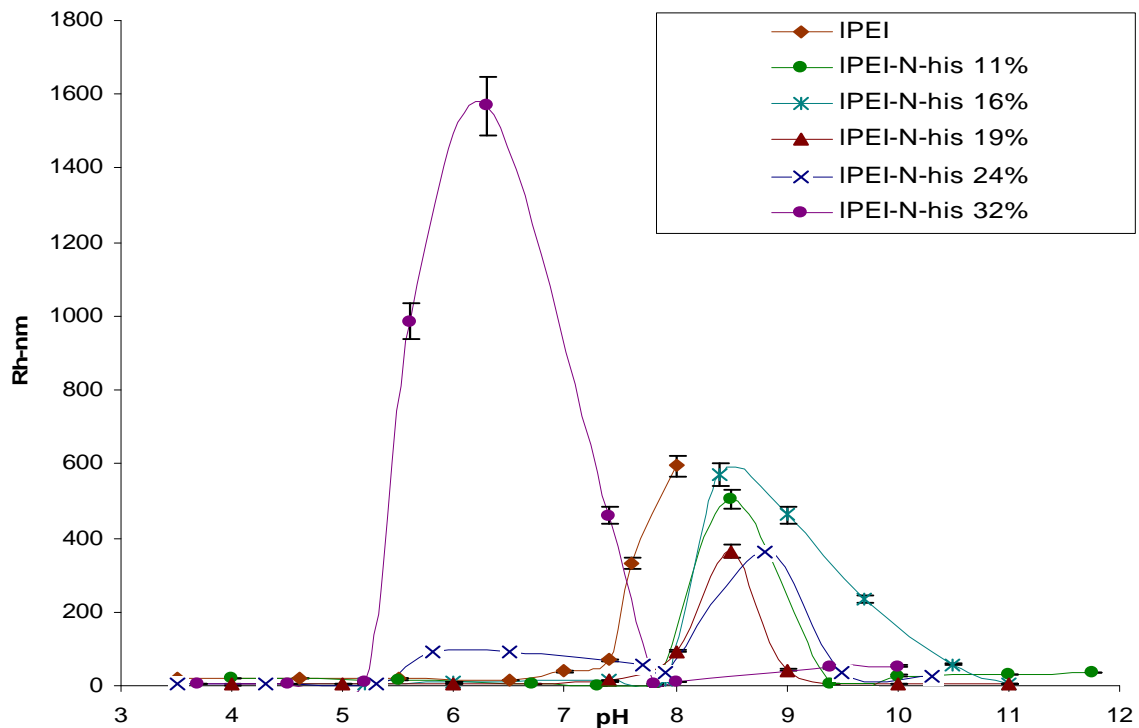


Figure 4-1 : Variation du rayon hydrodynamique (R_h (nm)) en fonction du pH, des IPEI et IPEI-N-his ($[\text{polymère}] = 1 \text{ g/L}$) à $T^\circ\text{C} = 25^\circ\text{C}$

La solubilisation de la IPEI est expliquée par la protonation du polymère à pH acide. Au dessus de $\text{pH} = 7$, la déprotonation de la chaîne macromoléculaire devient significative, entraînant une augmentation du rayon hydrodynamique puis la précipitation du polymère, lorsque celui-ci est complètement neutralisé.

Lorsque des résidus histidine sont greffés sur la IPEI par la fonction amine, le comportement en solution aqueuse diffère de celui du polymère de départ. Nous observons pour toutes les IPEI-N-his une zone de solubilité à pH acide, comme pour la IPEI. Puis lorsque le pH augmente, une zone de turbidité apparaît, démontrée par l'augmentation du rayon hydrodynamique. Enfin, à pH élevé les IPEI-N-his redeviennent solubles quelque soit leur taux de greffage. Nous observons que la zone de pH de turbidité varie avec le taux de substitution de la IPEI en résidus L-histidine. Ce comportement est expliqué par les équilibres acide-base de chacune des fonctions ionisables du polymère. A faible pH, les fonctions amines et imidazoles sont protonées, et la fonction carboxylique neutralisée. Une augmentation de pH provoque la déprotonation des fonctions carboxylique, pour donner des fonctions carboxylate en quantité égale à celle des fonctions imidazolium. L'augmentation ultérieure de pH provoque en premier lieu la déprotonation des fonctions imidazolium, puis des fonctions ammonium du squelette IPEI, jusqu'au point isoélectrique, où la concentration en fonctions carboxylate est égale à la concentration en fonctions ammonium portées par le squelette IPEI. Ce point isoélectrique se situe dans la zone turbide. A pH élevé, les seules fonctions ioniques sont de type carboxylate, et permettent ainsi la solubilité du polymère. Le taux de modification croissant en

L-histidine-N-acryloyle ramène la zone turbide vers le pH physiologique (pH=7,4). Il faut donc travailler avec des polymères ayant un taux de modification en L-histidine-N-acryloyle inférieur à 24%.

L'étude de l'évolution des Rh des macromolécules en solution en fonction du pH n'a pas été conduite, mais les résultats déjà exprimés au chapitre précédent concernant la viscosité de ces polymères (chapitre 3 paragraphe II-2. 2. 7) nous laisse imaginer que le Rh croît avec la charge globale du polymère, comme déjà déterminé dans d'autres travaux²⁰⁰. En première approche, nous postulons que ce phénomène est un avantage pour améliorer la compaction d'un polyélectrolyte négatif lors de formation de complexe entre macromolécules de charge globale opposée.

Nous avons conduit les mêmes expériences en milieu tamponné (tampon HEPES 60 mM, HEPES 60mM contenant 5% de glucose, HEPES contenant 5% de glucose et 150 mM de NaCl), correspondant aux différents tampons relevés dans la littérature pour préparer des complexes entre polymère cationique et plasmide. Nous avons déterminé des zones turbides correspondant exactement à celles présentées dans la figure 4-1, quelque soit le taux de substitution de la IPEI (11 et 19 %).

I-2. 1. 2 Détermination de la mobilité électrophorétique des IPEI-N-his

I-2. 1. 2. 1. Principe de mesure du potentiel zêta

La mesure du potentiel zêta ζ est généralement utilisée pour obtenir la charge nette globale en surface d'une particule ou d'un complexe vecteur/ADN, soluble en solution aqueuse. Cette mesure donne une indication de la stabilité potentielle du système colloïdal. Par cette technique, nous avons accès à des informations dans le cas de solide dispersé dans un liquide ou dans le cas d'une émulsion.

Le schéma 4-2 présente une particule chargée négativement en surface et les différents potentiels existant au sein de ce système, dans le modèle de Guoy-Chapman-Stern, en fonction de la distance à cette surface.

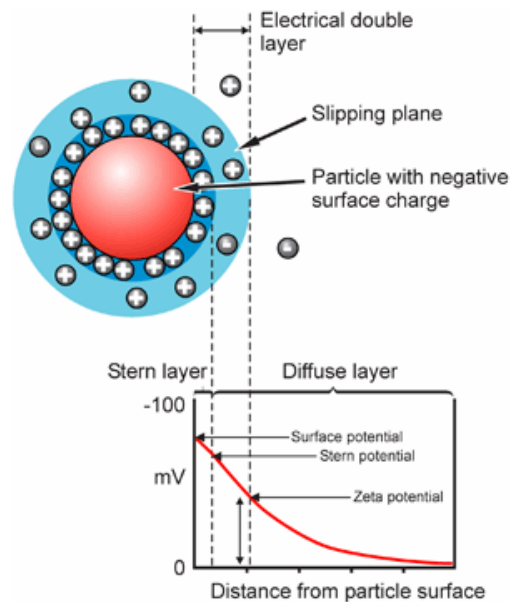


Figure 4-2 : Schéma représentatif du potentiel zêta²⁰¹

Le développement d'une charge nette à la surface d'une particule affecte la distribution des ions dans la région interfaciale environnante, résultant en une concentration plus grande en contre-ions (ions de charge opposée à celle de la particule) proche de la surface. Une double couche électrique existe autour de chaque particule. D'après le modèle de Guoy-Chapman-Stern de la double couche, celle-ci est constituée, d'une part, d'une région interne, appelée couche de Stern, où les ions sont liés fortement, et, d'autre part, d'une région externe, diffuse, où les ions sont moins fermement attachés, entraînant de l'électro-osmose.

A l'intérieur de cette couche diffuse, il existe une frontière où les ions et les particules forment une entité stable. Quand la particule diffuse (surtout par gravité), les ions dans cette limite diffusent avec elle, mais les ions au-delà de cette limite ne se déplacent pas avec la particule. Cette frontière est appelée la surface de cisaillement hydrodynamique ou du plan de glissement. Le potentiel qui existe à cette frontière est connu sous le nom de potentiel ζ .

Le principe de cette technique est la mesure de la mobilité électrophorétique des particules. Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules chargées suspendues dans cet électrolyte sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Les forces liées à la viscosité du milieu agissant sur les particules tendent à s'opposer à ce mouvement. Quand un équilibre est atteint entre ces deux forces, les particules se déplacent avec une vitesse constante.

Cette vitesse, appelée mobilité électrophorétique, dépend de :

- la force du champ électrique ou de la tension,
- la constante diélectrique du milieu,
- la viscosité du milieu,
- le potentiel zêta.

Le potentiel zêta d'une particule peut être obtenu alors par l'équation d'Henry :

$$U_E = -\frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

Avec ζ le potentiel zêta, U_E la mobilité électrophorétique, $\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0$ la constante diélectrique, η la viscosité et $f(\kappa a)$ la fonction de Henry (κ^{-1} la longueur de Debye et a le diamètre de la particule).

Les déterminations électrophorétiques du potentiel ζ sont généralement réalisées en solution aqueuse, à des concentrations en électrolytes modérés. Dans ce cas, $f(\kappa a)$ est pris égal à 1,5, approximation connue comme l'approximation de Smoluchovski²⁰². Le modèle de Smoluchovski suppose des particules de taille supérieure à 0,2 microns, dispersées dans des électrolytes contenant plus de 10^{-3} mol de sels. Dans le cas de solutions non polaires, on fait l'approximation de Huckel, menant à une valeur de $f(\kappa a)=1$.

I-2. 1. 2. 2 Applications aux systèmes lPEI-N-his

Depuis peu, l'étude du potentiel zêta ζ est utilisée également pour caractériser les polymères en solution^{200, 203}. D'après la littérature, il est possible d'obtenir des valeurs exploitables de potentiel ζ d'une macromolécule polyélectrolyte, amphiphile, si l'étude est réalisée dans des concentrations en polymère comprises entre 10^{-6} et 10^{-1} mol.L⁻¹. La variation du potentiel ζ en fonction du pH est présentée en fonction du taux de L-histidine greffé sur la lPEI (figure 4-3).

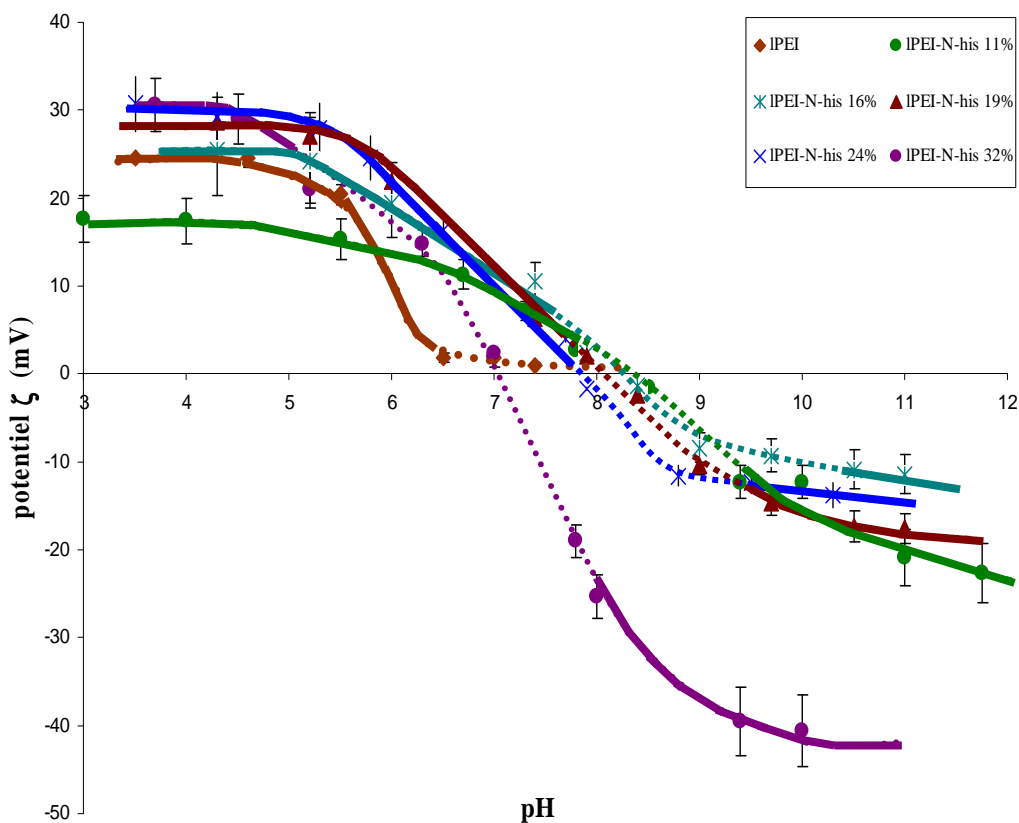


Figure 4-3 : Variation du potentiel zêta (ζ (mV)) en fonction du pH pour les IPEI-N-his à différents taux de modification ($[polymère]=10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), à $T^{\circ}\text{C}=25^{\circ}\text{C}$, (trait en pointillé= zone turbide, trait plein, zone de solubilité)

Les mesures du potentiel ζ ont été réalisées à l'aide du Zêtasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd United Kingdom), pour les échantillons de IPEI, IPEI-N-his 11%, 16%, 19%, 24% et 32%. La cellule utilisée pour ces mesures est constituée de deux électrodes et d'un capillaire en U, moulée dans une cellule de mesure de précision. La concentration en polymère est fixée à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à $T = 25^{\circ}\text{C}$, en solution aqueuse (milliQ) préalablement filtrée sur un filtre millipore de $0.2\mu\text{m}$ de diamètre. Les valeurs présentées sont obtenues après dix mesures réalisées, l'incertitude est obtenue par le calcul de l'écart type moyen.

A pH acide ($\text{pH} < 7$), la IPEI est cationique. L'augmentation du pH déprotone les amines secondaires du polymère faisant diminuer le potentiel ζ du vecteur. Il est à noter que cette diminution du potentiel coïncide avec l'augmentation du rayon hydrodynamique à partir du $\text{pH} = 7$ (de 30 nm au lieu de 15 nm ($\text{pH} = 5,5$)).

Le caractère ampholyte des IPEI-N-his est clairement identifié sur la figure 4-3 par un potentiel ζ positif à pH acide et négatif à pH basique pour l'ensemble des IPEI-N-his. Dans ces deux cas extrêmes, pH acide et basique, et d'après la théorie de Helmholtz-Smoluchowski, nous pouvons considérer que le potentiel zêta mesuré correspond à un potentiel de surface d'une macromolécule gonflée. En revanche, le potentiel ζ dans la zone turbide correspond à celui de particule de polymères précipités, et nous faisons l'hypothèse que la charge de surface de ces particules est représentative de la charge globale du polymère. Nous en

déduisons alors un pH isoélectrique (pH_{iapp}) caractéristique du point isoélectrique de nos polymères. Comme pour l'étude du rayon hydrodynamique des vecteurs, le pH_{iapp} croît avec l'augmentation en taux de modification de la IPEI par l'histidine-N-acryloyle.

En comparant les résultats des figures 4-1 et 4-3, nous remarquons que les pH_{iapp} se situent toujours dans la zone de turbidité des polymères (figure 4-4), c'est à dire dans une zone pour laquelle la charge globale des macromolécules tend vers 0. Dans le domaine anionique ($pH=11$), le potentiel ζ mesuré doit croître avec le taux de substitution en résidus histidine, c'est-à-dire en fonctions carboxylate. Ce phénomène est observé pour les forts taux de substitution, c'est-à-dire dans les zones de solubilité des polymères. Pour les faibles taux de substitution, la condensation des IPEI-N-his semble augmenter l'incertitude de la mesure du potentiel ζ .

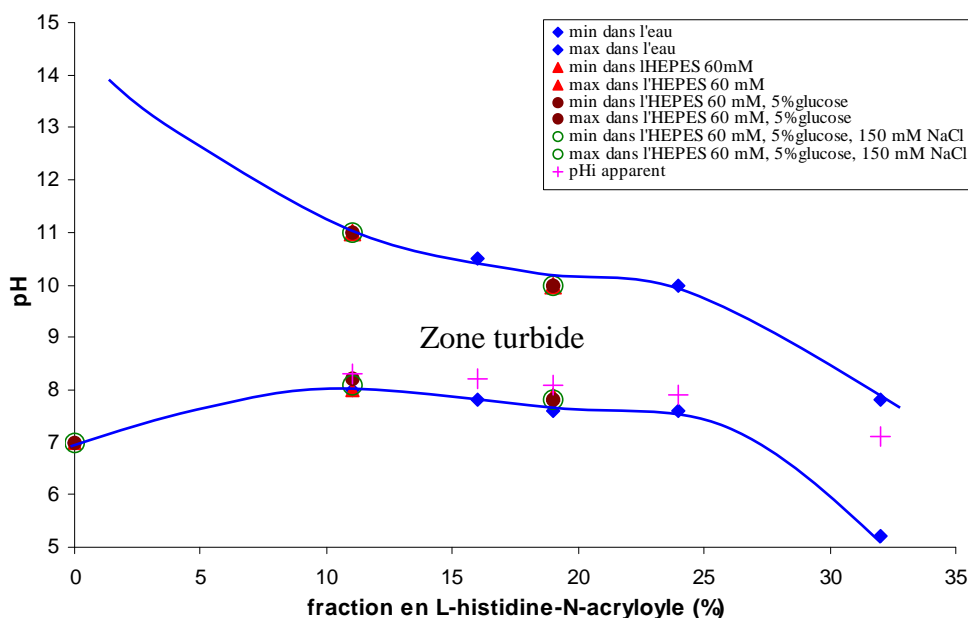


Figure 4-4 : zone de turbidité des IPEI-N-his en fonction du pH dans différents milieux aqueux

Ces deux études ont aussi été réalisées sur la IPEI-N-his Me. Les résultats sur la variation du rayon hydrodynamique et du potentiel zêta, en milieu aqueux, montrent un comportement similaire à celui obtenu pour la IPEI-N-his. Ce résultat surprenant peut être expliqué par l'hydrolyse de la fonction ester du polymère, qui n'a pas pu être mise en évidence par RMN ^{13}C , par manque de produit.

I-1 .2 les lPEI-N-ad, lPEI-N-his-N-ad et lPEI-N-his-N-arg

II-1. 2. 1 Détermination de la solubilité des lPEI-N-ad, lPEI-N-his-N-ad et lPEI-N-his-N-arg

Le comportement en milieu aqueux des lPEI-N-ad 5%, lPEI-N-his 24%-N-ad 5% et lPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% est aussi étudié par diffusion dynamique de la lumière (figure 4-5), et comparé à ceux déjà décrits pour la lPEI et la lPEI-N-his 24%. Ces trois nouveaux polymères possèdent aussi une variation de leur rayon hydrodynamique en fonction du pH.

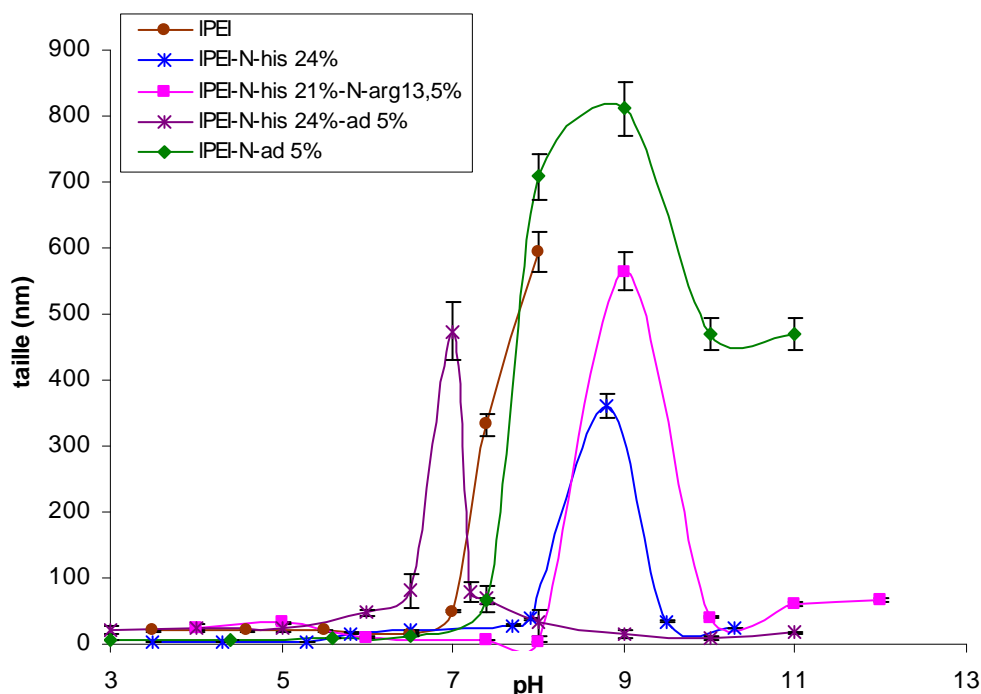


Figure 4-5 : Variation du rayon hydrodynamique (R_h (nm)) en fonction du pH, des lPEI et lPEI-N-his 24%, lPEI-N-ad, lPEI-N-his 24%-N-ad 5% et lPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% ($[polym\grave{e}re]=1\text{ g/L}^1$) à $T^\circ\text{C}=25^\circ\text{C}$

La lPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% possède le même comportement que la lPEI-N-his 24%. A pH acide, ce vecteur est soluble en solution aqueuse, déduit par son faible rayon hydrodynamique (20 nm). L'augmentation du pH permet la déprotonation des fonctions carboxylique puis ammonium du polymère, ce qui entraîne l'apparition d'une zone turbide entre les pH 8 et 10. A pH élevé, la lPEI-N-his21%-N-arg 13,5% est à nouveau soluble en solution aqueuse, expliqué par la présence de fonctions carboxylate sur le polymère.

Le greffage de résidus adamantyle sur la lPEI augmente l'hydrophobie des lPEI greffé, quelque soit le pH considéré. La lPEI-N-ad 5% est parfaitement soluble à $\text{pH}<7,4$, ce qui est expliqué par la protonation

du squelette IPEI. Toutefois, le rayon hydrodynamique du polymère (30 nm) est plus élevé que celui de la IPEI (15 nm). Cette observation pourrait être expliquée par l'association des unités hydrophobes du polymère. Une étude en concentration confirmerait cette hypothèse. La condensation de la IPEI-N-ad 5% est observée à un pH légèrement supérieur à celui de la IPEI, et des tailles de particules de l'ordre de 800 nm sont mesurées, alors qu'une précipitation complète de la IPEI est observée au dessus de pH=8. De plus un pH basique permet d'obtenir des tailles moyennes de particules de l'ordre de 500 nm. Une stabilisation du diamètre moyen des particules en augmentant le pH n'était pas escomptée, et aucune explication ne semble rendre compte de ce résultat.

L'évolution du Rh de la IPEI-N-his24%-N-ad5% suit un comportement similaire à celui de la IPEI-N-his 24%. Une zone turbide à pH proche de la neutralité est observée, soit un pH plus faible que lorsque l'adamantane n'est pas greffé sur IPEI-N-his 24%. Une explication possible est la diminution du pKa moyen du polymère, expliqué par la transformation de fonctions amine secondaire en fonctions amine tertiaire. Le faible taux de fonctionnalisation de la IPEI-N-his 24% par les greffons 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle, ne peut totalement expliquer ce résultat, et un autre phénomène doit probablement aussi être mis en jeu. L'étude du potentiel zêta (paragraphe suivant) peut donner une explication à ce phénomène.

II-2. 2. 2 Détermination de la mobilité électrophorétique des IPEI-N-ad, IPEI-N-his-N-ad et IPEI-N-his-N-arg

Le graphique (figure 4-6) montre l'évolution du potentiel ζ (mV) en fonction du pH, pour les échantillons : IPEI-N-his 24%, IPEI-N-his 24%-N-ad 5% et IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% en solution aqueuse (filtrée sur filtre millipore 0,22 μ m de diamètre, à [polymère]=1mg/ml, à 25°C).

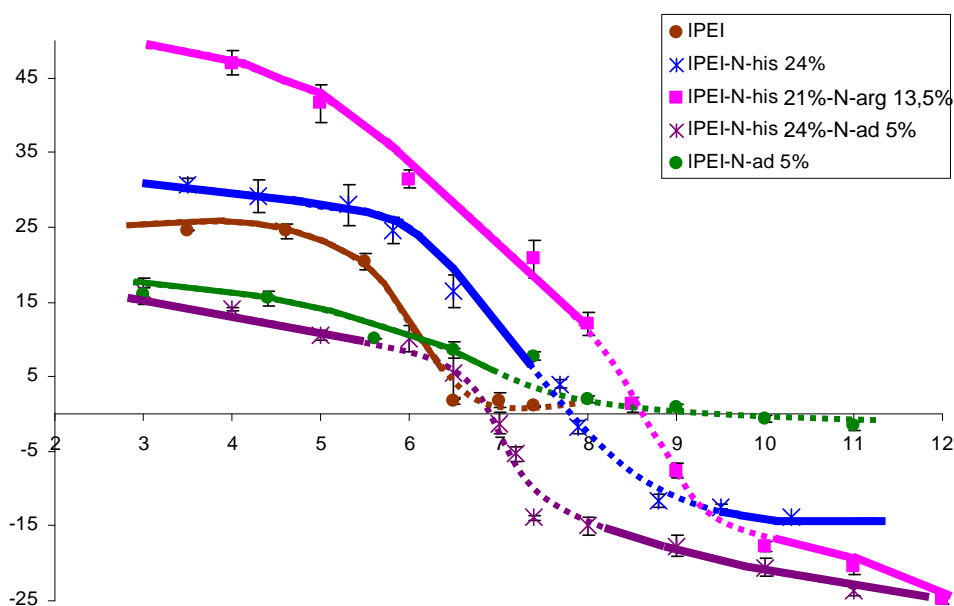


Figure 4-6 : Variation du potentiel zêta (ζ (mV)) en fonction du pH pour les IPEI-N-his24%, IPEI-N-ad 5%, IPEI-N-his 24%-N-ad 5% et IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% ($[polymère]=10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), à $T^{\circ}\text{C}=25^{\circ}\text{C}$, (trait en pointillé= zone turbide, trait plein, zone de solubilité)

L'évolution de la mobilité électrophorétique de la IPEI-N-ad 5% suit une évolution similaire à celle de la IPEI en fonction du pH. Nous observons un potentiel ζ positif à faible pH puis neutre à partir de $\text{pH}=9$. A nouveau, le greffage de résidus adamantyle génère des fonctions amine tertiaires dont le pK_a est plus faible que celui des amines secondaires initiales, ce qui devrait diminuer le pH auquel le potentiel ζ s'annule. Le greffage de fonction hydrophobe telles que les résidus adamantyle doit certainement provoquer une auto-association de ces unités en milieu aqueux. Toutefois, la relation entre un phénomène d'auto association et cette annulation du potentiel ζ mérite une étude plus approfondie, hors du cadre de ce travail. Nous notons une excellente corrélation entre la zone d'annulation du potentiel ζ et la zone de turbidité présentée figure 4-5.

La variation du potentiel ζ de la IPEI-N-his 24%-N-ad 5% en fonction du pH suit une variation escomptée, à savoir positif à faible pH et négatif à pH élevé. A nouveau, à pH faible, le comportement de la mobilité électrophorétique est gouverné par la forte proportion de fonctions ammonium et imidazolium portée par les macromolécules, alors qu'à pH élevé, seule les fonctions carboxylate interviennent dans la mobilité électrophorétique des macromolécules. Le pH isoélectrique de la IPEI-N-his24%-N-ad 5% est inférieur à celui de la IPEI-N-his24%. La génération de fonctions amine tertiaire ne peut complètement expliquer cette forte variation (faible taux de substitution), et un autre phénomène impliquant les résidus adamantane doit intervenir dans cette variation. A nouveau, l'étude de la mobilité de polyélectrolytes possédant des résidus adamantyle nécessiterait une étude complète afin de mettre en évidence les lois de comportement de ce nouveau polymère. Le $\text{pH}_{i_{app}}$ est compris dans la zone turbide de pH, indiquant à

nouveau que la neutralisation des macromolécules est la cause de leur précipitation. Ce décalage de zone turbide est un handicap pour la préparation de complexe entre ces polymères et un polyélectrolyte négatif à $\text{pH}=7,4$.

L'évolution de la mobilité électrophorétique de IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5% suit un comportement similaire à celui de la IPEI-N-his 24%, avec un décalage du $\text{pH}_{i_{app}}$ vers les pH élevés, comme attendu lorsque l'on augmente le taux de sites basiques par macromolécules. Le $\text{pH}_{i_{app}}$ est à nouveau dans la zone turbide de ces polymères, ce qui indique l'intérêt des charges pour la solubilité de ces nouveaux polymères.

I-2 - Titration acido-basique des IPEI-N-his

Lors d'une expérience de formation d'un complexe polyélectrolyte négatif-polyélectrolyte positif, le nombre de charges portées par chacune des macromolécules va contrôler la force de l'interaction entre macromolécules de charges opposées. Il est donc nécessaire de connaître la densité de charge des polymères en fonction du pH. Une attention particulière doit être portée aux différents pH d'utilité ($\text{pH}=7,4$ lors de la formulation, $\text{pH} = 5,5$ lors du relargage du polyplexe dans le cytosol). Le taux de protonation des macromolécules que nous avons synthétisées peut être déduit d'une titration acide-base en solution aqueuse^{163, 164}. Cette étude est réalisée sur les IPEI-N-his de 7 à 67%, en prenant la IPEI en référence.

La IPEI étant insoluble en solution basique, les titrations ont été effectuées dans 9 ml d'eau contenant 33% de HCl 0,1M, de façon à ramener toutes ces solutions à un pH de 2. Les polymères sont neutralisés par de la soude 0,05M. Les échantillons sont préparés à une concentration de 25 mM (en amine du squelette de la IPEI) (figure 4-7). Le temps entre chaque mesure de pH est déterminé par la stabilité de la mesure. Ainsi, dans la zone de turbidité, les temps entre chaque mesure sont augmentés.

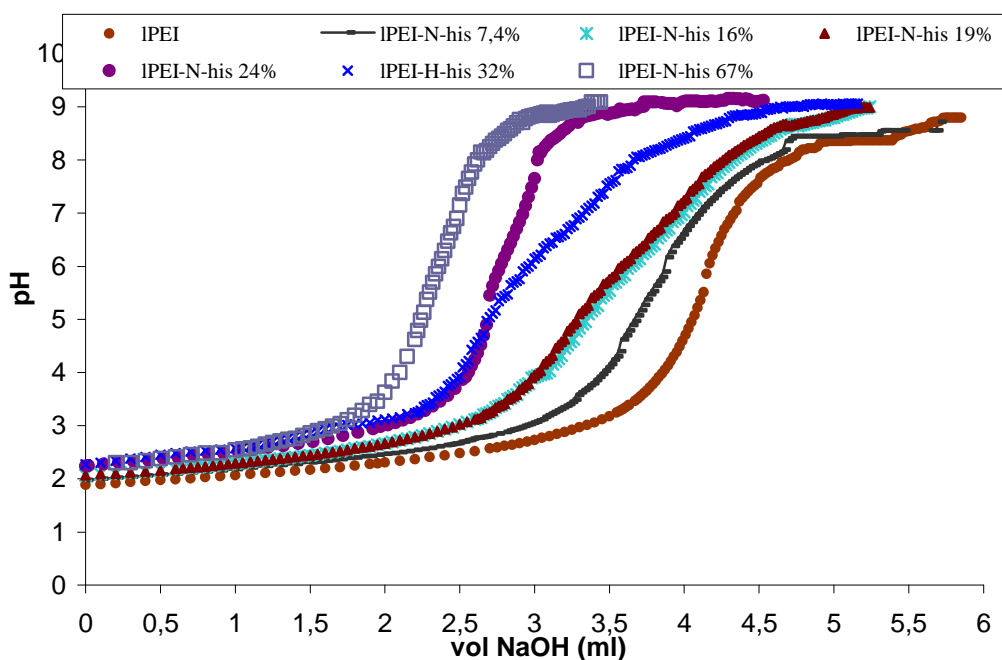


Figure 4-7: Titration de la solution aqueuse des IPEI, IPEI-N-his de 7,4 à 67% ([EI] = 25 mM) avec une solution de NaOH (0,05M) de pH=2 à 9. Des solutions ont été ajustées à pH = 2 avec du HCL 0,1 M. Ensuite, des aliquotes de 20 μ l de NaOH à 0,05 M sont ajoutés et le pH a mesuré avant chaque ajout.

I-2 .1 capacité tampon des polymères

Nous avons indiqué dans le chapitre bibliographique qu'un mécanisme d'éponge à proton permet une libération plus efficace du polyplexe de l'endosome dans le cytosol. Midoux et col.¹²¹ ont montré que le greffage de fonctions L-histidine sur la polylysine augmente le pouvoir tampon, et donc la libération des polyplexes dans le cytosol. Nous analysons en premier l'évolution du pouvoir tampon des IPEI-N-his en fonction du pourcentage de greffage de la L-histidine-N-acryloyle. L'addition de Michael a comme conséquence l'apparition de résidus imidazole et carboxylique ainsi que des fonctions amine tertiaire, diminuant ainsi la fraction d'amine secondaires du squelette de la IPEI. Le pouvoir tampon est défini comme la quantité de protons exigée pour diminuer le pH d'une unité, donc est proportionnel à l'inverse de la pente de la courbe de titration sur la gamme de pH considéré. Afin de se placer dans les conditions d'acidification d'un endosome, nous déterminons ce pouvoir tampon sur une gamme de pH de 5 à 7.5 (figure 4-7)¹⁶³.

Des pentes de 0,159 ml, 0,229 ml, 0,328 ml, 0,330 ml, 0,335 ml, 0,134 ml, 0,121 ml ont été respectivement mesurées pour les IPEI, IPEI-N-his 7,4%, 16%, 19%, 24%, 32% et 66%. Le pouvoir tampon augmente avec le taux de greffage en L-histidine-N-acryloyle (apport de fonctions imidazole et amines tertiaires)^{121, 204} jusqu'au pourcentage de greffage proche de 25%. Ensuite, le pouvoir tampon diminue (pour les IPEI-N-his 32% et 66%), ce qui serait dû au nombre croissant d'amines tertiaires et de fonctions carboxylate sur ces polymères¹⁶³.

I-2 .2 Détermination de pKa

Dans une étude sur la protonation de la bPEI, Pais *et col.*²⁰⁵ ont déterminé les différents pKa de la bPEI en étudiant la variation de $d[\text{HCl}]/d\text{pH}$, défini aussi comme le pouvoir tampon, en fonction du pH. Ces auteurs ont proposé un modèle mathématique permettant de rendre compte des différents pKa observés pour la bPEI. Ce modèle ne s'est pas appliqué à nos polymères, mais nous avons toutefois étudié la variation de $d\text{pH}/d[\text{NaOH}]$ en fonction du volume de soude versée. Nous avons sélectionné la IPEI-N-his 16%, qui nous le verrons donne les meilleurs résultats de transfection.

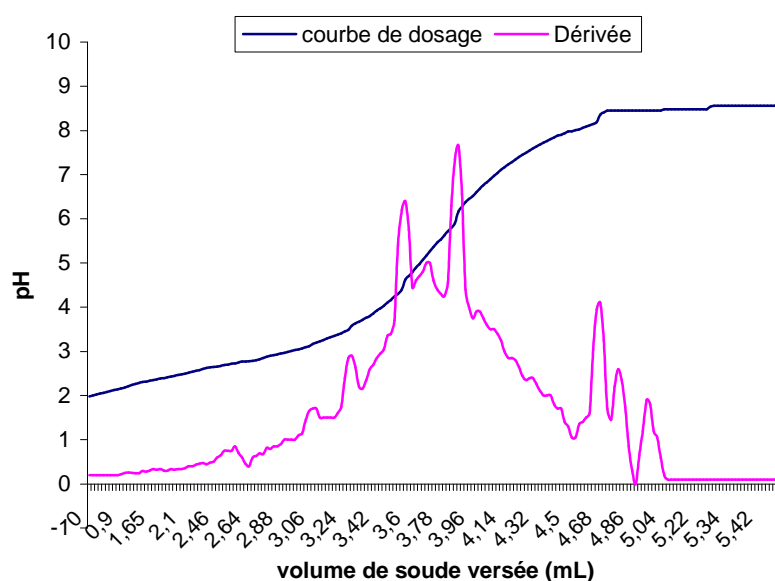


Figure 4-8 : Titration de la solution aqueuse de polymère ($[EI] = 25 \text{ mM}$) avec une solution de NaOH (0.05M) de $\text{pH}=2$ à 9 de la IPEI-N-his 16% et dérivée associée à cette titration

Les courbes de titration acide base mettent en évidence les pKa des espèces protonables, d'une molécule ou macromolécule. Les pKa des acides-bases faibles sont déterminés au volume de la demi-équivalence lors du dosage. Cependant, le polymère titré en figure 4-8 est plus complexe qu'une simple molécule ; et il est difficile d'identifier correctement les pKa des fonctions amine et carboxylate. Les pKa de ces nouveaux vecteurs sont déterminés à l'aide de la courbe de dérivée de la courbe de dosage, qui met en évidence les volumes équivalents du dosage d'une espèce. A partir de la figure 4-8 nous voyons apparaître un ensemble de pics sur la dérivée de cette courbe de dosage permettant de déterminer différents pKa associés aux fonctions présentes dans les IPEI-N-his que nous avons synthétisées. Ces pKa sont rapportés dans le tableau 4-1.

Tableau 4-1 : Récapitulatif des volumes de soude versée à l'équivalence, la demi-équivalence, des pKa associés aux volumes des demi-équivalences et les fonctions protonables adjointes.

Volume de soude versée aux équivalences (mL)	Volume de soude versée aux demi-équivalences (mL)	pKa	Attribution possible des espèces protonables de la IPEI-N-his
3,03	1,9	-	
3,28	3,17	3,3	Fonction carboxylate
3,58	3,37	3,8	Fonction carboxylate
3,72	3,65	4,9	Fonction imidazole
3,88	3,8	5,6	Fonction imidazole
4,72	4,68	7,5	Amine tertiaire
4,78	4,75	8,45	Amine secondaire

Ces différents pKa peuvent être rapportés aux fonctions carboxylate, imidazole et amine présentes sur les IPEI-N-his. Ces différentes fonctions sont rappelées sur la figure 4-9.

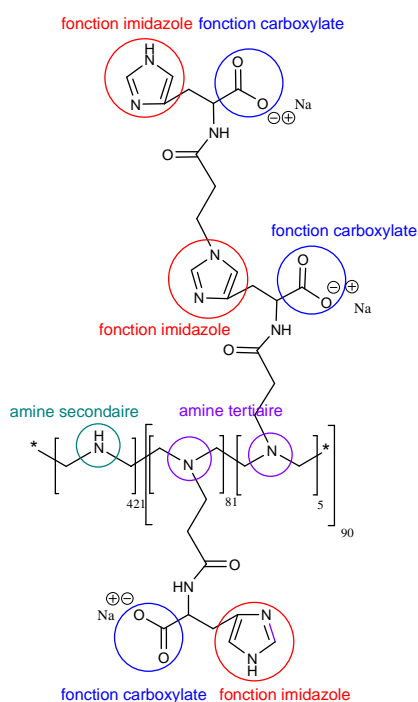


Figure 4-9 : structure schématique de la IPEI-N-his avec les espèces protonables identifiées dans un cercle

D'après la figure 4-9, la IPEI-N-his possède 6 espèces protonables composées de deux fonctions carboxylique et 2 fonctions imidazole, une fonction amine tertiaire et secondaire en première approximation. Nous identifions aisément de la courbe de dosage 8 pKa, et nous proposons d'essayer de les attribuer aux fonctions portées par les IPEI-N-his.

Sachant que le pKa d'un acide carboxylique²⁰⁶ varie de pKa=2 (acide aminé) à pKa=4, les pKa de 3,3 et 3,8 peuvent être attribués aux deux fonctions carboxylique du vecteur.

Le polymère possède deux fonctions imidazoles, dont l'une a réagi lors de la synthèse du matériau. Connaissant la zone de pKa des fonctions imidazole, nous proposons que les deux pKa à 4,9 et 5,6 soient

attribués aux résidus imidazole. Enfin les deux derniers pKas, pKa=7,5 et pKa=8,45, sont respectivement attribués à l'amine tertiaire et l'amine secondaire du polymère car le pKa de l'amine tertiaire est normalement plus faible que celui de l'amine secondaire²⁰⁶.

Nous ne discriminons pas les attributions des deux fonctions imidazole et des deux fonctions acides carboxyliques car il aurait fallu travailler sur les modèles de polymère pour pouvoir attribuer sans ambiguïté ces différentes fonctions. Le point intéressant est de noter que les fonctions imidazole ont un pKa situé autour de la zone d'intérêt, c'est-à-dire entre 5 et 6.

I-2 .3 densité de charge

Les IPEI-His ont un caractère polyélectrolyte et possèdent un comportement modulable selon le pH de la solution. En utilisant les courbes de dosages de la figure 4-7 et un dosage acide fort/base forte, un taux de charges f^+ (équation 15) des polymères (IPEI et IPEI-N-his de 7 à 24%) a pu être déterminé en fonction du pH (figure 4-10).

$$f^+ = \frac{[N^+]}{[N]_{total}} \quad \text{équation 15}$$

Le taux charge est déterminé par la quantité de base nécessaire à la neutralisation de l'acide fort soustraite de la quantité de base ajoutée à la IPEI-N-his. On détermine alors la concentration de N^+ dans la solution que l'on rapporte à la concentration totale en unité éthylène imine. Les résultats sont présentés sur la figure 4-10, et la courbe mesurée pour la IPEI reproduit une allure déjà mentionnée²³⁻²⁵. Nous observons que la modification des unités éthylènimine par la L-histidine-N-acryloyle permet d'augmenter le taux de protonation du polyélectrolyte, pour un pH donné. L'augmentation du taux de protonation suit le ratio d'éthylènimine modifiée. Ceci est tout à fait en accord avec les expériences de viscosimétrie décrites au chapitre 3 (paragraphe II-2. 2. 7), qui indiquait qu'à pH=5,5, la IPEI est déjà étirée, dû à son taux de protonation alors que la IPEI-N-his est toujours sous forme de pelote statistique. Une plus forte densité de répulsion électrostatique existe donc sur la IPEI à pH=5,5, thermodynamiquement défavorable à toute protonation ultérieure. Il faut aussi tenir compte des fonctions carboxylate de la IPEI-N-his dont le rôle de coopératif de protonation est évident.

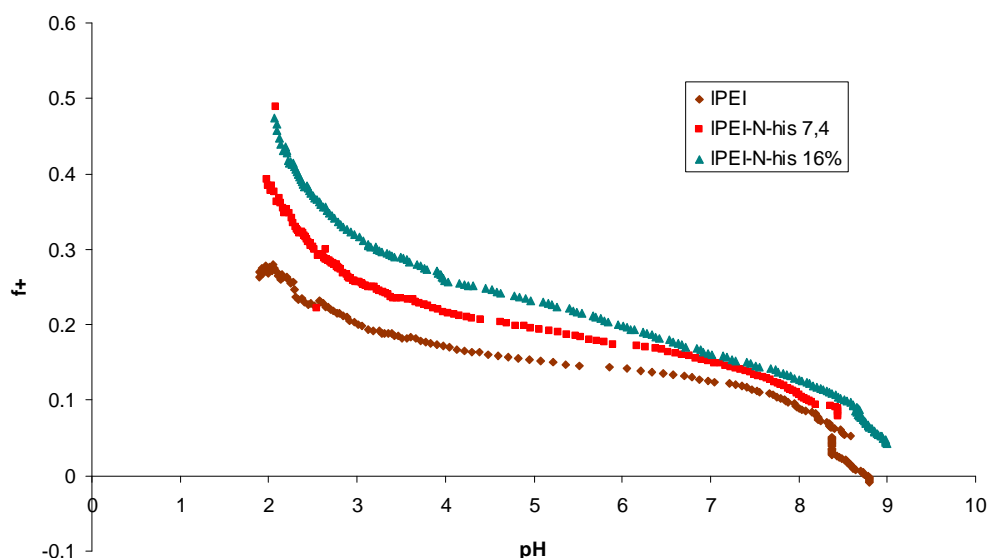


Figure 4-10 : taux de charge f^+ des IPEI et IPEI-N-his en fonction du pH, obtenue par titration acide base ($[EI]=25mM$ pour les IPEI, IPEI-N-his 7,4% et IPEI-N-his 16%)

I-3 - Taux de charge des IPEI et IPEI-N-his 19% analysé par RMN 1H

La protonation des amines a une influence directe sur les déplacements chimiques des pics de résonance magnétique nucléaire des protons des groupements CH_2 des unités éthylènimines (EI) des polymères et des protons portés par les fonctions imidazole de l'histidine. Il est donc possible de suivre l'évolution du taux de charge des polymères en suivant l'évolution du déplacement chimique des groupements CH_2 en fonction du pH. On fait l'hypothèse dans la suite que la substitution des atomes d'hydrogène par le deutérium influence peu le résultat.

En utilisant une référence connue dont le f^+ a été déterminé par titration, il est possible d'utiliser ensuite la RMN pour évaluer le f^+ . La démonstration est effectuée pour les IPEI ($[EI]=0,47M$) et IPEI-N-his 19% ($[IPEI-N-his19\%]=0,52M$) (figure 4-11), dont les spectres RMN 1H sont réalisés à différents pHs, en solution dans du D_2O . Nous analysons en première approximation uniquement le taux de protonation du squelette IPEI (la protonation des fonctions imidazole effective à $pH=4$ ne sera pas analysée).

D'après la figure 4-11A, le signal de résonance des groupements CH_2 de la IPEI se trouve à $2,9ppm^{26}$, pour un pD du D_2O de 8. A mesure que la quantité d'acide DCL augmente, le pic de résonance des CH_2 se déplace vers les champs faibles. La présence d'un seul pic de résonance indique que les échanges [ammonium-amine] sont rapides. Nous déduisons que le taux de charge f^+ est uniforme, le long du polycation.

D'après les résultats de la figure 4-11, le taux de charge f^+ en fonction du pD est calculé à partir d'un taux de charge déterminé par titration acide base ($f^+=0,2$ à pH=4) et montre que la IPEI est peu chargée à pH=7,4 ($f^+=0,15$) (figure 4-12).

La même approche est utilisée pour la IPEI-N-his 19% (figure 4-11B). Le pic correspondant aux unités éthylène imine non protonée est à 2,25 ppm (pH=8) et se déplace vers les champs faibles lorsque le pH diminue. Ce résultat met en évidence la protonation des fonctions amine secondaires et tertiaires du squelette de la IPEI-N-his 19%. Ceci nous permet alors de calculer le taux de charge f^+ des unités EI du polymère (la protonation des unités imidazole, quoique impliquée mais négligée en première approximation). La figure 4-11B montre que le taux de charge de la IPEI-N-his 19% ($f^+=0,13$) est sensiblement plus élevé, à pH=7,4 que celui de la IPEI ($f^+=0,15$), expliqué par la présence d'amines tertiaire sur le squelette EI et de fonctions carboxylate et imidazole. Les spectres RMN ^1H de ce polymère mettent aussi en évidence le déplacement des protons du groupement imidazole (pics à 7,67 et 6,97 ppm) car les amines du cycle se protonent ($\text{pK}_a=6$), et peuvent participer à l'augmentation de la densité de charge à pH acide.

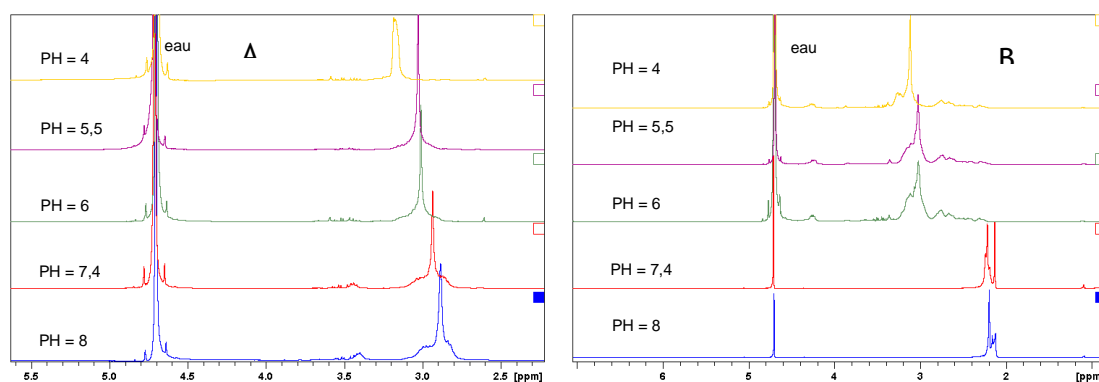


Figure 4-11 : Evolution des spectres RMN ^1H de la IPEI (A) ($[\text{EI}]=0,47\text{M}$) et IPEI (B) ($[\text{EI}]=0,52\text{M}$) en fonction du pH

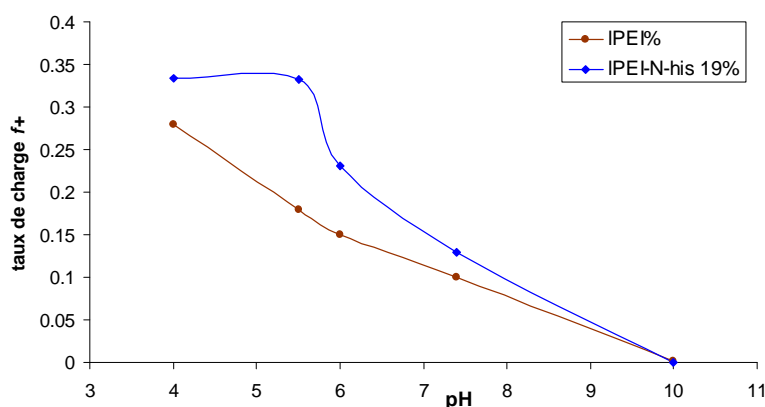


Figure 4-12 : taux de charge f^+ des unités EI de la IPEI (en marron) et de la IPEI-N-his 19% (en bleu) en fonction du pH ($[\text{IPEI-N-his 19\%}]=0,52\text{M}$ et $[\text{IPEI}]=0,47$), déterminé par RMN ^1H

II – Formulation et Caractérisations des polyplexes vecteurs/ADN

La formation de polyplexes consiste en un mélange d'une solution de polymère versée dans une solution contenant le plasmide d'intérêt. L'interaction électrostatique entre les fonctions ammonium du polyélectrolyte positif et les unités phosphate portées par le plasmide permet de former des nanoparticules dont les tailles sont déterminées par la méthode de formulation. Pour utiliser ces nanoparticules à base de polymère (polyplexes) en transfert de gène, elles doivent avoir un diamètre moyen inférieur à 100 nm¹⁵³. De plus, le potentiel de surface de ces nanoparticules doit être positif afin de permettre l'interaction avec les peptidoglycanes chargés négativement des membranes cellulaires, et de faciliter l'internalisation des polyplexes par les cellules^{26, 27, 105}. Nous allons dans ce paragraphe étudier la formulation de polyplexes avec l'ensemble des polymères synthétisés dans ce travail, afin d'obtenir des nanoparticules de petite taille et possédant un potentiel ζ positif. L'ADN utilisé est toujours le plasmide pTG11033 possédant 9,5 kb. Dans un premier temps, nous évaluerons la quantité de polymère nécessaire à la complexation totale du plasmide, afin d'évaluer la densité d'énergie cohésive du polyplexe. Celle-ci doit être suffisamment élevée pour rester sous forme de nanoparticule même en milieu dilué, mais suffisamment faible pour permettre la libération du plasmide une fois la particule internalisée.

II-1 – Formation des complexes IPEI-N-his/ADN

II-1. 1 Formation des complexes IPEI-N-hist/ADN

La première partie de cette étude consiste à déterminer la quantité de polymère nécessaire à la complexation totale d'une quantité connue de plasmide. Expérimentalement, nous déterminons dans un premier temps la quantité de polymère nécessaire pour la complexation d'1 μ g de plasmide, en utilisant les IPEI-N-his modifiées entre 2 et 67%. Les essais sont effectués par la formulation de 1 μ g de plasmide ($n_{\text{phosphate}} = 3,3 \cdot 10^{-3}$ mol) en présence d'une quantité croissante de polymère (de 0,5 à 7 μ g). Le pH du milieu est fixé à 7,4, tampon HEPES 10 mM.

La démonstration de la complexation est déterminée par électrophorèse. Une complexation totale du plasmide par un polymère est démontrée par une non-migration de ce plasmide lorsque soumis à une tension de 90 mV dans un gel d'agarose 6% (figure 4-13).

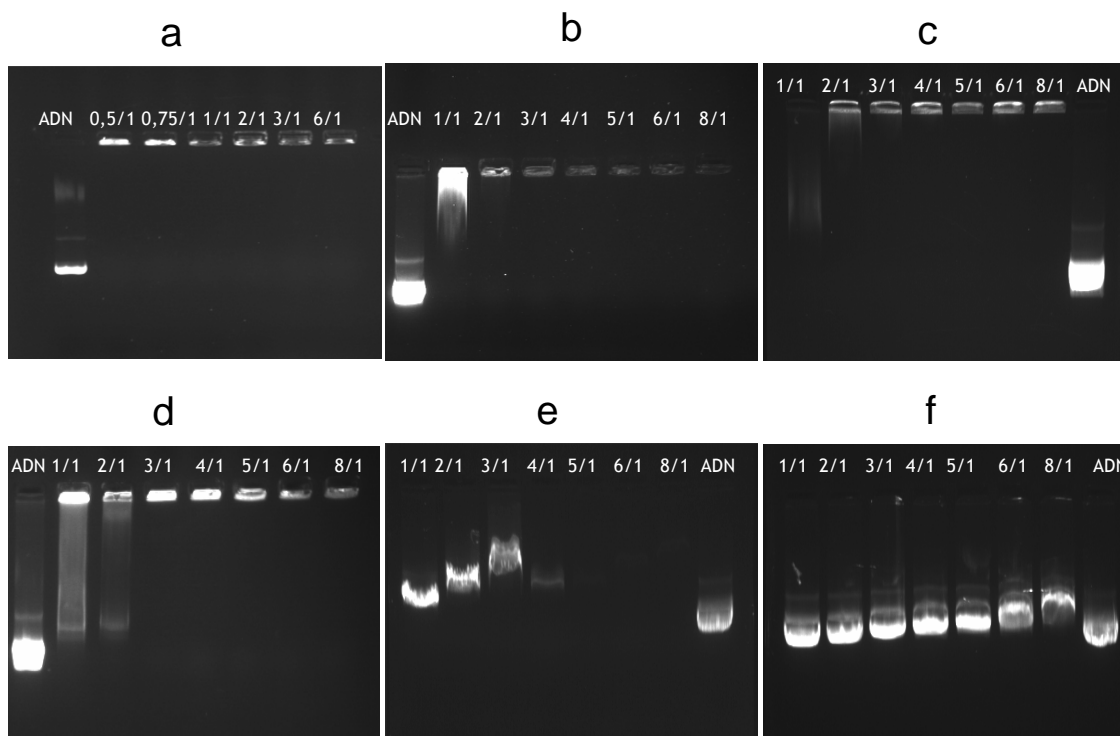


Figure 4-13 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide par les IPEI (a), IPEI-N-his 7,4% (b), 16% (c) 24% (d), 32% (e) et 67% (f) à différents ratios polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.

Tableau 4-2 : Récapitulatif des ratios de complexation totale du plasmide pTG11033 (9,5 kb) exprimé en w/w et N/P des IPEI, IPEI-N-his 7,44%, 16%, 24% et 32% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg de plasmide $[plasmide]_{initiale}=1\mu g/ml$)

Vecteurs	Ratio vecteur/ADN (w/w)	Ratio N _{EL} /P
IPEI	0,5/1	3,5
IPEI-N-his 7,44%	2/1	10
IPEI-N-his 16%	3/1	12
IPEI-N-his 24%	3/1	10
IPEI-N-his 32%	4/1	11

Le tableau 4-2 présente les ratios vecteur/ADN (w/w) et N/P associés au ratio (w/w) qui complexent totalement l'ADN pour les différents IPEI-N-his. La IPEI est indiquée en référence.

Nous remarquons que le greffage d'un résidu L-histidine sur la chaîne IPEI provoque une augmentation de la quantité de polymère nécessaire à la complexation totale du plasmide. Cependant à un taux important de résidu histidine (67%) sur la IPEI, le vecteur ne complexe plus le plasmide, quelque soit le ratio IPEI-N-his/ADN en poids utilisé (w/w de 1/1 à 8/1). De façon surprenante, il n'existe pas de relation entre la fraction de résidus L-histidine greffés sur la IPEI et la quantité de polymère nécessaire à la complexation totale de 1 µg d'ADN. Ce résultat peut être expliqué par trois phénomènes agissant de façon synergique, et diminuant ainsi l'efficacité de complexation de 1 µg de plasmide par le polymère cationique :

- La modification de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle entraîne une diminution de la fraction d'amines secondaires portées par le squelette IPEI au profit de la fraction en fonctions amine tertiaire, peu protonées à pH physiologique¹³⁶. Toutefois, nous avons vu dans le paragraphe précédent que la IPEI-His est plus protonée à pH donné que la IPEI.
- Le greffage d'unités L-histidine, peu protonées à pH physiologique, provoque un encombrement stérique peu propice à la formation de complexe entre le polymère cationique et le plasmide.
- Enfin, nous rappelons qu'à ce pH, les fonctions carboxylique sont déprotonées et interagissent probablement avec les fonctions ammonium de la chaîne de IPEI. Une « consommation » des unités ammonium par ces fonctions carboxylate apportées par les résidus L-histidine est aussi à l'origine de la plus grande quantité massique de polymère nécessaire à la complexation totale du plasmide.

Cette dernière raison nous semble prédominante lorsque le taux de greffage de la IPEI par l'histidine-N-acryloyle atteint 23, puis 67%. Cette affirmation sera plus loin confortée par les mesures du potentiel ζ de ces particules. D'un point de vue général, l'augmentation du taux de substitution des unités éthylènimine de la IPEI entraîne une diminution de la capacité de complexation de plasmide^{163, 164, 166}, en particulier pour la IPEI greffée par des résidus carboxylate¹⁶⁹.

II-2. 2 diamètres et charges des complexes IPEI-N-his/ADN

En thérapie génique, le diamètre des complexes doit être le plus petit possible (<100nm)¹⁵³ pour obtenir un transfert de gène efficace. Les diamètres moyens des polyplexes ont été estimés par diffusion dynamique de la lumière, en faisant varier le taux de greffage des IPEI-N-his. Le ratio polymère/plasmide est fixé à 6 :1 (w/w), car cette valeur est suffisante pour toujours complexer le plasmide, quelque soit le taux de greffage de la IPEI par la L-histidine-N-acryloyle. Une étude standard de complexation serait réalisée en rapport $N_{\text{polymère}}/P_{\text{ADN}}$ constant. Toutefois, la forte variation de masse molaire du polymère cationique avec le taux de greffage en unités L-histidine nous conduit à prendre comme référence le rapport massique polymère/ADN. La première approche de ce travail est de considérer la formation de polyplexes pour une application de type *in vivo*. La concentration en plasmide est de $[\text{plasmide}] = 7,5 \mu\text{g}$. Le tableau 4-3 regroupe les mesures des tailles des polyplexes ainsi que les potentiels ζ correspondants, pour l'ensemble des formulations IPEI-N-his/ADN, pour des valeurs variables du taux de greffage.

Tableau 4-3 : Récapitulatif des diamètres et des charges des polyplexes au ratio (w/w) 6/1 pour une quantité en IPEI-N-his de 45 µg et en ADN de 7,5µg ($2,5 \cdot 10^{-2}$ mol de P)

Polymères	Pourcentage en his-N-acryl (%)	Quantité de polymères (mol de N)	Tailles (nm)	Potentiel zêta (mV)
EB104b	2	$12,7 \cdot 10^{-2}$	$132,7 \pm 36,4$	$8,9 \pm 3,1$
EB130b	7,44	$10,2 \cdot 10^{-2}$	$170,7 \pm 48,3$	$6,6 \pm 2,5$
EB112c	10	$9,4 \cdot 10^{-2}$	$110 \pm 87,6$	$8,1 \pm 4,7$
EB112b	11	$9 \cdot 10^{-2}$	$114,2 \pm 37,8$	$8,4 \pm 3,2$
EB117b	13,5	$8,4 \cdot 10^{-3}$	$310,8 \pm 68,1$	$7,3 \pm 2,9$
EB131b	16	$7,8 \cdot 10^{-3}$	$349,5 \pm 36,6$	$1,3 \pm 0,7$
EB135a	22	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$422,6 \pm 46,2$	$3,1 \pm 1,1$
EB134a	24	$6,4 \cdot 10^{-3}$	$400,3 \pm 86,4$	$2,9 \pm 0,7$
EB146b	32	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$1007,1 \pm 105,4$	$-13,6 \pm 4,3$

Ce tableau indique que des diamètres moyens de polyplexes proches de 100 nm peuvent être obtenus jusqu'à un taux de substitution de la IPEI-N-his de 11%. Au-delà de ce pourcentage de substitution, le diamètre moyen des polyplexes croît jusque 1 µm, dans le cas de la IPEI-N-his-32% qui, nous l'avons déjà vu, complexe mal l'ADN. Pour toutes ces formulations, les polyplexes ont un potentiel ζ positif, ce qui est nécessaire pour une application en transfert de gène. Une relation directe entre le diamètre moyen des polyplexes et le taux de greffage est difficile puisque l'étude est menée en ratio w/w. Toutefois, les faibles taux de substitution permettent d'obtenir des diamètres moyens de particules inférieurs à ceux obtenus pour des taux de substitution élevés. Ces résultats préliminaires montrent qu'il est possible d'atteindre l'objectif de diamètres moyens de polyplexes proche de 100 nm escompté²⁰⁷, malgré le greffage d'unités L-histidine.

II-2 - Formation des complexes IPEI-N-arg/ADN

Les tests de complexation du plasmide pTG11033 (9,5 kb) sont réalisés avec la IPEI-N-arginine (14% et 22% en L-arginine-N-acryloyle) selon le principe déjà décrit au paragraphe précédent. Le résultat de l'expérience d'électrophorèse est rapporté figure 4-14.

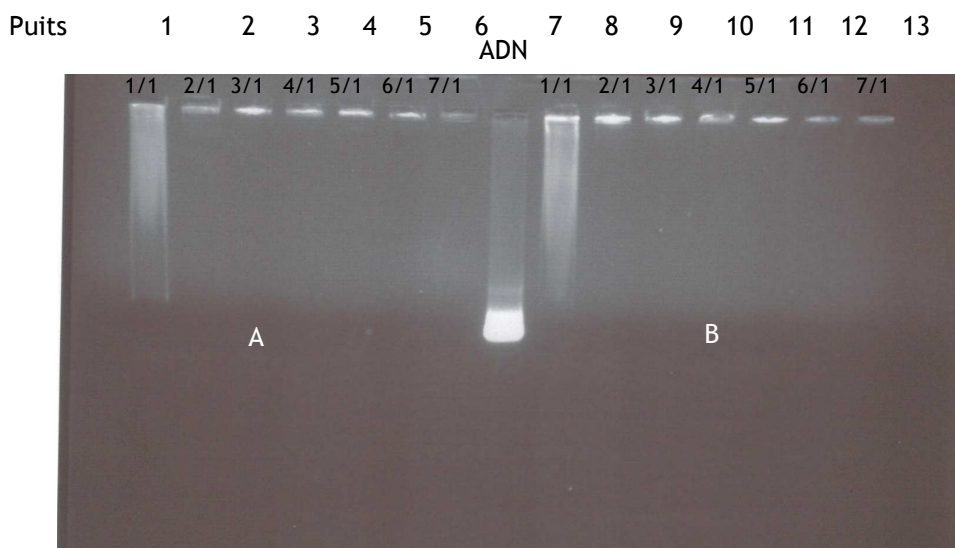


Figure 4-14 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par les IPEI-N-arg 14% (a) et IPEI-N-arg 22% (b) à différents ratios polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.

La migration de l'ADN est stoppée pour un ratio w/w de 2/1 quelque soit la fraction de L-arginine sur le polymère. Ce rapport est présenté en ratio molaire $N_{\text{polymère}}/P_{\text{ADN}}$ dans le tableau 4-4.

Tableau 4-4 : Récapitulatif des ratios de complexation limites w/w et N/P des IPEI, IPEI-N-his 16%, IPEI-N-arg 14% et 22% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg d'ADN)

Vecteurs	Ratio vecteur/ADN (w/w)	Ratio N/P
IPEI	0,5/1	3,5
IPEI-N-his 16%	3/1	12
IPEI-N-arg 14%	2/1	10
IPEI-N-arg 22%	2/1	8

Nous observons, qu'à la précision de l'expérience près, la IPEI modifiée par la L-arginine-N-acryloyle ou la L-histidine-N-acryloyle présente une capacité de complexation de l'ADN comparable dans la gamme de taux de greffage analysé. Une analyse plus précise par fluorimétrie pourrait être conduite, afin d'évaluer plus précisément les capacités relatives de complexation de ces deux polymères. En tenant compte du pKa élevé du groupement guanidium (pKa = 13), la IPEI-N-arg doit être plus chargée que la IPEI-N-his pour un même taux de greffage à pH=7,4. Une meilleure capacité de transfection pourrait alors être imaginée.

II-3 - Formation des complexes IPEI-N-ad/ADN

La littérature fait état de nombreux exemples de complexation de l'adamantane par la cyclodextrine. Davis et col.^{129, 130, 161} ont utilisé cette stratégie pour synthétiser des polymères cationiques incorporant des cyclodextrines dans lesquelles ils ont encapsulé des ligands susceptibles d'améliorer le ciblage de leurs polyplexes ultérieurement formés. Dans cette partie, nous évaluons la possibilité d'utiliser des polymères à base de IPEI possédant des unités adamantane, permettant de former un complexe d'inclusion avec des CD greffées par les ligands, pour former des polyplexes.

II-3. 1 Influence du taux de modification de la IPEI en fonctions adamantane sur les propriétés de complexation de plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=7,4

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le greffage de résidus adamantyle sur la IPEI par une fonction ester conduit à une dégradation de cette fonction au cours du temps. Les résultats de formation de polyplexes avec ces polymères, bien qu'intéressants, ne seront donc pas discutés dans ce travail. Nous allons présenter les travaux menés sur la complexation du plasmide pTG11033-luc possédant 9,5 kb par la IPEI-N-ad avec 4 taux de greffage différents : 0,4% ; 4%, 22 % et 24 %. Les polyplexes sont formulés à pH = 7,4 en tampon HEPES 10 mM. La concentration en plasmide dans la solution initiale est de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$.

La quantité de polymère nécessaire à une complexation complète de 1 μg de plasmide est déterminée par électrophorèse, comme déjà présenté dans le paragraphe précédent. A nouveau, les rapports considérés sont de type massique afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus pour la IPEI-N-his. Les résultats d'électrophorèse sont présentés figures 4-15 et 4-16.

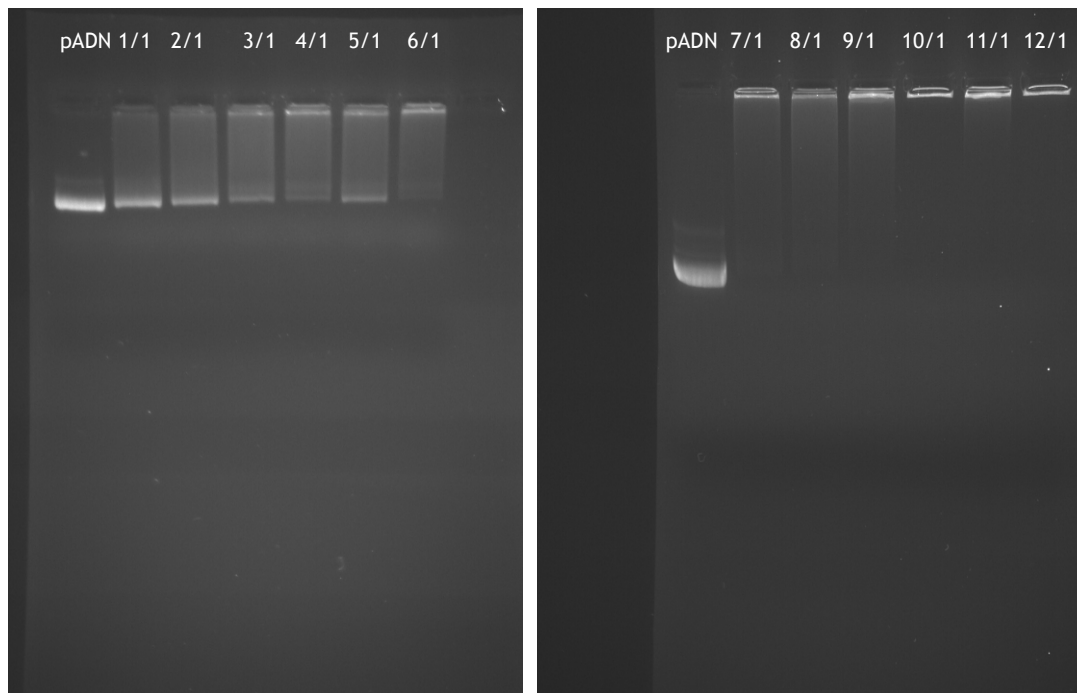


Figure 4-15 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par la IPEI-N-ad 4% à différent ratio polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans le tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.

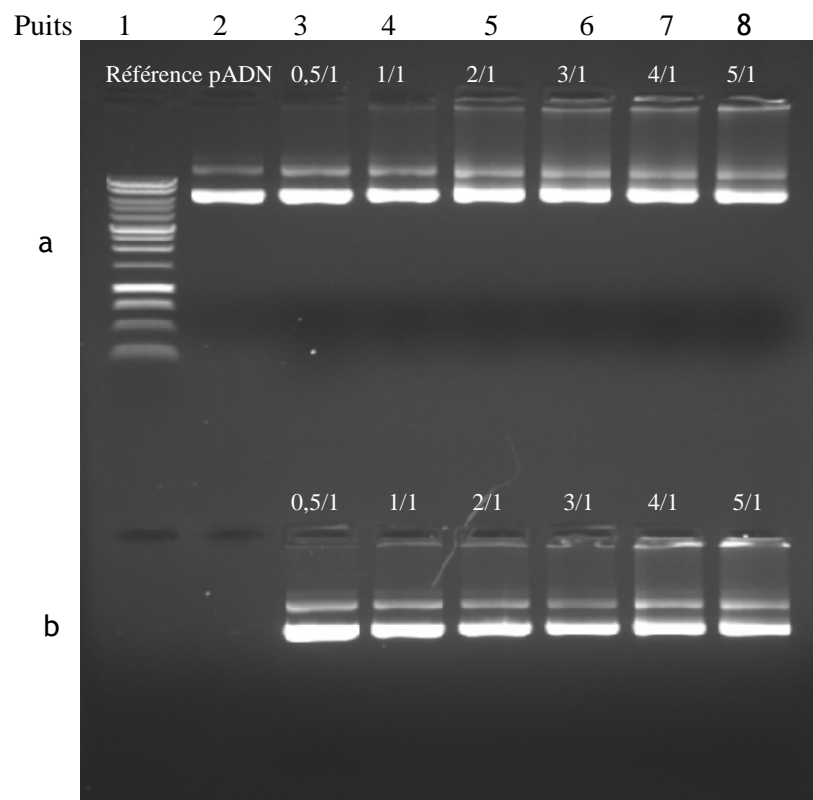


Figure 4-16 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation de l'ADN par les IPEI-N-ad 22% (a) et 24% (b) à différent ratio polymère/plasmide (w/w), les polyplexes sont réalisés dans le tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.

L'observation des figures 4-15 et 4-16 met en évidence deux comportements distincts. A faible taux de modification de la IPEI par le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle, le polymère forme des polyplexes avec le plasmide. En revanche, en augmentant le taux de substitution de la IPEI par les résidus adamantyle (22 et 24%), aucune complexation du plasmide n'est observée dans la gamme de rapport de concentrations massiques analysée. Pour expliquer cette observation, nous avons déterminé le rayon hydrodynamique de la PEI-N-ad en milieu aqueux à $C = 2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, par DDL. Nous observons que le polymère IPEI-N-Ad22% a un rayon hydrodynamique de 200 nm, bien supérieur à celui escompté pour une macromolécule isolée. Nous expliquons ce résultat par la formation d'un gel physique, par création d'une phase hydrophobe. Pour les taux de greffage en résidus adamantyle de 0,4 et 4%, le rayon hydrodynamique mesuré dans les mêmes conditions est de 38 nm, ce qui est proche de celui mesuré pour la IPEI (70 nm). Malgré cette faible association, des polyplexes sont formés avec le plasmide pTG11033-luc possédant 9,5 kb, et les rapports polymère/plasmide (w/w) limite de complexation sont reportés dans le tableau 4-5, et comparé avec ceux obtenus pour des polymères référence.

Tableau 4-5 : Récapitulatif des ratios limites de complexation w/w et N/P du plasmide pTG11033-luc possédant 9,5 kb, par les IPEI, IPEI-N-ad 0,4%, 4% et 23% dans le tampon HEPES pH=7,4 (pour 1 µg d'ADN)

Vecteurs	Ratio vecteur/ADN (w/w)	Ratio N/P
IPEI	0,5/1	3,5
IPEI-N-ad 0,4%	10/1	10
IPEI-N-ad 4%	10/1	10
IPEI-N-ad 24%	-	-
IPEI-N-his 16%	3/1	12

Nous observons que le greffage de résidus adamantyle sur la IPEI diminue le pouvoir complexant du polymère cationique vis-à-vis d'un polyélectrolyte négatif. Nous expliquons ce résultat par la formation de microgel physique issu d'une ségrégation de phase des greffons adamantyle. Afin de trouver des conditions de formulation permettant de diminuer le phénomène de formation de gels physiques, nous avons procédé à une série de formulation à pH plus faible. Un taux de protonation plus élevé de la chaîne IPEI est escompté, permettant d'augmenter la répulsion électrostatique des chaînes et donc de limiter la formation du gel physique.

II-3. 2 Formulation de polyplexes IPEI-N-ad 22% ou 24%/plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=5

Les tests de complexation sont réalisés en solution HEPES, pH=5, pour les IPEI-N-ad 22 et 24% pour une quantité massique de polymère entre 0,5 à 6 μ g. La figure 4-17 montre le résultat de l'analyse électrophorétique pour des rapports polymère/plasmide (w/w) compris entre 0.5 et 6.

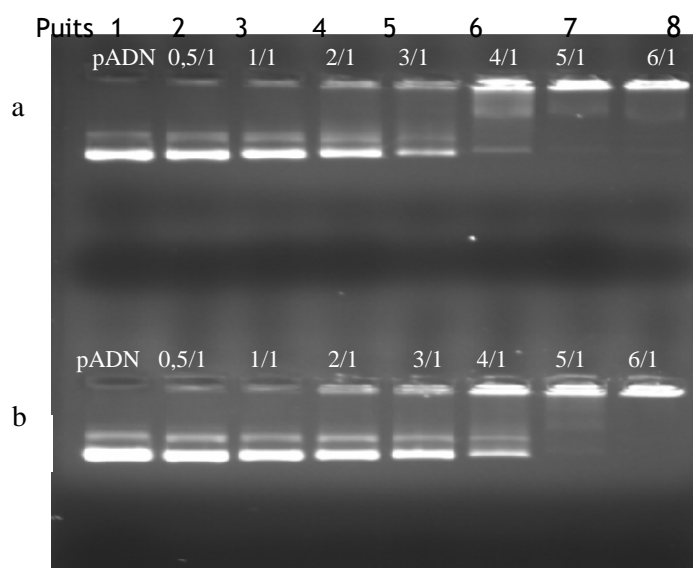


Figure 4-17 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide pTG11033 (9,5 kb) par les IPEI-N-ad 22% (a) et 24% (b) à différent ratio polymère/plasmide (w/w). Les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=5.

Nous observons que cette formulation permet d'observer une complexation totale du plasmide pour le rapport polymère/plasmide (w/w) 6/1. Une formulation en milieu acide, pH=5,5, permet d'augmenter les répulsions électrostatiques entre polyélectrolytes positifs et empêche la formation de gel physique. Ce résultat intéressant permet de conclure que dans ces formulations, le résidu adamantane est probablement disponible pour la formation d'un complexe d'inclusion avec un dérivé de cyclodextrine (CD).

II-3. 3 Formulation de polyplexes IPEI-N-ad 22 ou 24%/plasmide pTG11033 (9,5 kb), conduite dans le tampon HEPES à pH=5 et en présence de β CD

Nous faisons l'hypothèse que lors d'une formulation à pH=5, les unités adamantyle sont moins impliquées dans des interactions hydrophobes, et donc disponibles pour effectuer des complexes d'inclusion avec des CD qui porteraient des fonctions de ciblage¹⁶¹. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons conduit une série d'expérience de complexation de l'ADN avec de la IPEI comportant des résidus adamantane, en présence de cyclodextrine. Dans cette approche, les résidus adamantane inclus dans la β -cyclodextrine (β CD) deviennent hydrophiles, et les limitations liées à la formation de gel physique discutées précédemment sont alors éliminées.

La première série d'expérience est conduite en effectuant le complexe d'inclusion entre la β CD et l'adamantane en premier lieu, puis l'on forme les polyplexes avec le plasmide pTG11033 possédant 9,5 kb (figure 4-18). L'ensemble des rapports utilisés est rapporté dans le tableau 4-6).

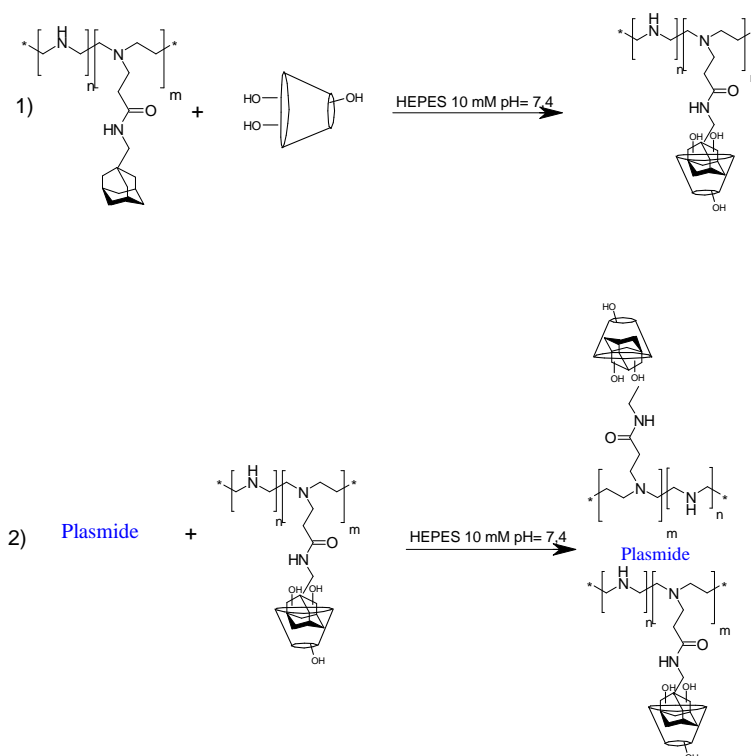


Figure 4-18 : formulation des polyplexes IPEI-N-ad/plasmide en présence de β CD. 1) formation du complexe d'inclusion IPEI-N-ad/ β CD, 2) formation du polyplexe IPEI-N-ad- β CD/plasmide, en tampon HEPES 10 mM à pH=7,4

Tableau 4-6 : Tableau récapitulatif des compositions de polyplexes à base de plasmide pTG11033 possédant 9,5 kp (1µg), de IPEI-Ad-22% et un défaut βCD formulé par complexe d'inclusion (ratio mol/mol) (a), puis réalisation de polyplexe (ratio w/w) (b). Les formulations de polyplexes sont réalisées dans un volume totale de 190 µl de tampon HEPES 10 mM à pH=7,4.

a

Ratio IPEI-N-ad 22/β-CD-POE (mol/mol)	Quantité de IPEI-N-ad 22% mol de Ad		Quantité de βCD	
	(µg)	(µmol)	(µg)	(µmol)
1/1	5,36	1,3*10 ⁻²	14,8	1,3*10 ⁻²
1/0,5	5,36	1,3*10 ⁻²	7,4	6,5*10 ⁻³
1/0,25	5,36	1,3*10 ⁻²	3,7	3,3*10 ⁻³
1/0,0625	5,36	1,3*10 ⁻²	0,9	8,1*10 ⁻⁴

b

Ratio (IPEI- N-ad 22/ADN) (w/w)	Ratio molaire ad/βCD	IPEI-N-ad 22%		
		(µg)	mol de N (µmol)	mol d'Ad (µmol)
4/1	1/1	4	5,4*10 ⁻²	9,7*10 ⁻³
4/1	1/0,5	4	5,4*10 ⁻²	9,7*10 ⁻³
4/1	1/0,25	4	5,4*10 ⁻²	9,7*10 ⁻³
4/1	1/0,0625	4	5,4*10 ⁻²	9,7*10 ⁻³
5/1	1/1	5	6,7*10 ⁻²	1,2*10 ⁻²
5/1	1/0,5	5	6,7*10 ⁻²	1,2*10 ⁻²
5/1	1/0,25	5	6,7*10 ⁻²	1,2*10 ⁻²
5/1	1/0,0625	5	6,7*10 ⁻²	1,2*10 ⁻²
8/1	1/1	8	1,1*10 ⁻¹	1,9*10 ⁻²
8/1	1/0,5	8	1,1*10 ⁻¹	1,9*10 ⁻²
8/1	1/0,25	8	1,1*10 ⁻¹	1,9*10 ⁻²
8/1	1/0,0625	8	1,1*10 ⁻¹	1,9*10 ⁻²

La figure 4-19a montre le résultat de l'analyse par électrophorèse de l'ensemble des polyplexes réalisés à partir des formulations dont les compositions sont rapportées dans le tableau 4-6. Nous observons que l'ajout de βCD ne semble pas réellement modifier les rapports w/w à partir desquels la IPEI-N-ad 22% complexe totalement l'ADN. Ceci montre que l'encombrement stérique du complexe d'inclusion ne perturbe pas, ou peu, la formation du polyplexe. Ce résultat permet d'envisager l'utilisation de βCD portant des fonctions de ciblage en face primaire, si ces derniers possèdent un faible encombrement stérique. Toutefois, cette étude ne démontre pas la localisation des complexes d'inclusion en périphérie du polyplexe, ce qui est indispensable pour une application de ciblage. Nous avons conduit dans un deuxième temps une expérience de formation de polyplexe décoré par la CD.

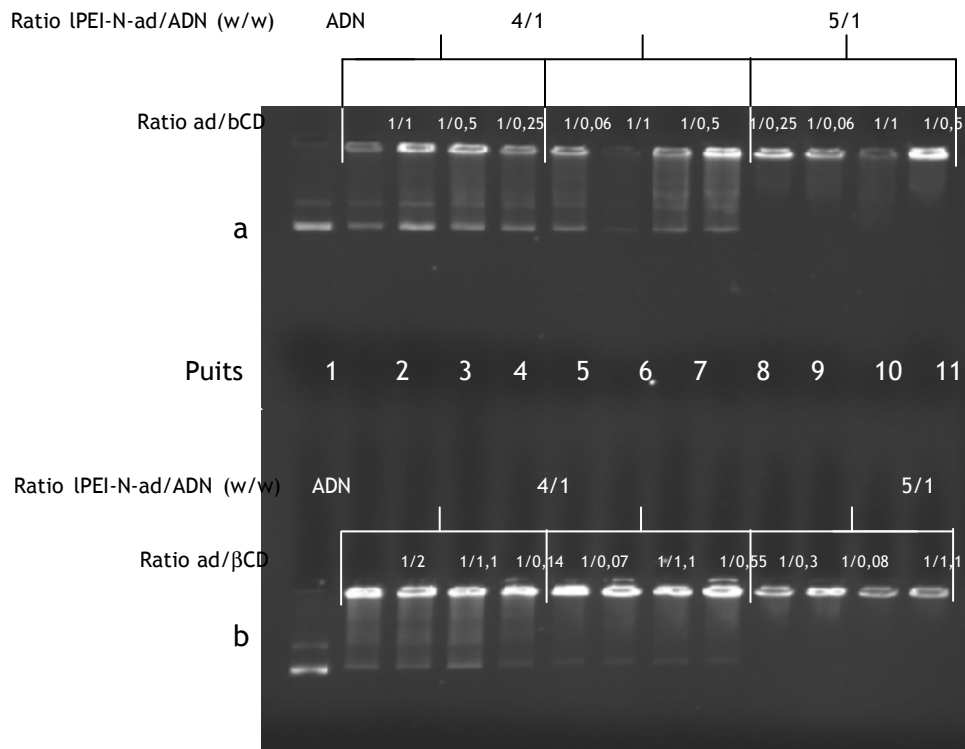


Figure 4-19 : Gel d'agarose électrophorétique des tests de complexation du plasmide pTG11033 (9,5kb) par les IPEI-N-ad 22% avec l'ajout de la β CD avant la formation des polyplexes (a) et après la formation des polyplexes (b), à différent ratio polymère/plasmide (w/w) et résidus adamantane/ β CD (n/n). Les polyplexes sont réalisés dans du tampon HEPES 10 mM à pH=5.

La deuxième série d'expérience est conduite en effectuant, dans un premier temps la formulation du polyplexes, puis la β CD est ajoutée au polyplexe pour former des complexes d'inclusion entre la β CD, et les résidus adamantyle localisés en surface du polyplexe (figure 4-20).

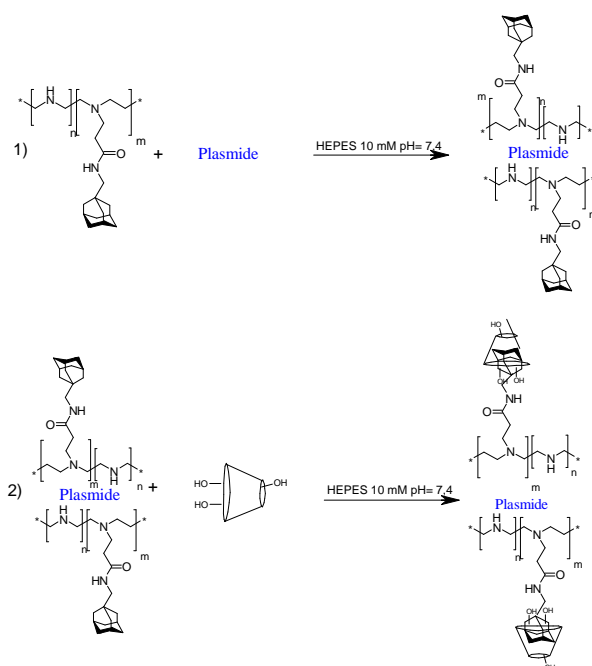


Figure 4-20 : formulation des polyplexes IPEI-N-ad/plasmide en présence de β CD. 1) formation des polyplexes IPEI-N-ad/plasmide, puis 2) formation du complexe d'inclusion des résidus adamantyle/ β CD, en tampon HEPES 10 mM à pH=7,4

L'ensemble des rapports utilisés est rapporté dans le tableau 4-7, et présenté selon le ratio polymère/plasmide et puis l'excès ou le défaut de cyclodextrine par rapport aux fonctions adamantane. Cette étude est conduite avec la IPEI-N-Ad-22% afin d'évaluer au mieux l'impact de complexes d'inclusion sur la formation de polyplexes.

Tableau 4-7 : Tableau récapitulatif des compositions de polyplexes à base de plasmide pGT11033 possédant 9,5 kb (1 μ g), de IPEI-Ad-22% et un excès de β CD. 1) Formulation des polyplexes polymère/plasmide à différents ratio (w/w), dans un volume totale de 190 ml de tampon HEPES 10 mM à pH=7,4. 2) Formation des complexes d'inclusion à différents ratios résidus adamantane/ β CD (ratio molaire), à partir des polyplexes

Ratio (IPEI-N-ad 22/ADN) (w/w)	Ratio molaire ad/ β CD	IPEI-N-ad 22			Quantité de β CD	
		(μ g)	mol de N (μ mol)	mol d'Ad (μ mol)	(μ g)	(μ mol)
4/1	1/2	4	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$9,7 \cdot 10^{-3}$	22	$2,0 \cdot 10^{-2}$
4/1	1/1,1	4	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$9,7 \cdot 10^{-3}$	12	$1,1 \cdot 10^{-2}$
4/1	1/0,14	4	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$9,7 \cdot 10^{-3}$	1,5	$1,4 \cdot 10^{-3}$
4/1	1/0,07	4	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$9,7 \cdot 10^{-3}$	0,8	$6,8 \cdot 10^{-4}$
5/1	1/1,1	5	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	15	$1,3 \cdot 10^{-2}$
5/1	1/0,55	5	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	7,5	$6,6 \cdot 10^{-3}$
5/1	1/0,3	5	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	4,1	$3,6 \cdot 10^{-3}$
5/1	1/0,08	5	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	1,1	$9,6 \cdot 10^{-4}$
8/1	1/1,1	8	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	23,7	$2,1 \cdot 10^{-2}$
8/1	1/0,55	8	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	11,9	$1,0 \cdot 10^{-2}$
8/1	1/0,3	8	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	6,5	$5,7 \cdot 10^{-3}$
8/1	1/0,02	8	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	0,4	$3,80 \cdot 10^{-4}$

L'analyse électrophorétique de cette deuxième série (figure 4-19b) permet d'observer qu'une complexation totale de l'ADN est obtenue lorsque les rapports (w/w) polymère/plasmide dépassent 8/1. Cette amélioration de la complexation par rapport au protocole précédent met en évidence l'intérêt d'ajouter la β CD après formulation du polyplexe. Des expériences complémentaires sont à mené notamment pour démontrer la complexation IPEI-N-ad/ β CD. La faible quantité de plasmide ne permet pas d'utiliser les technique classique dans le domaine, telle que la RMN (ROESY ou DOSY) mais une étude du potentiel z pourrait apporter des données qualitatives sur cette complexation.

II-3. 4 Conclusion

Le greffage de résidus adamantyle sur la IPEI n'empêche pas la formation de complexe avec le plasmide pTG11033 (9,5kb), tant que le taux de greffage est faible. Au-delà d'une certaine valeur, la formation de domaine hydrophobe est observée et limite la formation des polyplexes. Dans certaines conditions, les fonctions adamantane semblent disponibles pour former des complexes d'inclusion avec la β CD. De plus amples caractérisations sont à conduire pour le démontrer de façon indubitable, en utilisant des techniques nécessitant peu de produit à analyser. Toutefois, la décoration de polyplexes par des CD portant des fonctions de ciblage semble être une approche extrêmement prometteuse pour obtenir des assemblages supramoléculaire concentrique, avec l'ADN protégé au centre, et les fonctions de ciblage en périphérie.

III – Formulation des complexes IPEI-N-his/ADN pour la transfection *in vivo*

Nous avons décrit dans le premier chapitre l'importance du diamètre moyen des particules, à atteindre pour obtenir une bonne qualité de transfection. Nous avons vu dans les paragraphes précédents que celui-ci peut être facilement atteint si l'on travaille en solution diluée, afin d'obtenir des formulations utilisables dans le domaine *in vitro* et *in vivo*. Lors d'expériences de transfection *in vitro*, la quantité de plasmide utilisée est de 7,5 μ g ; ce qui est très insuffisant pour des transfection *in vivo*. Lors d'une injection de plasmide dans les souris, la quantité utilisée est de 50 μ g, dans un volume de 200 μ l de solution, pour obtenir une détection du transfert et éviter des injections successives. A cette forte concentration en plasmide, nous pouvons aisément calculer que les chaînes se recouvrent, entraînant lors de la formation de polyplexes des agrégats de diamètre moyen élevé (>500 nm) incompatibles avec les expériences de transfection. Nous reportons dans ce paragraphe les expériences préliminaires de formulations du plasmide pTG11033 (9,5kb) de façon à obtenir de faibles diamètres moyens de particule, en concentration élevée. Le

polymère utilisé est la IPEI-N-his 16%, qui est un bon compromis entre la toxicité et les performances de transfection (expériences discutées dans le paragraphe suivant).

III-1 - Evolution du diamètre moyen des polyplexes en fonction de la concentration de plasmide pour un rapport ADN/LPEI-N-His de 6/1 (w/w)

Pour cette étude, nous avons dilué une quantité croissante d'une solution concentrée de plasmide pTG11033 (9,5 kb) dans 100 μ L de tampon HEPES (10 mM ; pH =7,4). La quantité d'ADN varie entre 5 μ g et 25 μ g. Une solution de IPEI-N-his 16 % y est ajoutée de façon à garder le rapport polymère/plasmide constant (w/w=6/1). Le volume final est fixé à 190 μ L. Le tableau 4-8 présente les formulations des polyplexes IPEI-N-his 16% (au ratio w/w= 6/1) pour différentes quantités d'ADN utilisées. Les diamètres sont obtenus par diffusion de la lumière dynamique.

Tableau 4-8 Diamètres de polyplexes (par diffusion de la lumière dynamique) formulés à partir de IPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différentes quantités d'ADN dans 190 μ l de solution HEPES. ($[plasmide]_{initiale} = 1\text{mg/mL}$)

Exp	Quantité ADN (μ g)	Quantité IPEI-N-his (μ g)	Diamètre (nm)
1	5	30	355 \pm 35
2	7.5	45	350 \pm 37
3	10	60	960 \pm 165
4	25	150	1005 \pm 200

La concentration croissante du plasmide en solution dans le tampon HEPES à pH=7,4 augmente les diamètres moyens des particules de polyplexes formés. Nous interprétons ce résultat par le passage d'un régime dilué à un régime semi-dilué. Ce résultat confirme la nécessité de modifier les protocoles de préparation de polyplexe lorsque l'application *in vivo* est concernée.

Pour diminuer le diamètre moyen des particules en milieu concentré, nous allons évaluer l'importance de différents paramètres sur ce diamètre. Dans un premier temps, nous allons procéder à l'étude de l'évaporation de solvant après formulation en régime dilué afin d'atteindre les concentrations en particule et en plasmide nécessaires.

III-2 - Formulation de polyplexes conduite à différentes concentrations de solution initiale de polymère et de plasmide

Le tableau 4-9 présente la formulation des polyplexes IPEI-N-his 16%, au ratio en poids w/w=6/1 dans différents volumes de solution HEPES 10mM à pH=7,4. Typiquement, une solution de 25 µg d'ADN est diluée dans un tampon, et mélangée à une solution diluée de polymère. Pour garder la concentration de l'HEPES à 10mM, de l'eau milliQ est ajoutée à certaines solutions. Nous analysons dans cette étude l'effet de la dilution des macromolécules, dans les solutions initiales, sur le diamètre moyen des nanoparticules obtenues. La taille de référence pour cette étude est de 1005 nm, polyplexe formé dans 190 µl de solution HEPES pH=7,4 (tableau 4-8, exp4).

Tableau 4-9 : Diamètres (par diffusion de la lumière dynamique) de formulation de polyplexes IPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différents volumes de solution HEPES. ($m_{ADN}=25 \mu g$)

Exp	Quantité ADN (µg)	Volume de sol.1 d'ADN + H ₂ O ajouté (µl)	Sol.2 [IPEI-N-his] (mg/ml)	Vol _{sol2} + Vol _{tampon} IPEI-N-his (µl)	Vol total (µl)	Diamètre (nm)
1	25	100	0,667	45 + 45 de tampon	190	1005 ± 200
2	25	325	1	150 + 150 de tampon	625	730 ± 90
3	25	325 + 1,1 ml H ₂ O	1	150 + 150 de tampon + 1,05 ml H ₂ O	2775	115 ± 50
4	25	325 + 1,1 ml H ₂ O	1	150 + 150 de tampon + 2,7 ml H ₂ O	6170	30 (± 16) - 380 (± 85)

Nous observons que la dilution des macromolécules dans les solutions sol1 et sol2 avant formulation entraîne une diminution du diamètre moyen des polyplexes formés. Cette observation est en accord avec l'hypothèse de régime semi-dilué pour le plasmide lorsque les quantités impliquées augmentent.

Le volume maximal d'injection dans les souris étant de 200µl, les solutions des polyplexes formés du tableau 4-9, sont évaporées à sec avec un speedvac. La poudre formée est récupérée et resolubilisée dans 200µl d'eau milliQ pour garder la concentration en HEPES de 10 mM. Cette solution est passée en diffusion de lumière dynamique pour déterminer les tailles des complexes IPEI-N-his/ADN. Ces diamètres n'ayant pas pu être déterminés au zétasizer, un test de dosage de l'ADN est réalisé. Le dosage en plasmide de la solution montre qu'elle ne contient plus de polyplexe. Les complexes IPEI-N-his/plasmide doivent être adsorbés sur les parois en PE du contenant, ou non dissous à l'étape de remise en solution. Afin d'améliorer ce protocole,

d'autres essais d'évaporation du soluté sont réalisés avec un lyophilisateur et le speedvac en utilisant un flaconnage à paroi en verre.

III-3 - Formulation de polyplexes en milieu dilué, suivi d'une reconcentration par évaporation

L'expérience 3 présentée dans le tableau 4-9 permet d'obtenir des diamètres moyens de particules plus petits que ceux obtenus pour les autres expériences. Elle est la référence de la présente étude. 25 µL de plasmide (1 µg/mL) sont dilués dans 325 mL de solution HEPES (10 mM) puis l'on ajoute 1,1 mL d'eau. Parallèlement, 150 µg de polymère sont dissous dans 300 µL de tampon HEPES (10 mM) puis 1,05 mL d'eau est ajoutés à cette solution. Les deux solutions sont mélangées de façon à former les polyplexes de faible diamètre moyen. L'ajout de sel pour certaines formulations est effectué 30 min. après formation des polyplexes. Nous évaluons ensuite différents procédés pour permettre la concentration de ces polyplexes, puis leur re-dissolution à une concentration typique de ce qui est nécessaire d'injecter dans une souris pour pouvoir évaluer le pouvoir transfectant de ces formulations. Deux méthodes de concentration des polyplexes sont évaluées : le lyophilisateur ou le speedvac. La poudre obtenue est resolubilisé avec de l'eau milliQ pour garder constante la concentration en HEPES (10mM) ou en sel initial (150mM). Le tableau 4-10 regroupe les données concernant la formulation des polyplexes ainsi que leur caractérisation par DDL.

Tableau 4-10 : Influence de méthodes de concentration sur une formulation de polyplexes IPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 conduisant à une concentration de 25 µg de plasmide 9,5kb dans 2,775 µl d'eau milliQ contenant 10mM d'HEPES.

Exp	Présence de sel [NaCl]=0,5M	diamètre avant évaporation (nm)	Méthode d'évaporation	diamètre après évaporation (nm)
1	Non	110	-	-
2	Non	110	Speedvac -tube en verre	n.d.*
3	Non	110	Lyophilisateur	895 ± 90
4	Non	110	Speedvac -tube en verre - reste 200 µl	n.d.*
5	Oui, après 30min	130	-	n.d.*
6	Oui, après 30 min	130	Speedvac -tube en verre	n.d.*
7	Oui, après 30 min	130	Lyophilisateur	n.d.*
8	Oui, après 30min	130	Speedvac -tube en verre - reste 200 µl	n.d.*

* n.d. : non déterminable

Après solubilisation des poudres de polyplexes, seule la méthode de la lyophilisation permet d'accéder à un diamètre de particules (894 nm), mais plus élevé que le diamètre initial (110 nm). Nous faisons l'hypothèse d'une coalescence des polyplexes conduisant à des objets de grand diamètre, non utilisable pour une application de type transfert de gène. Nous pouvons extrapoler sur le fait qu'une élimination totale du solvant est néfaste à la conservation du caractère nano particulaire de nos suspensions.

III-4 - Concentration de polyplexes par filtration sous centrifugation

Nous avons observé que la technique d'évaporation totale ne permet pas de maintenir un diamètre moyen de polyplexes proche de 100 nm lorsque la formulation est conduite en milieu dilué. Nous proposons dans ce paragraphe d'évaluer une méthode de concentration des polyplexes par filtration. L'expérience 3 du tableau 4-9 a montré qu'un volume de 2,775 ml de solution, permet d'obtenir un diamètre moyen de particule de 115 nm pour les complexes IPEI-N-his/ADN (w/w=6/1).

25 ou 100 µL de plasmide (1 µg/mL) sont dilués dans 325 mL de solution HEPES (10 mM) puis ajustés à 1425 µL par de l'eau MilliQ. Parallèlement, 150 µg ou 600µg de polymère sont dissous dans 150 µL ou 600 µL de tampon HEPES (10 mM) puis ajusté à 1350 µL par de l'eau milliQ. Les deux solutions sont mélangées de façon à former les polyplexes de faible diamètre moyen. Les suspensions sont placées dans Falcon équipé d'un filtre 0,05µm, puis centrifugées à 4000g durant 15 min. Environ 200 µl de solution de complexe sont récupérés après filtration dans le filtre, et analysés (tableau 4-11). Nous avons reporté dans ce tableau les caractéristiques de diamètre moyen de particules et de potentiel ζ avant et après filtration.

Tableau 4-11 : Influence d'une filtration de formulation de polyplexes IPEI-N-his 16%/ADN au ratio w/w=6/1 pour différentes concentrations en ADN ([plasmide]_{initiale}=1µg/ml) obtenu dans 2,775 µL d'eau milliQ contenant 10 mM d'HEPES)

Exp	m plasmide (µg)	[IPEI-N-his] (mg/ml)	Volume tampon de la solution de IPEI-N-his (µl)	Volume total (ml)	Diamètre avant filtration (nm)	ζ (mV)	Diamètre après filtration (nm)	ζ (mV)
1	25	1	150 + 150 de tampon + 1,05 ml H ₂ O	2,775	115 ± 36	4 ± 1	310± 90	-4 ±1
2	100	1	600 + 600 de tampon + 150 µl H ₂ O	2,775	187 ± 21	11 ± 0,5	175 ± 35	5 ± 0,5

L'analyse des formulations avant filtration est en accord avec les résultats déjà décrits, une augmentation des concentrations de formulation entraîne une augmentation des diamètres moyens des particules. L'étape de filtration conduit à des particules de diamètre moyen inférieur à 400 nm. De façon surprenante, la

formulation conduite en milieu concentrée est stable alors qu'une coalescence est observée par les polyplexes en milieu dilué. Ce résultat encourageant devrait être vérifié plusieurs fois afin d'être confirmé. Toutefois, nous pouvons conclure que la filtration, si la concentration finale est maîtrisée, est une méthode pertinente de concentration des polyplexes.

III-5 - Influence du pH sur la formulation de polyplexes à base de IPEI-N-His en fonction du milieu de préparation

Afin de rendre compte des conditions possibles de formulation pour des essais de transfection *in vitro*, nous avons étudié l'influence du pH de formulation pour trois milieux communément utilisés. Les pH sont compris entre 4 et 7,4, ce qui permet de moduler la fraction d'unité éthylènimine sous une forme cationisée. L'expérience de référence décrite dans le tableau 4-8 (paragraphe III-1) permet de générer des polyplexes de diamètre moyen égal à 350 nm, en tampon HEPES 10 mM à pH= 7,4.

Le tableau 4-12 présente les diamètres des complexes IPEI-N-his/ADN formulés à partir d'une solution initiale de 7,5 µg de plasmide dilué dans 100 µL de solution HEPES (10mM), glucose 5% ou HEPES (10 mM) + glucose 5%. Parallèlement, 45 µg de polymère sont mis en solution dans 90 µL des mêmes solutions. Les deux solutions sont ensuite mélangées, puis le diamètre moyen est déterminé. L'ensemble des résultats est rapporté dans le tableau 4-12.

Tableau 4-12 : Influence du pH de formulation sur les caractéristiques (diamètre moyen) des polyplexes à base de IPEI-N-his 16 et du plasmide pTG11033 (9,5kb), au ratio w/w=6/1 (7,5 µg de plasmide ([plasmide]initiale=1 mg/ml sont dissous dans 100 µl de tampon HEPES 10 mM. 45 µg de polymère (1µg/µl) sont dissous dans 90 µl de tampon HEPES 10 mM.

Expérience	Tampon utilisé	pH	Diamètre (nm)
1	HEPES 10 mM	7,4	223 ± 37
2		7	233 ± 20
3		6	80 ± 39
4		5	42 ± 31
5	5% glucose	7,4	570 ± 63
6		6,5	371 ± 71
7		5,25	92 ± 33
8	HEPES 10 mM + 5% glucose	7,4	176±55 - 594±200*
9		7	151±80 - 594±250 *
10		6	20±10-113±45*
11		5	198 ± 60

* deux populations

Quelque soit le milieu dans lequel les polyplexes sont préparés, nous observons une diminution du diamètre moyen des polyplexes avec le pH. Cette observation est en accord avec l'augmentation du taux de

protonation des motifs éthylènimine en fonction de la diminution du pH. L'utilisation du milieu HEPES (10mM) permet d'obtenir des particules de diamètre inférieur à celui obtenu en milieu glucose. Ceci montre l'intérêt du milieu tamponné, notamment au pH=7,4. Le mélange glucose-HEPES, conduit à des variations de diamètre moyen de polyplexe en fonction du pH de formulation difficilement interprétables. Certaines formulations entraînent la formation de deux familles de nanoparticules dont les compositions relatives n'ont pu être déterminées.

III-6 - Conclusion des études de formulation

Nous avons mis au point différentes formulations permettant d'obtenir des polyplexes de diamètre moyen et de potentiel ζ compatibles avec les exigences répertoriées pour des expériences de transfert de gène. Toutefois, un travail reste à améliorer pour pouvoir formuler les polyplexes en milieu concentré afin d'obtenir des solutions permettant des expériences de transfert de gène *in vivo*. Des études dans ce sens ont déjà été entamées dans des équipes avec lesquelles nous collaborons. Les formulations obtenues dans ce chapitre vont être testées pour des expériences de transfert de gène *in vivo* sur différentes lignées cellulaires.

IV – Transfection *in vitro*

Dans ce dernier paragraphe, nous allons présenter les résultats des expériences préliminaires de transfection menées sur les polymères synthétisés dans le chapitre 3. La formulation des polyplexes est conduite de façon standard. Typiquement, 7,5 μ g de plasmide dans 100 μ L de tampon HEPES (pH=7,4) sont mélangés avec 45 μ g de polymère dissous dans 90 μ L de tampon HEPES, puis le mélange est dilué à 1,5 ml par du milieu de culture contenant 10% de sérum. Ce protocole se rapproche des expériences de formulation conduites dans le précédent paragraphe, permettant d'obtenir des diamètres moyens de particules compris entre 100 et 400 nm.

IV-1 - Transfection de cellules HeLa à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3H-imidazol-4-yl) propanoïque acide) linéaire (IPEI-N-his)

Ce paragraphe regroupe les tests de la transfection *in vitro* conduits sur les cellules HeLa par des polyplexes formulés avec la IPEI-N-his (figure 4-21).

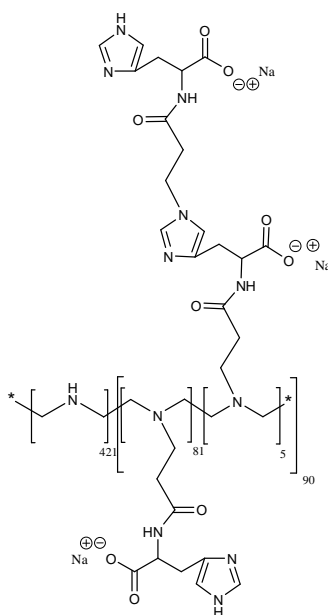


Figure 4-21 : Exemple de structure de la IPEI-N-histidine 18,6%

Les tests sont initialement conduits sur deux ratios massiques polymère/plasmide égale à 3/1 et 6/1 sur les cellules HeLa. La figure (4-22) rapporte les résultats de transfection pour des greffages en résidus L-histidine compris entre 0 et 67%. La référence est la IPEI, $M_n \cong 22000 \text{ g.mol}^{-1}$, précurseur des différentes IPEI-N-his. Le signal RLU de la IPEI 22000 g.mol^{-1} est de 4.10^7 RLU/mg de protéine.

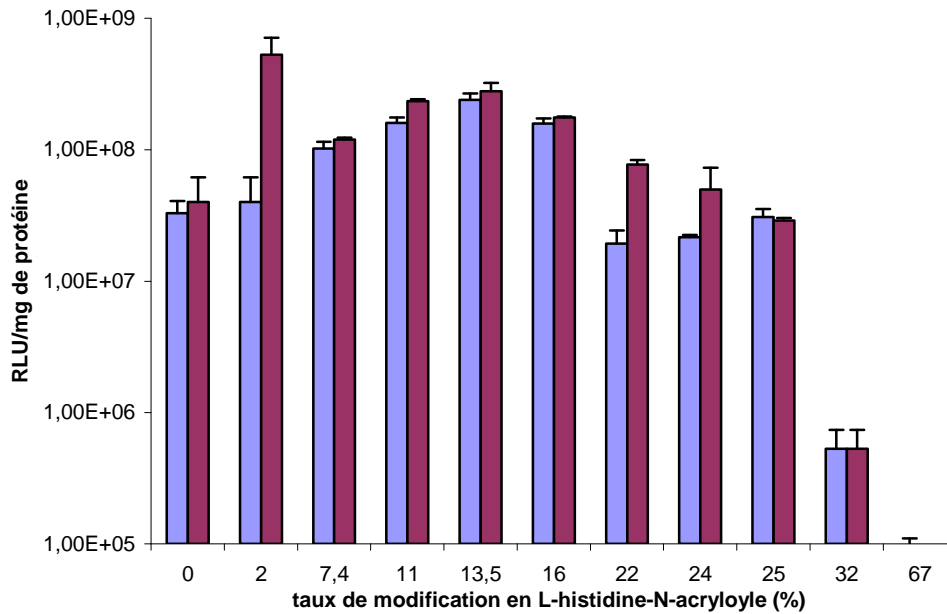


Figure 4-22 : La transfection des cellules HeLa a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (ou pCMV-Luc) complexée avec IPEI-N-his en fonction de la fraction en L-histidine-N-acryloyle (de 0% à de 67%). Les rapports polymère/plasmide (w/w) sont de 3/1 (violet) et 6/1 (bordeaux).

La figure 4-22 rapporte que l'efficacité de transfection des cellules HeLa est améliorée lorsque la L-histidine est présente sur le vecteur cationique jusqu'au taux de modification de 16 %. Cette observation tient pour les deux ratios massiques examinés. Ensuite, cette efficacité de transfection diminue pour devenir inefficace pour les IPEI-N-his 32% et 67%. Le gel retard a démontré que la IPEI-N-his 67% ne complexe pas l'ADN, il est même surprenant d'obtenir un signal d'environ 1.10^5 RLU/mg de protéine, qui est probablement équivalent au résultat qui serait obtenu par une transfection avec de l'ADN seul. Pour le ratio polymère/plasmide 6/1 (w/w), la IPEI-N-his 2% donne un résultat surprenant par rapport au ratio de transfection 3/1 dont l'origine n'est pas identifiée.

Nous avons remarqué dans le paragraphe précédent que l'obtention de polyplexes de petit diamètre est difficile à obtenir. La figure 4-23 montre la corrélation entre l'efficacité de transfection de cellules HeLa et le diamètre des polyplexes utilisés pour cette expérience. Une augmentation de la fraction d'unités éthylènimine modifiées par la L-Histidine-N-acryloyle entraîne une augmentation du diamètre des complexes, ce qui diminue l'efficacité du transfert de gène à partir de la fraction de 22%.

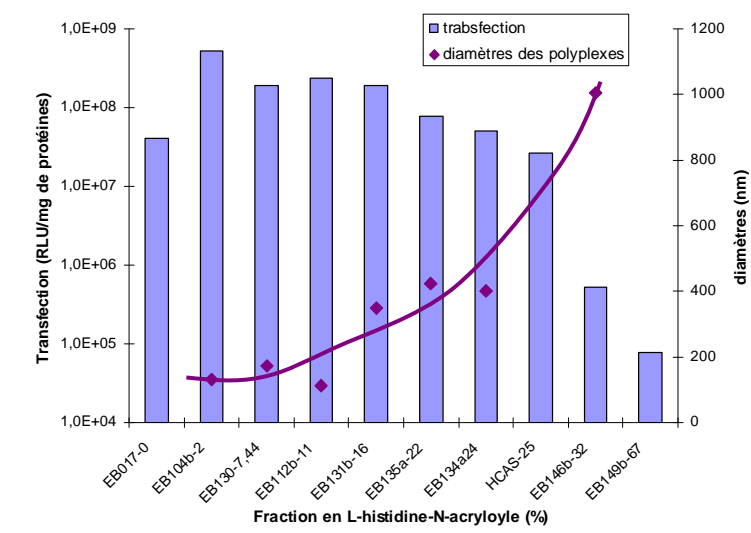


Figure 4-23 : La transfection des cellules HeLa a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec IPEI-N-his en fonction de la fraction en L-histidine-N-acryloyle (de 0% à de 67%). Le rapport polymère/plasmide (w/w) est de 6/1, (la mesure des diamètres de particule est déterminée par DDL)

Cette amélioration de transfection peut être expliquée par un « effet éponge à protons » accru expliqué par la présence de résidus imidazole sur la IPEI-N-his. Au delà de 22 %, l'efficacité de transfection peut être expliquée par une faible complexation du plasmide ou par des diamètres moyens de polyplexes élevés. Pour discriminer les deux effets, une étude systématique des conditions de formulation avec la IPEI-N-his 32 % devrait être effectuée afin d'obtenir des polyplexes de faible diamètre pouvant être utilisés en transfection.

IV-2 - Transfection de cellules C2C12 à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbominidamidopentanoïque acide) linéaire (IPEI-N-arg)

Nous avons indiqué précédemment que des oligomères de type oligoarginine ont montré une capacité de ciblage vis-à-vis de cellules musculaires lisses. Nous avons postulé que la modification de la IPEI par des résidus L-arginine pouvait améliorer la transfection de cellules C2C12, modèle *in vitro* de cellules musculaires lisses. Deux références sont proposées, à savoir la IPEI-N-His 16% pour le polymère, et les transfections sur cellules HeLa sont proposées à titre de comparaison. La figure 4-24 rapporte l'ensemble des résultats obtenus pour différents rapports massiques polymère/plasmide, et la figure 4.25 la structure de IPEI-N-arg 14%.

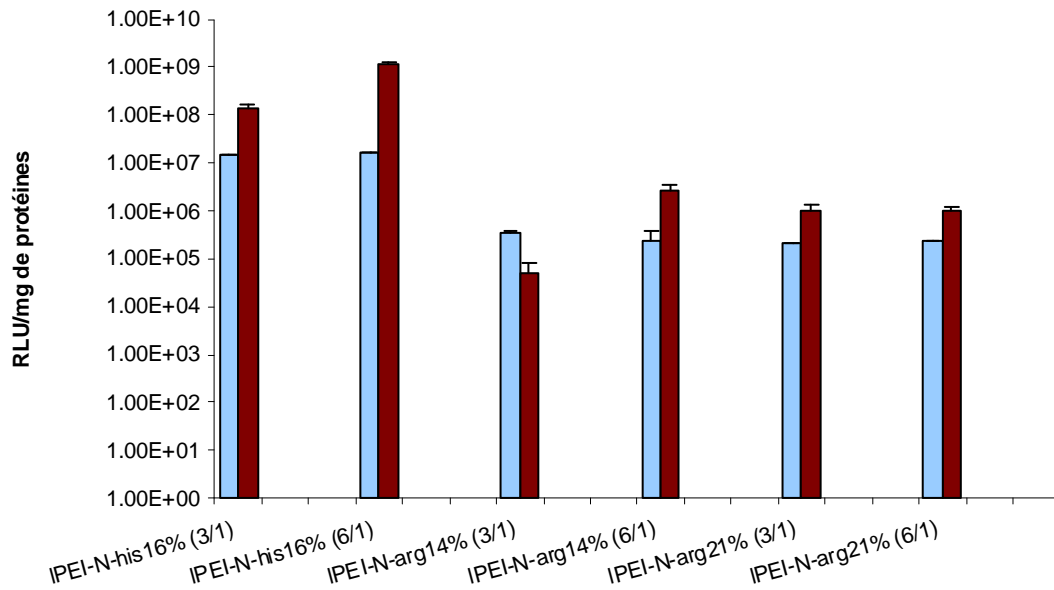


Figure 4-24 : La transfection des cellules HeLa (en bleu) et C2C12 (en marron) a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec IPEI-N-his 16% et les IPEI-N-arg 14 et 21%. Les rapports polymère/plasmide (w/w) indiqués entre parenthèse sont de 3/1 et 6/1.

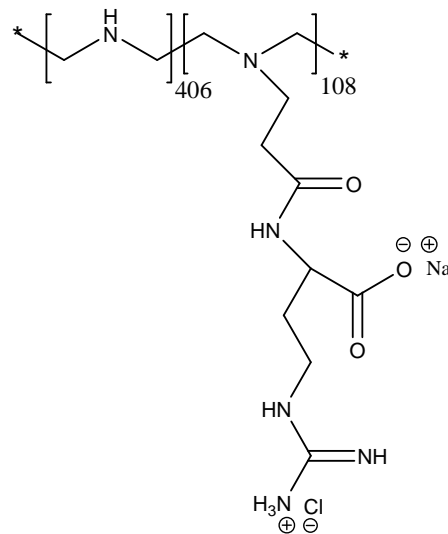


Figure 4-25 : Structure de la IPEI-N-arg 21%

Quel que soit le ratio utilisé pour former les polyplexes (3/1 ou 6/1) et les cellules utilisées, les IPEI-N-arg ont une efficacité de transfection inférieure à celle obtenue avec la IPEI-N-his 16%. Toutefois, il est intéressant de constater que les vecteurs IPEI-N-his et IPEI-N-arg transfectent mieux les cellules musculaires C2C12 que les cellules HeLa. Ce résultat laisse envisager une application dans le domaine thérapeutique de transfert gène dans le cadre de traitement de myopathes.

IV-4 - Transfection de cellules C2C12 à partir de polyplexes formulés avec la Poly(éthylènimine-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propanoïque acide-co-éthylènimine-N-éthylamide-N-2-amino-5-carbominidamidopentanoïque acide) linéaire (IPEI-N-his-N-arg)

Une étude de transfection est aussi réalisée pour des complexes formulés avec la IPEI-N-his23%-N-arg 13%, sur des cellules musculaires C2C12 pour évaluer l'intérêt de greffer deux acides aminés de nature différente sur la IPEI (figure 4-26). L'effet éponge à protons serait conjugué à l'action de ciblage apportée par les résidus arginine. De plus, les groupements guanidine sous la forme guanidium au pH de formulation, permettent d'améliorer le pouvoir de complexation du vecteur cationique. Nous remarquons que ce nouveau polymère, au ratio 4/1, donnent les mêmes résultats que la IPEI-N-his 16% (à un ratio plus faible de 3/1). La présence de la L-arginine-N-acryloyle sur le IPEI-N-his semble améliorer le transfert de plasmide rapporteur (pTG11033 (9,5 kb) ou pCMV-luc) dans les cellules C2C12.

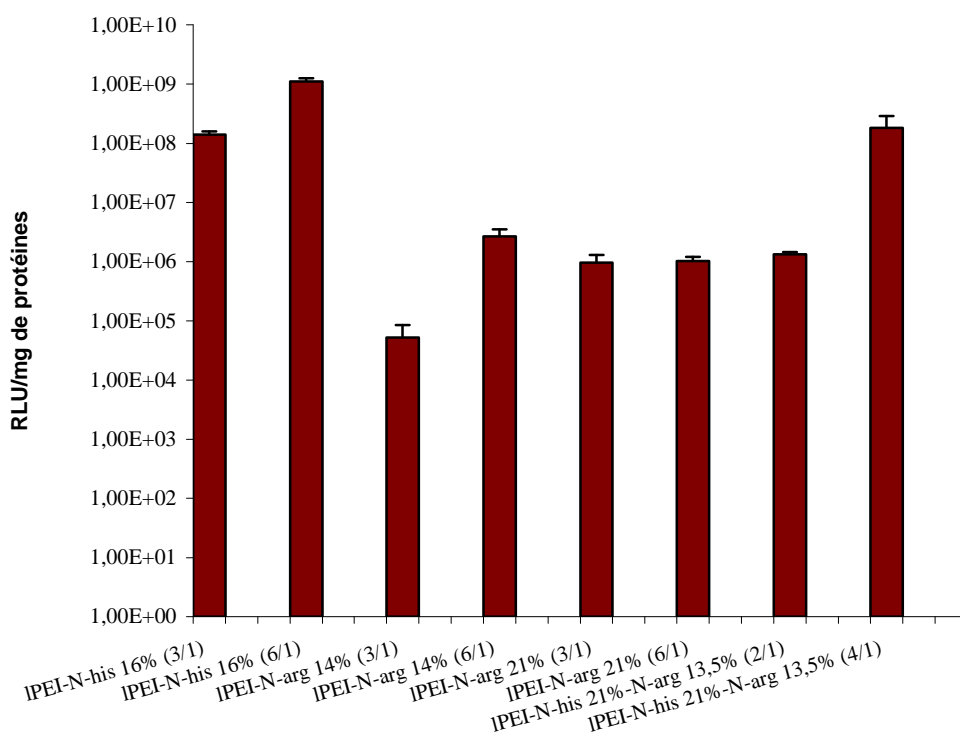


Figure 4-26 : La transfection des cellules C2C12 a été effectuée avec le plasmide pTG11033 (9,5 kb) complexée avec IPEI-N-his 16%, les IPEI-N-arg 14 et 21% et la IPEI-N-his21%-N-13,5%. Le rapport polymère/plasmide (w/w) sont de 3/1 et 6/1 (IPEI-N-his et IPEI-N-arg) et de 2/1 et 4/1 pour la IPEI-N-his 21%-N-arg 13,5%.

V – Conclusion

Dans ce chapitre, l'aspect physico-chimie des nouveaux vecteurs (seul ou complexés au plasmide) est discuté. Ces tests de solubilité et de mobilité électrophorétiques des polymères ont mis en évidence le caractère polyamphotère caractérisé par un pH isoélectrique apparent, situé dans la zone de turbidité du vecteur. L'étude de la solubilité et la densité de charge des polymères, sont des paramètres important pour comprendre le comportement des vecteurs en solution, ainsi que lors de leur formulation avec le plasmide. Une forte densité de charge apporte une meilleure complexation du plasmide, et permet d'obtenir des polyplexes de petit diamètre. Il faut aussi signaler que la formulation des complexes polymère/plasmide joue un rôle important sur le diamètre des nanoparticules.

La dernière partie de ce chapitre étudie leur capacité de transfection *in vitro* des polyplexes, sur les cellules cancéreuses HeLa et musculaires C2C12. Les résultats montrent que les IPEI-N-ad complexent faiblement l'ADN, et que la présence de cyclodextrines ne perturbe pas la complexation de la IPEI-N-ad sur le plasmide.

Les IPEI-N-arginine complexent l'ADN dès le ratio de 2/1, mais la transfection des complexes formulés avec ces polymères n'apporte pas de meilleurs résultats *in vitro* que la IPEI-N-his.

La IPEI-N-histidine, donne de très bons résultats en transfection par rapport à la IPEI non modifié et à la IPEI-N-arginine. L'efficacité de transfection maximale pour ce nouveau polymère est atteinte pour des fractions d'EI modifiées par la L-histidine-N-acryloyle de 11% et 16%. Ce résultat est expliqué par un pouvoir tampon supérieur à celui de la IPEI, démontré dans les expériences de titration.

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur les IPEI-N-his montrant que ces vecteurs sont moins toxiques que la IPEI. Le taux de modification en histidine influe sur la cytotoxicité des polyplexes.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux vecteurs cationiques à base de poly(éthylèneimine) linéaire (IPEI), capables de complexer l'ADN et de transfecter les cellules *in vitro*.

Les vecteurs synthétiques réalisés dans ce travail proviennent de la modification de la IPEI 22000 g.mol⁻¹, venant de l'hydrolyse acide de la poly(2-éthyle-2-oxazoline) 50000 g.mol⁻¹. La stratégie initiale de ce travail était de modifier la IPEI par différentes molécules comme la L-histidine, connu pour améliorer l'efficacité de vecteurs cationiques utilisés en transfection. La stratégie élaborée est de modifier l'amine primaire de la L-histidine par le chlorure d'acryloyle, pour ensuite fixer ce synthon par réaction de Michaël sur les amines secondaires de la IPEI. Des études approfondies ont permis d'identifier les paramètres de synthèses (mécanismes, temps et pH de réaction, concentration des produits) pour obtenir le taux de modification souhaité avec le meilleur contrôle possible de la réaction. Les études physico-chimiques de ces polymères, ainsi que les polyplexes polymères/ADN formulés, ont permis d'estimer l'efficacité tampon de ces nouveaux polymères, et leur comportement dans les conditions physiologiques de transfection.

Après la mise au point des paramètres de la réaction de Michaël, d'autres synthons (la L-histidine méthyle ester, le 1-adamantane méthylamine et la L-arginine) ont aussi été greffés à la IPEI. Les polymères qui en résultent ont été caractérisés en termes de solubilité et de mobilité électrophorétique, et les résultats sont confortés à ceux obtenus avec la IPEI-N-his.

Toutes ces molécules ont été testées en transfection *in vitro*, sur des cellules HeLa et C2C12. D'après les résultats obtenus, la IPEI-N-his 16% permet d'obtenir la meilleure efficacité de transfection des cellules.

Les résultats présentés dans ce travail ouvrent de nouvelles perspectives permettant d'envisager des améliorations d'efficacité de transfection de cette famille de polymère. La mise au point d'une protection de la fonction imidazole de la L-histidine-N-acryloyle permettrait de s'affranchir de l'homocondensation de la L-histidine-N-acryloyle mise en évidence dans ce travail. La stabilité des vecteurs, en fonction de leur mode de conservation est aussi un objet d'étude particulièrement important pour l'application en thérapie génique. L'étude physico-chimique des IPEI-ad a mis en évidence des comportements d'autoassociation intéressant qu'il serait intéressant d'approfondir, notamment en étudiant le paramètre de concentration. Toutefois, nous avons démontré l'accessibilité de la fonction adamantane, greffée à la IPEI, par la β CD, ce qui ouvre une perspective tout à fait passionnante de ciblage. Enfin, des résultats non discutés dans ce présent travail ont montré l'intérêt des IPEI-N-his pour des essais de transfert *in vivo*. La toxicité de ces vecteurs, en fonction de la formulation devra être évaluée sur des souris, pour pouvoir poursuivre le développement de cette nouvelle famille de polymère.

Bibliographie

1. Watson, J. D.; Crick, F. H., Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171, (4356), 737-738.
2. Grubb, B. R.; Rogers, T. D.; Boucher, R. C.; Ostrowski, L. E., Ion transport across CF and normal murine olfactory and ciliated epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2009**, 296, (6), C1301-C1309.
3. Davidson, H.; McLachlan, G.; Wilson, A.; Boyd, A. C.; Doherty, A.; MacGregor, G.; Davies, L.; Painter, H. A.; Coles, R.; Hyde, S. C.; Gill, D. R.; Amaral, M. D.; Collie, D. D. S.; Porteous, D. J.; Penque, D., Human-specific cystic fibrosis transmembrane conductance regulator antibodies detect in vivo gene transfer to ovine airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2006**, 35, (1), 72-83.
4. Norez, C.; Noel, S.; Wilke, M.; Bijvelds, M.; Jorna, H.; Melin, P.; DeJonge, H.; Becq, F., Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Letters* **2006**, 580, (8), 2081-2086.
5. Noel, S.; Wilke, M.; Bot, A. G. M.; De Jonge, H. R.; Becq, F., Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (n-butyldeoxynojirimycin) in cystic fibrosis epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2008**, 325, (3), 1016-1023.
6. Norez, C.; Antigny, F.; Noel, S.; Vandebrouck, C.; Becq, F., A Cystic Fibrosis Respiratory Epithelial Cell Chronically Treated by Miglustat Acquires a Non-Cystic Fibrosis-Like Phenotype. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2009**, 41, (2), 217-225.
7. Fuchs, M., Gene therapy. An ethical profile of a new medical territory. *The Journal of Gene Medicine* **2006**, 8, (11), 1358-1362.
8. Yang, Z. R.; Wang, H. F.; Zhao, J.; Peng, Y. Y.; Wang, J.; Guinn, B. A.; Huang, L. Q., Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy* **2007**, 14, (7), 599-615.
9. Kircheis, 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 Therapy* **1997**, 4, (5), 409-418.
10. Wiley, J.; Ltd, S., Indications addressed by gene therapy clinical trial In www.wiley.co.uk/genmed/clinical/, Ed. journal of gene medicine: 2010.
11. Biewenga, J. E.; Destree, O. H.; Schrama, L. H., Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique. *Journal of Neuroscience Methods* **1997**, 71, 67-75.
12. Zelenin, A. V.; Kolesnikov, V. A.; Tarasenko, O. A.; Shafei, R. A.; Zelenina, I. A.; Mikhailov, V. V.; Semenova, M. L.; Kovalenko, D. V.; Artemyeva, O. V.; Ivaschenko, T. E., Bacterial [beta]-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Letters* **1997**, 414, 319-322.
13. Uchida, M.; Li, X. W.; Mertens, P.; Alpar, H. O., Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1790, 754-764.
14. Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H., Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal* **1982**, 1, 841-845.
15. Lucas, M. L.; Jaroszeski, M. J.; Gilbert, R.; Heller, R., In vivo electroporation using an exponentially enhanced pulse: a new waveform. *DNA and Cell Biology* **2001**, 20, 183-188.
16. Gothelf, A.; Eriksen, J.; Hojman, P.; Gehl, J., Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Therapy* **2010**, 17, 839-845.

17. Tang, G. P.; Guo, H. Y.; Alexis, F.; Wang, X.; Zeng, S.; Lim, T. M.; Ding, J.; Yang, Y. Y.; Wang, S., Low molecular weight polyethylenimines linked by beta-cyclodextrin for gene transfer into the nervous system. *Journal of Gene Medicine* **2006**, 8, (6), 736-744.
18. Hosseinkhani, H.; Aoyama, T.; Ogawa, O.; Tabata, Y., Ultrasound enhances the transfection of plasmid DNA by non-viral vectors. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2003**, 4, (109-122).
19. Hosseinkhani, H.; Tabata, Y., Ultrasound enhances in vivo tumor expression of plasmid DNA by PEG-introduced cationized dextran. *Journal of Controlled Release* **2005**, 108, 540– 556.
20. Niidome, T.; Huang, L., Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Therapy* **2002**, 9, 1647-1652.
21. bc science, In http://www.bcscience.com/bc9/pgs/links_u2.html, Ed. edvantage press: 2009.
22. Wong, K.; Sun, G.; Zhang, X.; Dai, H.; Liu, Y.; He, C.; Leong, K. W., PEI-g-chitosan, a Novel Gene Delivery System with Transfection Efficiency Comparable to Polyethylenimine in Vitro and after Liver Administration in Vivo. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, 152-158.
23. Leaf Huang, M.-C. H., Ernst Wagner, Non-viral vectors for Gene Therapy, second Edition part I. In press, E. a., Ed. 2005: The United States of America, 2005; p 379.
24. Fisher, K. D.; Ulbrich, K.; Subr, V.; Ward, C. M.; Mautner, V.; Blakey, D.; Seymour, L. W., A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Therapy* **2000**, 7, (15), 1337-1343.
25. Bassaglia, Y., *Biologie Cellulaire. 2ème édition*. Maloine: 2004.
26. Bernfield, M.; Gotte, M.; Park, P. W.; Reizes, O.; Fitzgerald, M. L.; Lincecum, J.; Zako, M., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review Biochemistry* **1999**, 68, 729-777.
27. Belting, M., Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, 28, 145-151.
28. Bernasconi, C. F.; Ketner, R. J.; Brown, S. D.; Chen, X.; Rappoport, Z., Acid-Catalyzed Breakdown of Alkoxide and Thiolate Ion Adducts of Benzylidene Meldrum's Acid, Methoxybenzylidene Meldrum's Acid and Thiomethoxybenzylidene Meldrum's Acid. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, (24), 8829–8839.
29. Midoux, P.; Breuzard, G.; Gomez, J. P.; Pichon, C., Polymer-Based Gene Delivery: A Current Review on the Uptake and Intracellular Trafficking of Polyplexes. *Current Gene Therapy* **2008**, 8, (5), 335-352.
30. Acosta, E. G.; Castilla, V.; Damonte, E. B., Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology* **2009**, 11, (10), 1533-1549.
31. West, M. A.; Prescott, A. R.; Eskelinen, E. L.; Ridley, A. J.; Watts, C., Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* **2000**, 10, 839-48.
32. Conner, S. D.; Schmid, S. L., Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, 422, (6927), 37-44.
33. Blankinship, M. J.; Gregorevic, P.; Allen, J. M.; Harper, S. Q.; Harper, H.; Halbert, C. L.; Miller, A. D.; Chamberlain, J. S., Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular Therapy* **2004**, 10, (4), 671-678.
34. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E., Nonviral Vector for gene delivery. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 259-302.
35. Robinson, M. S., The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **1994**, 6, 538-544.
36. Mousavi, S. A.; Malerod, L.; Berg, T.; Kjekken, R., Clathrin-dependent endocytosis. *Biochemical Journal* **2004**, 377, 1-16.
37. Matveev, S.; Li, X.; Everson, W.; Smart, E. J., The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 49, 237-50.

38. Bathori, G.; Cervenak, L.; Karadi, I., Caveolae - An alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2004**, 21, (2), 67-95.
39. Hommelgaard, A. M.; Roepstorff, K.; Vilhardt, F.; Torgersen, M. L.; Sandvig, K.; van Deurs, B., Caveolae: Stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic* **2005**, 6, (9), 720-724.
40. Wiethoff, C. M.; Middaugh, C. R., Barriers to nonviral gene delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92, (2), 203-217.
41. Dauty, E.; Verkman, A. S., Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, (9), 7823-7828.
42. Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S., Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, (3), 1625-1629.
43. Leng, Q. X.; Scaria, P.; Zhu, J. S.; Ambulos, N.; Campbell, P.; Mixson, A. J., Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *Journal of Gene Medicine* **2005**, 7, (7), 977-986.
44. Lechardeur, D.; Lukacs, G. L., Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: A perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Human Gene Therapy* **2006**, 17, (9), 882-889.
45. Kircheis, R.; Blessing, T.; Brunner, S.; Wightman, L.; Wagner, E., Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. *Journal of Controlled Release* **2001**, 72, (1-3), 165-170.
46. Sola, B.; Staedel, C.; Remy, J. S.; Bahr, A.; Behr, J. P., Lipospermine-mediated gene transfer technique into murine cultured cortical cells. *Journal of Neurosciences Methods* **1997**, 71, 183-186.
47. Duzgunes, N.; Goldstein, J. A.; Friend, D. S.; Felgner, P. L., Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *biochemistry* **1989**, 28, (9179-9184).
48. Tarwadi; Jazayeri, J. A.; Pranker, R. J.; Pouton, C. W., Preparation and in vitro evaluation of novel lipopeptide transfection agents for efficient gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, (4), 940-950.
49. Kulkarni, R. P.; Wu, D. D.; Davis, M. E.; Fraser, S. E., Quantitating intracellular transport of polyplexes by spatio-temporal image correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (21), 7523-7528.
50. Monsigny, M.; Rondanino, C.; Duverger, E.; Fajac, I.; Roche, A. C., Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glycoplexes and glycosylated plasmids. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2004**, 1673, (1-2), 94-103.
51. Vandenbroucke, R. E.; Lucas, B.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N., Nuclear accumulation of plasmid DNA can be enhanced by non-selective gating of the nuclear pore - art. no. e86. *Nucleic Acids Research* **2007**, 35, (12), E86-E86.
52. Ryan, K. J.; Wente, S. R., The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Current opinion in cell biology* **2000**, 12, 361-371.
53. Fajac, I.; Allo, J. C.; Souil, E.; Merten, M.; Pichon, C.; Figarella, C.; Monsigny, M.; Briand, P.; Midoux, P., Histidylated polylysine as a synthetic vector for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway surface and airway gland serous cells. *Journal of Gene Medicine* **2000**, 2, (5), 368-378.
54. Schüttrumpf, J.; Milanov, P.; Abriss, D.; Roth, S.; Tonn, T.; Seifried, E., Transgene Loss and Changes in the Promoter Methylation Status as Determinants for Expression Duration in Nonviral Gene Transfer for Factor IX. *Human Gene Therapy* **2010**, 22, (1), 101-106.
55. Sinn, P. L.; Arias, A. C.; Brogden, K. A.; McCray Jr, P. B., Lentivirus Vector Can Be Readministered to Nasal Epithelia without Blocking Immune Responses. *Journal of Virology* **2008**, 82, (21), 19.
56. Mitomo, K.; Griesenbach, U.; Inoue, M.; Somerton, L.; Meng, C.; Akiba, E.; Tabata, T.; Yasuji Ueda, Y.; Gad M Frankel, G.; Farley, R.; Singh, C.; Chan, M.; Munkonge, F.; Brum, A.; Xenariou, S.; Escudero-Garcia, S.; Hasegawa, M.; Alton, E. W., Toward Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using a Lentivirus Pseudotyped With Sendai Virus Envelopes. *Molecular Therapy* **2010**, 18, (6), 1173-1182.

57. Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **1990**, 247, 1465-1468.
58. Liu, Y.; Liggitt, D.; Zhong, W.; Tu, G.; Gaensler, K.; Debs, R., Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 24864-24870.
59. Lu, Q. L.; Bou-Gharios, G.; Partridge, T. A., Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Therapy* **2003**, 10, 131-142.
60. Jayankura, M.; Boggione, C.; Frisen, C.; Boyer, O.; Fouret, P.; Saillant, G.; Klatzmann, D., In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *Journal of Gene Medicine* **2003**, 5, 618-624.
61. Burton, E. A.; Fink, D. J.; Glorioso, J. C., Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol* **2002**, 21, 915-936.
62. Soifer, H.; Higo, C.; Kazazian, H. H.; Moran, J. V.; Mitani, K.; Kasahara, N., Stable integration of transgenes delivered by a retrotransposon-adenovirus hybrid vector. *Human Gene Therapy* **2001**, 12, (11), 1417-1428.
63. Adachi, K.; Mitani, K., Insufficient accumulation of viral late mRNAs restricts the replicative cycle of human adenovirus type 37 in A549 cells. *Archives of Virology* **2009**, 154, (9), 1401-1407.
64. Soifer, H.; Higo, C.; Logg, C. R.; Jih, L. J. L.; Shichinohe, T.; Harboe-Schmidt, E.; Mitani, K.; Kasahara, N., A novel, helper-dependent, adenovirus-retrovirus hybrid vector: Stable transduction by a two-stage mechanism. *Molecular Therapy* **2002**, 5, (5), 599-608.
65. Miller, D. G.; Adam, M. A.; Miller, A. D., Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Molecular and cellular biology* **1990**, 10, (8), 4239-4242.
66. Liu, S. L.; Halbert, C. L.; Miller, A. D., Jaagsiekte sheep retrovirus envelope efficiently pseudotypes human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *Journal of Virology* **2004**, 78, (5), 2642-2647.
67. Wootton, S. K.; Halbert, C. L.; Miller, A. D., Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature* **2005**, 434, (7035), 904-907.
68. Van der Laan, L. J. W.; Wang, Y. G.; Tilanus, H. W.; Janssen, H. L. A.; Pan, Q. W., AAV-mediated gene therapy for liver diseases: the prime candidate for clinical application? *Expert Opinion on Biological Therapy* **2011**, 11, (3), 315-327.
69. Whittaker, G. R., Virus nuclear import. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 733-747.
70. Lehn, P.; Fabrega, S.; Oudrhiri, N.; Navarro, J., Gene Delivery Systems: Bridging The Gap Between Recombinant Viruses And Artificial Vectors. *Advanced Drug Delivery reviews* **1997**, 30, (5-11).
71. Wikipedia, gene therapy. In http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy, Ed. modified 2011.
72. Gunter, K. C.; Khan, A. S.; Noguchi, P. D., The safety of retroviral vectors. *Human Gene Therapy*. **1993**, 4, 643-645.
73. Cavazzana-Calvo, M.; Lagresle, C.; Hacein-Bey-Abina, S.; Fischer, A., Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med* **2005**, 56, 585-602.
74. Fischer, A.; Hacein-Bey, S.; Cavazzana-Calvo, M., Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nature Reviews Immunology* **2002**, 2, (8), 615-621.
75. Mennesson, E. Transport transendothélial de gènes : études dynamiqués du passage sélectif de polyplexes à travers l'endothélium vasculaire pulmonaire. Orléans, Orléans, 2005.
76. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States America* **1987**, 84, 7413-7417.
77. Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269.
78. Bertin, S.; Neves, S.; De Lima, M. P.; Pierrefite-Carle, V., Naked DNA and lipoplexes applications in cancer gene therapy. *Bulletin Du Cancer* **2007**, 94, (3), 243-252.

79. Ferrari, M. E.; Nguyen, C. M.; Zelphati, O.; Tsai, Y.; Felgner, P. L., Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Human Gene Therapy* **1998**, 341-51.
80. Aissaoui, A.; Martin, B.; Kan, E.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P., Novel cationic lipids incorporating an acid-sensitive acylhydrazone linker: Synthesis and transfection properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, (21), 5210-5223.
81. Marshall, J.; Yew, N.; Eastman, S.; Jiang, C.; Scheule, R.; Cheng, S., Cationic lipid-mediated gene delivery to the airways. In : *Huang L, Hung M, Wagner E, eds. Non viral vectors for gene therapy. Academic Press 1999.*
82. Marshall, J.; Nietupski, J. B.; Lee, E. R.; Siegel, C. S.; Rafter, P. W.; Rudginsky, S. A.; Chang, C. D.; Eastman, S. J.; Harris, D. J.; Scheule, R. K.; Cheng, S. H., Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung. *Journal of Drug Targeting* **2000**, 7, (6), 453-469.
83. Leventisa, R.; Silvius, J. R., Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1990**, 1023, (1), 124-132.
84. Prata, C. A. H.; Li, Y.; Luo, D.; McIntosh, T. J.; Barthelemy, P.; Grinstaff, M. W., A new helper phospholipid for gene delivery. *Chemical Communications* **2008**, (13), 1566-1568.
85. Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J., Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **1989**, 86, 6982-6986.
86. Geall, A. J.; Eaton, M. A. W.; Baker, T.; Catterall, C.; Blagbrough, I. S., The regiochemical distribution of positive charges along cholesterol polyamine carbamates plays significant roles in modulating DNA binding affinity and lipofection. *FEBS Letters* **1999**, 459, (3), 337-342.
87. Blagbrough, I. S.; Geall, A. J.; Neal, A. P., Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy. *Biochemical Society Transactions* **2003**, 31, 397-406.
88. Behr, J. P., Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chemistry* **1994**, 5, 382-389.
89. Farhood, H.; Serbina, N.; Hunang, L., The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, 1235, (2), 289-295.
90. Fletcher, S.; Ahmad, A.; Perouzel, E.; Jorgensen, M. R.; Miller, A. D., A dialkynoyl analogue of DOPE improves gene transfer of lower-charged, cationic lipoplexes. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, 4, (2), 196-199.
91. Fletcher, S.; Ahmad, A.; Price, W. S.; Jorgensen, M. R.; Miller, A. D., Biophysical properties of CDAN/DOPE-analogue lipoplexes account for enhanced gene delivery. *ChemBiochem* **2008**, 9, (3), 455-463.
92. Gao, X.; Huang, L., A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, 179, 280-205.
93. Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, M.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M., Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad Sci* **1996**, 93, 9682-9686.
94. Oudrhiri, N.; Vigneron, J. P.; Peuchmaur, M.; Leclerc, T.; Lehn, P.; Lehn, J. M., Gene transfer by guanidinium cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad Sci* **1997**, 94, 1651-1656.
95. Patel, M.; Vivien, E.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N.; Ramasawmy, R.; Vigneron, J. P.; Lehn, P.; Lehn, J. M., Efficient gene transfection by bisguanidylated diacetylene lipid formulations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 281, (2), 536-543.
96. Lamarche, F.; Mevel, M.; Montier, T.; Burel-Deschamps, L.; Giamarchi, P.; Tripier, R.; Delepine, P.; Le Gall, T.; Cartier, D.; Lehn, P.; Jaffrees, P. A.; Clement, J. C., Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, (5), 1575-1582.

97. Picquet, E.; Le Ny, K.; Delepine, P.; Montier, T.; Yaouanc, J. J.; Cartier, D.; des Abbayes, H.; Ferec, C.; Clement, J. C., Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16, (5), 1051-1053.
98. Le Gall, T.; Loizeau, D.; Picquet, E.; Carmoy, N.; Yaouanc, J. J.; Burel-Deschamps, L.; Delepine, P.; Giamarchi, P.; Jaffres, P. A.; Lehn, P.; Montier, T., A Novel Cationic Lipophosphoramidate with Diunsaturated Lipid Chains: Synthesis, Physicochemical Properties, and Transfection Activities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, (4), 1496-1508.
99. Kabanov, A.; Zhu, J.; Alakhov, V., Pluronic block copolymers for gene del. *Adv Genet.* **2005**, 53, 231-261.
100. Mumper, R. J.; Wang, J.; Klakamp, S. L.; Nitta, H.; Anwer, K.; Tagliaferri, F.; Rolland, A. P., Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release* **1998**, 52, (1-2), 191-203.
101. Lemieux, P.; Guérin, N.; Paradis, G.; Proulx, R.; Chistyakova, L.; Kabanov, A.; Alakhov, V., A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* **2000**, 7, (11), 986-991.
102. Maillard, L.; Van Belle, E.; Tio, F. O.; Rivard, A.; Kearney, M.; Branellec, D.; Steg, P. G.; Isner, J. M.; Walsh, K., Effect of percutaneous adenovirus-mediated Gax gene delivery to the arterial wall in double-injured atheromatous stented rabbit iliac arteries. *Gene Therapy* **2000**, 7, (16), 1353-1361.
103. Disharta, K. L.; Denby, L.; Georgeb, S. J.; Nicklina, S. A.; Yendluric, S.; Tuerkc, M. J.; Kelleyc, M. P.; Donahuec, B. A.; Newbyb, A. C.; Hardingc, T.; Bakera, A. H., Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2003**, 35, (7), 739-748.
104. Gebhart, C. L.; Sriadibhatla, S.; Vinogradov, S.; Lemieux, P.; Alakhov, V.; Kabanov, A. V., Design and Formulation of Polyplexes Based on Pluronic-Polyethyleneimine Conjugates for Gene Transfer. *Bioconjugate Chem* **2002**, 15, (5), 937-944.
105. Wu, G. Y.; Wu, C. H., Recepteur-mediated in vitro gene transformation by soluble DNA carrier system. *Journal Biology Chemistry* **1987**, 262, 4429-4432.
106. Mengarelli, V. complexes de polyélectrolytes de charge opposée : des polymères synthétiques à la thérapie génique. Université de Paris-sud XI, Orsay, 2009.
107. Delsanti, M.; Dalbiez, J. P.; Spalla, O.; Belloni, L.; Drifford, M., *Phase diagram of polyelectrolyte solutions in présence of multivalent salts*. ed.; Macro-ion Characterization From Dilute Solutions to Complex Fluids, in ACS Symposium Series: 1993; Vol. 548.
108. Pelta, J.; Livolant, F.; Sikorav, J. L., DNA Aggregation Induced by Polyamines and Cobalthexamine. *Journal of biological Chemistry* **1996**, 271, (10), 5656-5662.
109. Jorge, A. F.; Dias, R. S.; Pereira, J. C.; Pais, A., DNA Condensation by pH-Responsive Polycations. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (9), 2399-2406.
110. Griffiths, P. C.; Paul, A.; Stilbs, P.; Petterson, E., Charge on poly(ethylene imine): Comparing electrophoretic NMR measurements and pH Titrations. *Macromolecules* **2005**, 38, (8), 3539-3542.
111. Midoux, P.; LeCam, E.; Coulaud, D.; Delain, E.; Pichon, C., Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **2002**, 27, (1-6), 27-47.
112. Van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Van de Water, L.; Van de Wetering, P.; Van Steenberg, M. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Schuyl, W. J. W.; Hennink, W. E., Synthesis and characterization of poly-L-lysine with controlled low molecular weight. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1997**, 198, (12), 3893-3906.
113. Kircheis, R.; Wightman, L.; Wagner, E., Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, (3), 341-358.
114. Ferruti, P.; S., K.; Ranucci, E.; Gianasi, E.; Duncan, R., A novel chemical modification of poly-lysine reducing toxicity while preserving cationic properties. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* **1998**, 24, 45-46.

115. Hunter, A. C., Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, (14), 1523-1531.
116. Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A.; Moghimi, S. M., Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine) - DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. *FEBS Letters* **2005**, 579, (27), 6191-6198.
117. Erbacher, P.; C., R. A.; Monsigny, M.; Midoux, P., Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Experimental Cell Research* **1996**, 225, 186-194.
118. Wattiaux, R.; Laurent, N.; Wattiaux-De-Coninck, S.; Jadot, M., Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 41, 201-208.
119. Mullen, P. M.; Lollo, C. P.; Phan, Q. C.; Amini, A.; Banaszczyk, M. G.; Fabrycki, J. M.; Wu, D. P.; Carlo, A. T.; Pezzoli, P.; Coffin, C. C.; Carlo, D. J., Strength of conjugate binding to plasmid DNA affects degradation rate and expression level in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2000**, 1523, (1), 103-110.
120. Moriyama, R.; Shimada, N.; Kano, A.; Maruyama, A., DNA assembly and re-assembly activated by cationic comb-type copolymer. *Biomaterials* **2011**, 32, (9), 2351-2358.
121. Midoux, P.; Monsigny, M., Efficient gene Transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, 406-411.
122. Putnam, D.; Gentry, C. A.; Pack, D. W.; Langer, R., Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, (3), 1200-+.
123. Roufai, M. B.; Midoux, P., Histidylated polylysine as DNA vector: Elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (1), 92-99.
124. Bennis, J. M.; Choi, J. S.; Mahato, R. I.; Park, J. S.; Kim, S. W., pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, 11, (5), 637-645.
125. Asayama, S.; Hamaya, A.; Sekine, T.; Kawakami, H.; Nagaoka, S., Aminated poly(L-histidine) as new pH-sensitive DNA carrier. *Nucleic Acids Symposium* **2004**, 48, (229-230).
126. Asayama, S.; Kato, H.; Kawakami, H.; Nagaoka, S., Carboxymethyl poly(L-histidine) as a new pH-sensitive polypeptide at endosomal/lysosomal pH. *Polymers for Advanced Technologies* **2007**, 18, (4), 329-333.
127. Asayama, S.; Kawakami, H.; Nagaoka, S., Design of a poly(L-histidine)-carbohydrate conjugate for a new pH-sensitive drug carrier. *Polymers for Advanced Technologies* **2004**, 15, (8), 439-444.
128. Asayama, S.; Sudo, M.; Nagaoka, S.; Kawakami, H., Carboxymethyl poly(L-histidine) as a new pH-sensitive polypeptide to enhance polyplex gene delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5, (5), 898-901.
129. Gonzalez, H.; Hwang, S. J.; Davis, M. E., New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, (6), 1068-1074.
130. Davis, M. E.; Pun, S. H.; Bellocq, N. C.; Reineke, T. M.; Popielarski, S. R.; Mishra, S.; Heidel, J. D., Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers. *Current Medicinal Chemistry* **2004**, 11, (2), 179-197.
131. Boussif, O.; Lezoualc, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix B.; Behr, J.-P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1995**, 12, 7297-7301.
132. Ogris, M.; Walker, G.; Blessing, T.; Kircheis, R.; Wolschek, M.; Wagner, E., Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *Journal of Controlled Release* **2003**, 91, (1-2), 173-181.
133. Tang, M. X.; Szoka, F. C., The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complex,. *Gene Therapy* **1997**, 4, (823-832).

134. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, 60, (2-3), 149-160.
135. Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; Kissel, T., Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery. degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release* **2003**, 88, 159-172.
136. Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H., Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, (3), 581-587.
137. Mengarelli, V. complexes de polyélectrolytes de charge opposée : des polymères synthétiques à la thérapie génique. Université de Paris-sud XI, Orsay, 2009.
138. Smits, R. G.; Koper, G. J. M.; Mandel, M., The influence of nearest- and next-nearest-neighbor of the protometric titration of linear poly(ethylenimine). *Journal of physique chemistry* **1993**, 97, 5745-5751.
139. Menzel, H.; Horstmann, S.; Behrens, P.; Barnreuther, B.; Krueger, I.; Jahns, M., Chemical properties of polyamines with relevance to the biomineralization of silica. *Chemical Communications* **2003**, (24), 2994-2995.
140. Zhu, X. W.; Tang, F. Q.; Suzuki, T. S.; Sakka, Y., Role of the initial degree of ionization of polyethylenimine in the dispersion of silicon carbide nanoparticles. *Journal of the American Ceramic Society* **2003**, 86, (1), 189-191.
141. Bettinger, T.; Remy, J. S.; Erbacher, P., Size Reduction of Galactosylated PEI/DNA Complexes Improves Lectin-Mediated Gene Transfer into Hepatocytes. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, (558-561).
142. Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsasser, H.; Kissel, T., A novel nonviral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* **1999**, 19, (1273-1279).
143. Matar, M.; Slobodkin, G.; Rea-Ramsey, A.; Brunhoeber, E.; Skoyen, J. L.; Fewell, J. G.; Lewis, D. H.; Anwer, K., Synthesis and Characterization of Low Molecular Weight Linear Polyethylenimines for Gene Delivery *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2006**, 2, (19), 53-61.
144. Goula, D.; Remy, J. S.; Erbacher, P.; Wasowicz, M.; Levi, G.; Abdallah, B.; Demeneix, B. A., Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *gene therapy* **1998**, 5, (712-717).
145. Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R.; Monaco, L., Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic acids Research* **1997**, 25, 3095-3101.
146. Tang, M. X.; C., S. F., The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy* **1997**, 4, (8), 823-832.
147. Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; Peterson, 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. *Journal of Controlled Release* **2003**, 89, (1), 113-125.
148. Neu, M.; Fischer, D.; Kissel, T., Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethyleneimine) and its derivatives. *Journal of Gene Medicine* **2005**, 7, (8), 992-1009.
149. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* **2001**, 22, (5), 471-480.
150. Godbey, W. T.; Barry, M. A.; Saggau, P.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 51, (3), 321-328.
151. Fischer, D.; Li, Y. X.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T., In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, 24, (7), 1121-1131.
152. Zou, S. M.; Erbacher, P.; Remy, J. S.; Behr, J. P., Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *Journal of Gene Medicine* **2000**, 2, (2), 128-134.

153. Fischer, D.; Von Harpe, A.; Kissel, T., Polyethylenimine: polymer structure influences the physicochemical and biological effects of plasmid/PEI complexes. *In Biomaterials and drug delivery toward new millennium by Park KD, Kwon IC, Yui N, Jeong SY, Park K, editors* **2000**, (195-211).
154. Liu, Z. H.; Zhang, Z. Y.; Zhou, C. R.; Jiao, Y. P., Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science* **2010**, 35, (9), 1144-1162.
155. Brissault, B. Synthèse de nouveaux vecteurs polyaminés - applications au transfert de gène. Evry val d'Essonne, Evry, 2003.
156. Brissault, B.; Leborgne, C.; Guis, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Kichler, A., Linear topology confers in vivo gene transfer activity to polyethylenimines. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, (3), 759-765.
157. Brissault, B.; Kichler, A.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Gau, J.; Auvray, L.; Guis, C., Synthesis, characterization, and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (10), 2863-2870.
158. Reineke, T. M.; Davis, M. E., Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 1. Carbohydrate size and its distance from charge centers. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, (1), 247-254.
159. Pun, S. H.; Davis, M. E., Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, 13, (3), 630-639.
160. Pun, S. H.; Bellocq, N. C.; Liu, A. J.; Jensen, G.; Machemer, T.; Quijano, E.; Schlupe, T.; Wen, S. F.; Engler, H.; Heidel, J.; Davis, M. E., Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, 15, (4), 831-840.
161. Forrest, M. L.; Gabrielson, N.; Pack, D. W., Cyclodextrin-polyethylenimine conjugates for targeted in vitro gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, (4), 416-423.
162. Huang, H. L.; Yu, H.; Tang, G. P.; Wang, Q. Q.; Li, J., Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector. *Biomaterials* **2010**, 31, (7), 1830-1838.
163. Forrest, M. L.; Meister, G. E.; Koerber, J. T.; Pack, D. W., Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21, (2), 365-371.
164. Gabrielson, N. P.; Pack, D. W., Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (8), 2427-2435.
165. Doody, A. M.; Korley, J. N.; P., D. K.; Zawaneh, P. N.; Putnam, D., Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery *in vitro*. *Journal of Controlled Release* **2006**, 116, 227-237.
166. Nimesh, S.; Aggarwal, A.; Kumar, P.; Singh, Y.; Gupta, K. C.; Chandra, R., Influence of acyl chain length on transfection mediated by acylated PEI nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 337, (1-2), 265-274.
167. Oskuee, R. K.; Dehshahri, A.; Shier, W. T.; Ramezani, M., Alkylcarboxylate grafting to polyethylenimine: a simple approach to producing a DNA nanocarrier with low toxicity. *Journal of Gene Medicine* **2009**, 11, (10), 921-932.
168. Oskuee, R. K.; Dehshahri, A.; E., W.; Ramezani, M., The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery. *Journal of Gene Medicine* **2010**, 12, 729-738.
169. Dehshahri, A.; Oskuee, R. K.; Shier, W. T.; Hatefi, A.; Ramezani, M., Gene transfer efficiency of high primary amine content, hydrophobic, alkyl-oligoamine derivatives of polyethylenimine. *Biomaterials* **2009**, 30, 4187-4194.
170. Zanta, M. A.; Boussif, O.; Adib, A.; Behr, J. P., In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, 339-344.
171. Cook, S. E.; Park, I. K.; Kim, E. M.; Jeong, H. J.; Park, T. G.; Choi, Y. J.; Akaike, T.; Cho, C. S., Galactosylated polyethylenimine-graft-poly(vinyl pyrrolidone) as a hepatocyte-targeting gene carrier. *Journal of Controlled Release* **2005**, 105, 151-163.

172. Mu, Y.; Kamada, H.; Kodaira, H.; Sato, K.; Tsutsumi, Y.; Maeda, M.; Kawasaki, K.; Nomizu, M.; Yamada, Y.; Mayumi, T., Bioconjugation of Laminin-Related Peptide YIGSR with Polyvinyl Pyrrolidone Increases Its Antimetastatic Effect Due to a Longer Plasma Half-Life. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 264, 763–767.
173. Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Tsunoda, S.-I.; Kihira, T.; Kaneda, Y.; Yamamoto, Y.; Nakagawa, S.; Horisawa, Y.; Mayumi, T., Antitumor Activity of Tumor Necrosis Factor- α Conjugated with Polyvinylpyrrolidone on Solid Tumors in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 257, 448–453.
174. Jiang, H. L.; Kwon, J. T.; Kim, E. M.; Kim, Y. K.; Arote, R.; Jere, D.; Jeong, H. J.; Jang, M. K.; Nah, J. W.; Xu, C. X.; Park, I. K.; Cho, M. H.; Cho, C. S., Galactosylated poly(ethylene glycol)-chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier for hepatocyte-targeting. *Journal of Controlled Release* **2008**, 131, 150-157.
175. Sung, S. J.; Min, S. H.; Cho, K. Y.; Lee, S.; Min, Y. J.; Yeom, Y. I.; Park, J. K., Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2003**, 26, (4), 492-500.
176. Kim, S.; Choi, J. S.; Jang, H. S.; Suh, H.; Park, J., Hydrophobic modification of polyethylenimine for gene transfectants. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2001**, 22, (10), 1069-1075.
177. Arote, R.; Kim, T. H.; Kim, Y. K.; Hwang, S. K.; Jiang, H. L.; Song, H. H.; Nah, J. W.; Cho, M. H.; Cho, C. S., A biodegradable poly(ester amine) based on polycaprolactone and polyethylenimine as a gene carrier. *Biomaterials* **2007**, 28, (4), 735-744.
178. Liu, Y.; Wu, D. C.; Ma, Y. X.; Tang, G. P.; Wang, S.; He, C. B.; Chung, T. S.; Goh, S., Novel poly(amino ester)s obtained from Michael addition polymerizations of trifunctional amine monomers with diacrylates: safe and efficient DNA carriers. *Chemical Communications* **2003**, (20), 2630-2631.
179. Shuai, X. T.; Merdan, T.; Unger, F.; Wittmar, M.; Kissel, T., Novel biodegradable ternary copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG: Synthesis, characterization, and potential as efficient nonviral gene delivery vectors. *Macromolecules* **2003**, 36, (15), 5751-5759.
180. Shuai, X. T.; Merdan, T.; Unger, F.; Kissel, T., Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16, (2), 322-329.
181. Boukhalfa-Heniche, F. Z.; Hernandez, B.; Gaillard, S.; Coic, Y. M.; Huynh-Dinh, T.; Lecouvey, M.; Seksek, O.; Ghomi, M., Complex formation and vectorization of a phosphorothioate oligonucleotide with an amphipathic leucine- and lysine-rich peptide: Study at molecular and cellular levels. *Biopolymers* **2004**, 73, (6), 727-734.
182. Hernandez, B.; Boukhalfa-Heniche, F. Z.; Seksek, O.; Coic, Y. M.; Ghomi, M., Secondary conformation of short lysine- and leucine-rich peptides assessed by optical spectroscopies: Effect of chain length, concentration, solvent, and time. *Biopolymers* **2006**, 81, (1), 8-19.
183. Kichler, A.; Leborgne, C.; Marz, J.; Danos, O.; Bechinger, B., Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (4), 1564-1568.
184. Kichler, A.; Mason, A. J.; Bechinger, B., Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2006**, 1758, (3), 301-307.
185. Iwakura, Y.; Toda, F.; Suzuki, H., Synthesis of N-[1-(1-substituted 2-oxopropyl)]acrylamides and -methylacrylamides. Isolation and some reactions of intermediates of the Dakin-West reaction. *Journal of Organic Chemistry* **1967**, 32, (2), 440-443.
186. Casolaro, M.; Bottari, S.; Cappelli, A.; Mendichi, R.; Ito, Y., Vinyl polymers based on L-histidine residues. Part 1. The thermodynamics of poly(ampholyte)s in the free and in the cross-linked gel form. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (4), 1325-1332.
187. Bentolila, A.; I.; V.; Ishai-Michaeli, R.; Kovalchuk, O.; Haloun, C.; Domb, A. J., Poly(N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions. *Journal of medicinal chemistry* **2000**, 43, (13), 2591-2600.

188. Siprashvili, Z.; Scholl, F. A.; Oliver, S. F.; Adams, A.; Contag, C. H.; Wender, P. A.; Khavari, P. A., Gene transfer via reversible plasmid condensation with cysteine-flanked, internally spaced arginine-rich peptides. *Human Gene Therapy* **2003**, 14, (13), 1225-1233.
189. Giroud, C.; Moreau, M.; Mattioli, T. A.; Balland, V.; Boucher, J. L.; Yun, X. L.; Stuehr, D. J.; Santolini, J., Role of Arginine Guanidinium Moiety in Nitric-oxide Synthase Mechanism of Oxygen Activation. *Journal of Biological Chemistry* 285, (10), 7233-7245.
190. Weyts, K. F.; Goethals, E. J., New synthesis of linear polyethyleneimine. *Polymer bulletin* **1988**, 19, (1), 13-19.
191. Lambermont-Thijs, H. M. L.; van der Woerd, F. S.; Baumgaertel, A.; Bonami, L.; Du Prez, F. E.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R., Linear Poly(ethylene imine)s by Acidic Hydrolysis of Poly(2-oxazoline)s: Kinetic Screening, Thermal Properties, and Temperature-Induced Solubility Transitions. *Macromolecules* 43, (2), 927-933.
192. Jeong, J. H.; Song, S. H.; Lim, D. W.; Lee, H.; Park, T. G., DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *Journal of Controlled Release* **2001**, 73, (2-3), 391-399.
193. Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E., Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progress in Polymer Science* **2006**, 31, (5), 487-531.
194. Pellissier, H., Asymmetric organocatalysis. *Tetrahedron* **2007**, 63, (38), 9267-9331.
195. Uchikoshi, T.; Hisashige, T.; Sakka, Y., Stabilization of yttria aqueous suspension with polyethylenimine and electrophoretic deposition. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **2002**, 110, (9), 840-843.
196. Teraoka, I., *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. 3th édition ed.; Wiley: 2002; p 349.
197. Ficini, J.; Lumbroso-Bader, N.; Deperay, J.-C., *Structure de la matière. Cinétique chimique*. 4ème édition ed.; Hermann: 1986; p 179.
198. Novak, M.; Martin, K. A.; Heinrich, J. L., SN2 Reaction of a carbon nucleophile with N-Aryl-O-pivaloylhydroxylamines: A model for in vivo reaction of carcinogenic metabolites of aromatic amines. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, (5430-5431).
199. Bronich, T.; Kabanov, A. V.; Marky, L. A., A thermodynamic characterization of the interaction of a cationic copolymer with DNA. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, (25), 6042-6050.
200. Souguir, Z.; Roudesli, S.; About-Jaudet, E.; Picton, L.; Le Cerf, D., Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives II: pH dependant physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80, (1), 123-129.
201. Malvern, Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis (LDE) In 2011; Vol. 2011.
202. Egorova, E. M., The validity of the Smoluchowski equation in electrophoretic studies of lipid membranes. *Electrophoresis* **1994**, 15, (1), 1125-1131.
203. Kirby, B. J.; Hasselbrink Jr, E. F., Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis* **2004**, 25, 203-213.
204. Singh, R. S.; Gonçalves, C.; Sandrin, P.; Pichon, C.; Midoux, P.; Chaudhuri, A., On the Gene Delivery Efficacies of pH-Sensitive Cationic Lipids via Endosomal Protonation: A Chemical Biology Investigation. *Chemistry & biology* **2004**, 11, 713-723.
205. Jorge, A. F.; Dias, R. S.; Pereira, J. C.; Pais, A., DNA Condensation by pH-Responsive Polycations. *Biomacromolecules* 11, (9), 2399-2406.
206. March, J., *Advanced Organic Chemistry : reaction, mechanisms and structure*. 3ème édition ed.; Wiley: New York, 1985; p 1346.
207. Kircheis, R.; Steinlein, P.; all, The size of DNA/Transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy* **1998**, 5, 1425-1433.

Annexes

Annexe 1 : Spectre ESI-MS, RMN 13C, COSY et ROESY de certains polymères

I – Spectres ESI-MS de la L-histidine Me-N-acryloyle

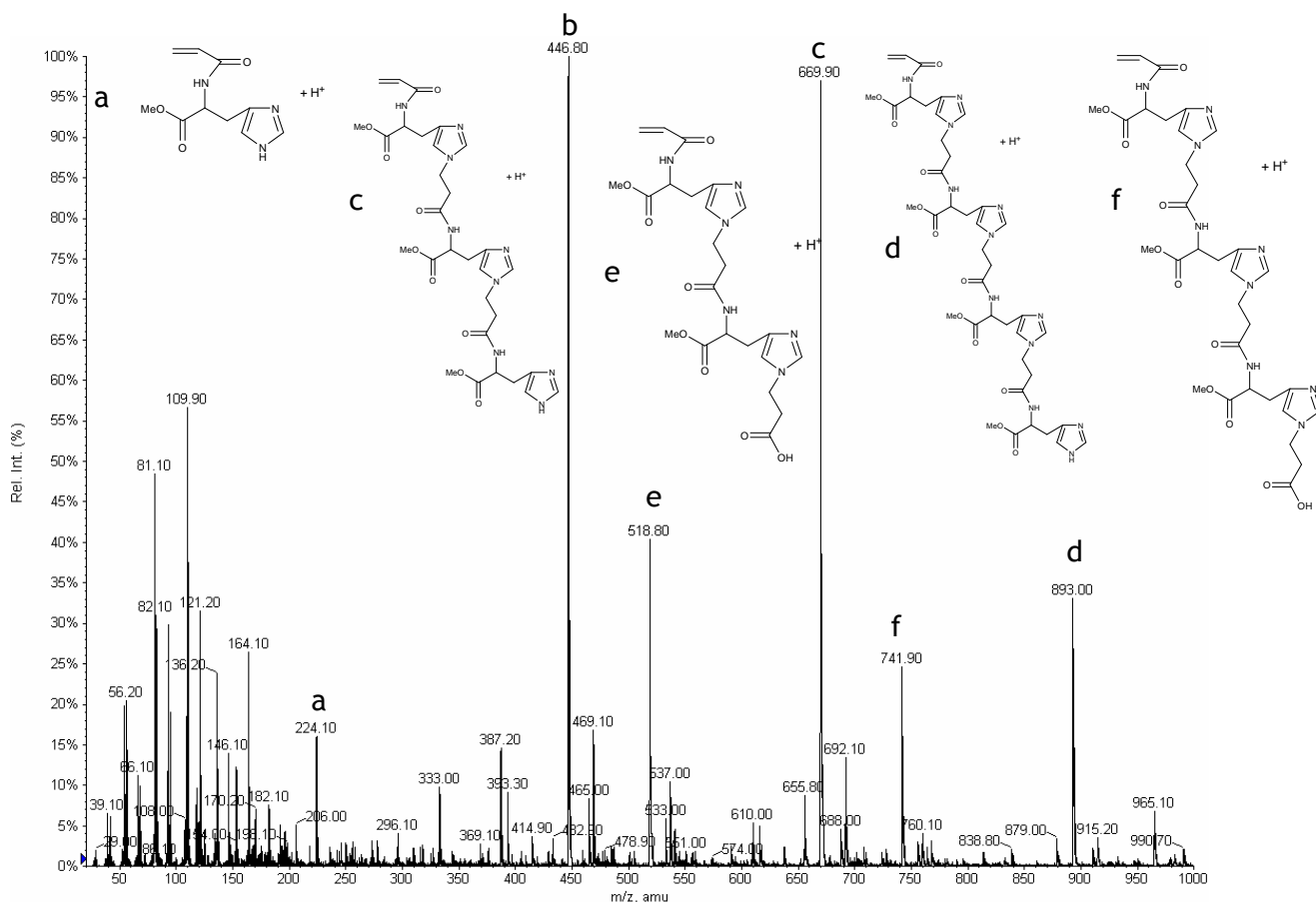


Figure 1 : Spectre ESI-MS de la L-histidine méthyle ester-N-acryloyle dans le méthanol ($[EB71a]= 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)

Ce spectre ESI-MS de la L-histidine-N-acryloyle est réalisé après un stockage de 3 ans au réfrigérateur. Il met en évidence quatre pics à m/z 224,10 uma, 446,80 uma, 669,90 uma et 893,00 uma attribués à la L-histidine-N-acryloyle méthyle ester seule ou polycondensée, respectivement en proton. Les pics à 518,80 uma et 741,90 uma sont attribués aux molécules condensées dégradées.

II – Spectres RMN ^{13}C de la IPEI-N-his Me 19%

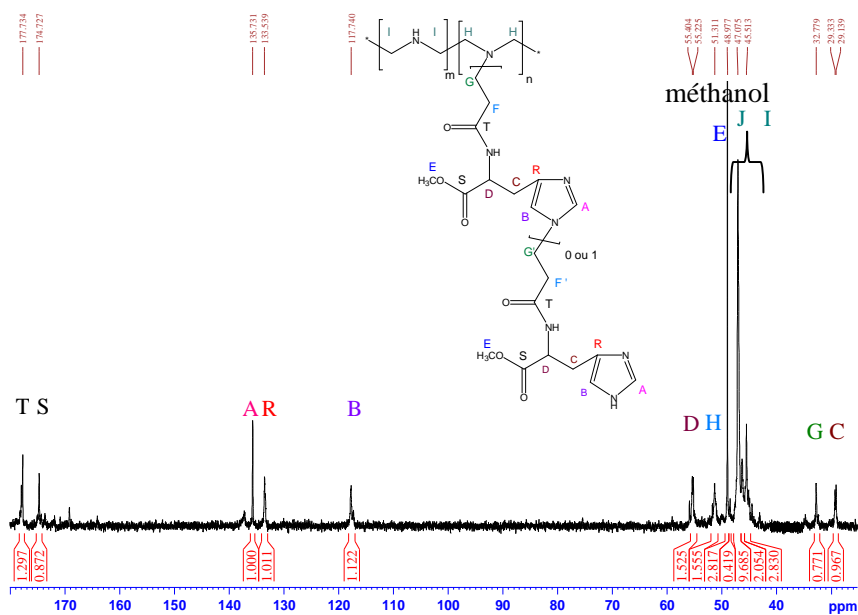


Figure 2 : Spectre RMN ^{13}C de la IPEI-N-his Me (EB019a) dans D_2O pH=7 à 25°C, ([EB019a] 200 mg/ml)

III – Spectres RMN COSY de la IPEI-N-arg

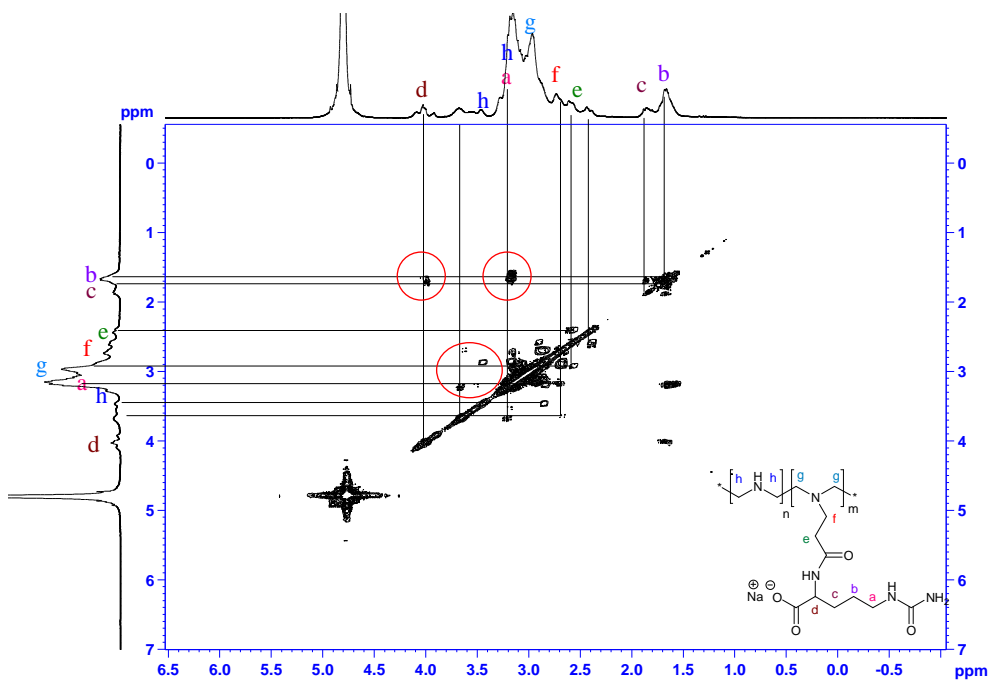


Figure 3 : Spectre RMN ^1H COSY de la IPEI-N-arg (EB143a) dans D_2O pH=7 à 25°C ([EB143a] 20 mg/ml)

IV – Spectres RMN ^{13}C de la IPEI-O-ad

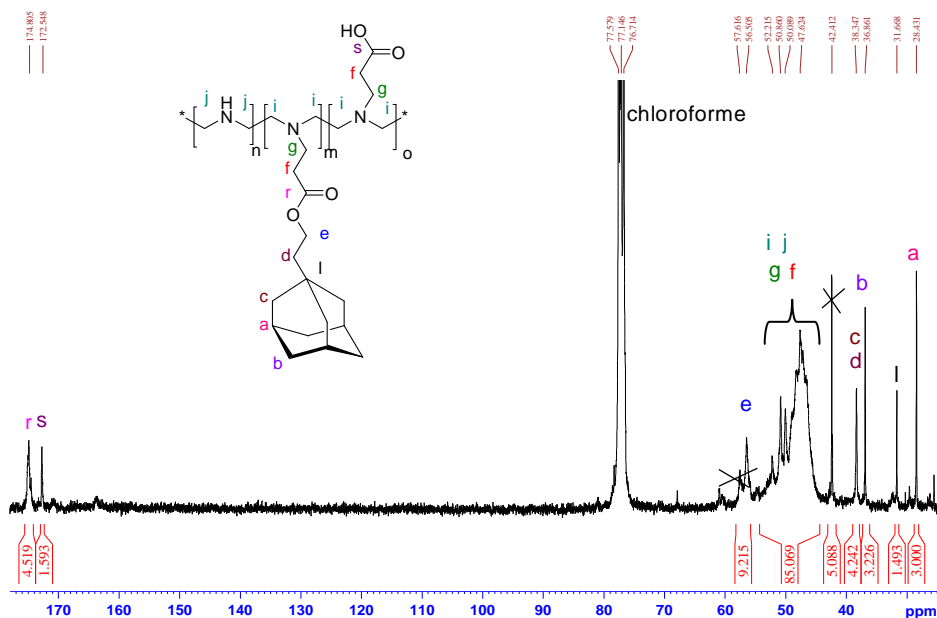


Figure 4 : Spectre RMN ^{13}C de la IPEI-O-ad (EB007d) dans CDCl_3 à 25°C, ([EB007d] 200 mg/ml)

Production scientifique

Publications

Histidinylated linear PEI: a new efficient non toxic polymer for gene therapy. Emilie Bertrand, Christine Gonçalves, Ludivine Billiet, Jean Pierre Gomez, Chantal Pichon, Hervé Cheradame, Patrick Midoux*, Philippe Guégan*. Chem. Com. 2011, 47 (46), 12547-12549

Gene transfer by chemical vectors: A comparative study of the uptake routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cells line. Billet L., Gonçalves C., Gomez J.P., Berchel M., Jaffrès P.A., Le Gall T., Montier T., Bertrand E., Cheradame H., Guégan P., Mével M., Pitard B., Benvegnu T., Lehn P., Pichon C. and Midoux P.* , acceptée en décembre 2011

Synthesis, Physicochemical and biological Characterization of Polyethylenimine grafted Histidine derivative; a New Biomaterial for Gene Therapy. Y. El Ghoul, E. Bertrand, T. Legall, H. Cheradame, P. Lehn, T. Montier and P. Guégan (en préparation)

Proceeding

Transendothelial passage of polyplexes across a pulmonary vascular endothelium, Gomez JP., Goncalves C., Bertrand E., Cheradame H., Pichon C., Guegan, P., Midoux, P., Human gene Therapy, 2011, 22 (6), A19-A20.

Histidinylated IPEIs as new DNA carriers for *in vitro* and *in vivo* gene transfer with low toxicity - P. Guégan, E. Bertrand, T. Legall, C. Pichon, T. Montier, P. Lehn, H. Cheradame, P. Midoux. Journal of Cystic Fibrosis. 2009, 8 (2), S30.2

Communications orales et par affiche

Transendothelial passage of polyplexes across a pulmonary vascular endothelium, Gomez JP., Goncalves C., Bertrand E., Cheradame H., Pichon C., Guegan, P., Midoux, P., **10th Annual Congress of the French-Society-of-Cell-and-Gene-Therapy (SFTCG), 7/8 juin 2011 (Nantes- France)**, communication par affiche

New polymer-based nonviral carrier for gene delivery - French Synthetic Gene Delivery Consortium El Ghoul Y., Bertrand E., Billet, L., Legall T., Pichon C., Midoux P., Lehn P., Cheradame H., Montier T., Guégan P., **12^{ème} colloque “des Jeunes Chercheurs” (VLM), mars 2011 (Pasteur - Paris- France)**, Communication par affiche

Etude du passage transendothélial des polyplexes histidinylés à travers l'endothélium vasculaire pulmonaire- French Synthetic Gene Delivery Consortium - Gomez J.-P., Goncalves C., E. Bertrand, H. Cheradame, C. Pichon, P. Guégan, P. Midoux., (Poster), **12^{ème} colloque “des Jeunes Chercheurs” (VLM), mars 2011 (Pasteur - Paris- France)**, Communication par affiche

Synthèse de nouveaux vecteurs, la IPEI histidinylée : étude de son efficacité *in vitro* pour la thérapie génique, E. Bertrand, T. Legall, C. Pichon, T. Montier, P. Lehn, H. Cheradame, P. Midoux , P. Guégan, **3^{ème} journée sur les polymères en Ile de France (POL-IdF) du 7 septembre 2010, Cergy (France)**, Communication orale

Histidinylated linear PEIs as new DNA carriers for *in vitro* and *in vivo* gene transfer with low toxicity, P. Guégan, E. Bertrand, T. Legall, C. Pichon, T. Montier, P. Lehn, H. Cheradame, P. Midoux, - French Synthetic Gene Delivery Consortium – **32^{ème} conférence européenne sur la mucoviscidose du 9 au 13 juin 2009, Brest (France)**, Communication orale

Histidinylated linear PEIs as new DNA carriers for *in vitro* and *in vivo* gene transfer with low toxicity, P. Guégan, E. Bertrand, T. Legall, C. Pichon, T. Montier, P. Lehn, H. Cheradame, P. Midoux., **32^{ème} conférence européenne sur la mucoviscidose du 9 au 13 juin 2009, Brest (France)**, Communication par affiche

Histidinylated IPEI as new DNA carrier for *in vitro* and *in vivo* Gene Transfer with Low Toxicity, P. Guégan, E. Bertrand, T. Le Gall C. Pichon, T. Montier, P. Lehn H., Cheradame, P. Midoux., **32^{ème} conférence européenne sur la mucoviscidose du 9 au 13 juin 2009, Brest (France)**, Communication par affiche

Résumé

La thérapie génique est une approche thérapeutique proposant d'utiliser des acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides) comme médicament. Les poly(éthylèneimine)s linéaire (IPEI) et branchée (bPEI) sont des vecteurs de références pour le transfert de gènes, dans le domaine des polymères cationiques. L'objectif de ces travaux est de modifier la IPEI par des dérivés de la L-histidine-N-acryloyle, la L-arginine-N-acryloyle ou le 1-adamantane méthylamine-N-acryloyle, en utilisant la réaction de Michaël. Les études physico-chimiques de ces polymères mettent en évidence le comportement de ces vecteurs en solution aqueuse et tamponnée, dont les effets peuvent avoir une influence non négligeable sur la complexation de l'ADN et le transfert de gène. La poly(éthylèneimine-co-éthylèneimine-N-éthylamide-N-2(3(3H-imidazol-4-yl) propionate de sodium) (IPEI-N-his) comportant 10 à 20% de greffons histidine a permis d'obtenir d'excellents résultats en transfection *in vitro*. Ces polymères ont montré une très faible cytotoxicité sur les différentes lignées cellulaires utilisées pour cette étude.

Mots-clés : IPEI, histidine-N-acryloyle, polyplexe, transfert de gènes, thérapie génique

Abstract

Gene therapy is a therapeutic approach aiming at introducing corrective genetic materials into a cell in order to alleviate the symptoms of a disease. The linear (IPEI) and branched (bPEI) poly(ethylenimine) are the gold standard among the polymeric vectors. The aim of this work is to modify the IPEI by N-acryloyl-L-histidine, N-acryloyl-L-arginine and N-acryloyl-1 adamantane methylamine residue using the Michael reaction to improve the transfection efficiency of cationic polymers. The physicochemical studies of these polymers are undertaken in aqueous and buffer solutions, and a higher buffering property of these polymers is emphasized. The polyplexes formation is found to be influenced by the behaviour of the macromolecules in the buffer solution. Transfection experiments are conducted *in vitro*, His-IPEI bearing 10 to 20% histidine residues allowed remarkable transfection efficiency (up to 95%) compared to unmodified IPEI. More remarkably, this new kind of cationic polymers showed very low cytotoxicity on cell lines.

Keywords : IPEI, N-acryloyl-histidine, nanoparticules, gene transfert