

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :
Federico PERCHE

soutenue le : **30 Novembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Transfert d'ARNm par des lipopolyplexes et
vaccination anti mélanome : ciblage des
cellules dendritiques à l'aide de lipopolyplexes
mannosylés**

THÈSE dirigée par :

Patrick Midoux
Chantal Pichon

Directeur de recherche INSERM, Orléans
Professeure d'Université, Orléans

RAPPORTEURS :

Phillipe Barthélémy
Alain Thierry

Professeur d'Université, Bordeaux
Chargé de recherche INSERM, Montpellier

JURY

Alain Legrand
Patrick Midoux
Chantal Pichon
Phillipe Barthélémy
Alain Thierry
Nathalie Mignet
Eric Tartour

Professeur d'Université, Orléans, Président du jury
Directeur de recherche INSERM, Orléans
Professeure d'Université, Orléans
Professeur d'Université, Bordeaux
Chargé de recherche INSERM, Montpellier
Chargée de recherche CNRS, Paris 5
Directeur de recherche INSERM, Paris 15

Remerciements

Tout d'abord permettez-moi de remercier,

Le Docteur Jean-Claude Beloeil, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Le Docteur Patrick Midoux et le Professeur Chantal Pichon pour leur implication dans la direction de cette thèse.

Le Docteur Cristine Gonçalves pour son aide précieuse.

Monsieur David Gosset de la Plateforme de cytométrie.

La Ligue Nationale Contre le Cancer, pour m'avoir attribué une bourse de recherche qui m'a permis de mener sereinement mon travail de thèse. La Ligue Contre le Cancer Région Centre pour le soutien financier du projet.

J'adresse également mes remerciements aux Professeurs Phillipe Barthélémy et Alain Thierry qui ont accepté d'examiner ce travail et d'être rapporteurs de ma thèse. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.

J'exprime toute ma gratitude aux Docteurs Nathalie Mignet et Eric Tartour et au Professeur Alain Legrand qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Le Docteur Arabinda Chauduri, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad (Inde), le Professeur Paul Alain Jaffrès, Université de Brest et le Professeur Thierry Benvegna, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes pour la synthèse des lipides et glycolipides que j'ai utilisé pour mes recherches.

Le Docteur Olivier Lambert du Laboratoire de Chimie & Biologie des Membranes et des Nanoobjets, Bordeaux, pour m'avoir permis de réaliser des expériences de cryomicroscopie électronique.

Tous les membres des différentes équipes du Centre de Biophysique Moléculaire que j'ai sollicité pour mon travail.

Mes amis et mes parents.

Table des matières

Table des matières	3
Abréviations	6
Introduction	8
Généralités	
I_ Les cancers	13
A. Incidence et mortalité	13
B. Le mélanome	15
C. Diagnostic et classification	17
D. Mécanismes de la transformation mélanomale	19
E. Antigènes de mélanome	21
II_ Le système immunitaire	24
A. Les voies de présentation antigénique	24
B. Les réponses immunitaires de type Th1 et Th2	29
III_ Vaccination contre le mélanome	30
A. Vaccination par thérapie cellulaire	32
B. Vaccination directe	38
IV_ Transfert d'acides nucléiques	46
A. Vecteurs chimiques	48
B. Les différentes voies d'endocytose	49
C. Polymères cationiques et polyplexes	50
D. Lipides cationiques et lipoplexes	54
a. Importance des trois domaines	56
b. Importance de la structure	59
E. Lipopolyplexes	64
F. Ciblage des cellules dendritiques	67
Résultats	
Chapitre I : Vaccination anti tumorale contre le mélanome murin B16F10	75
avec des LPD23 et l'ARNm MART1	

A. Comparaison de l'effet vaccinal d'un ARNm avec une coiffe ARCA ou une coiffe IRES	75
B. Influence de la voie d'administration	78
C. Co-administration MART1 / MART1_LAMP1	79
D. Effet vaccinal sur les métastases pulmonaires	81
E. Utilisation d'oligodésoxynucléotides CpG	83
Chapitre II : LPD100 et transfert d'ADN : ciblage des cellules dendritiques avec des LPD100 mannosylés	87
A. Diminution de la toxicité des LPD en dialysant les liposomes	89
B. Evaluation de la conservation des LPD100 après déshydratation	97
C. Ciblage des cellules dendritiques avec des LPD100 mannosylés	109
Chapitre III : LPR100 et transfert d'ARNm	
A. Ciblage des cellules dendritiques avec des LPR100 mannosylés et effet vaccinal contre le mélanome B16F10	125
Chapitre IV : Structure des LPR	161
Conclusion et perspectives	173
Matériel et méthodes	181
1. Poly-L-Lysine Histidylée PEGylée	181
2. Préparation des liposomes 23 et 100	181
3. Plasmides	182
4. ARN et transcription <i>in vitro</i>	183
5. Cellules	183
6. Formation des lipopolyplexes	184
7. Dosage de sucres	185
8. Taille et potentiel zêta	185
9. Activité luciférase	186
10. Evaluation de la toxicité	186
11. Evaluation de l'apoptose	187
12. Déshydratation	187
13. Dosage d'ADN	187
14. Cytométrie en flux et endocytose des liposomes et LPD	188
15. Microscopie	188
16. Vaccination	188
17. Clonage	189

18. Précipitation des halogénures	189
19. Enrichissement en cellules dendritiques spléniques	189
20. Microscopie électronique	190
21. Scintigraphie	190
Bibliographie	193
Annexe	221
Annexe 1 : Carte du plasmide pTG11033	
Annexe 2 : Carte du plasmide pEMCLuc β gA _n	
Annexe 3 : Carte du plasmide pGEM4Z-GFP-A64	
Annexe 4 : Cartes des plasmides pGEM4Z-MART1-A64 et pGEM4Z-MART1-LAmp1-A64	
Annexe 5 : Carte du plasmide pEGFP-Rab5	
Annexe 6 : Carte du plasmide pEGFP-Rab7	
Annexe 7 : Carte du plasmide Caveolin-1-GFP	
Annexe 8 : Carte du plasmide pCMVEGFP	

ABRÉVIATIONS

ACS : American cancer society, société du cancer des Etats-Unis d'Amérique.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
ARCA : Anti reverse cap analog, analogue chimique de la coiffe des ARNm.
ARN (m) : Acide ribonucléique (messager).
ATP : Adénosine triphosphate.
BET : Bromure d'éthidium.
BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, homologue de l'oncogène viral v-Raf de sarcome murin.
CD : Cluster of differentiation, marqueur de différenciation.
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.
CMV : Cytomegalovirus.
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes.
Coll. : Collaborateurs.
CTL : Cytotoxic T lymphocyte, lymphocyte T cytotoxique.
DC : Dendritic cell, cellule dendritique.
DOPE : Dioléyl phosphatidyl éthanolamine.
dp : Degré de polymérisation.
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique.
EGFP : Enhanced green fluorescent protein, protéine fluorescente verte optimisée.
IARC : International agency for research on cancer, Agence internationale de recherche sur le cancer.
IRES : Internal ribosomal entry site.
GFP : Green fluorescent protein, protéine fluorescente verte.
FACS : Fluorescence activated cell sorter, trieur de cellules.
FITC : Fluorescein isothiocyanate, isothiocyanate de fluorescéine.
gp100 : Glycoprotéine de 100 kDa.
HCSP : Haut comité de santé publique.
HDHE : L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)éthylamide.
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.
HLA : Human leucocyte antigen, antigènes des leucocytes humain.
HpK : Histidylated polylysine, polylysine histidylée.
HPV : Human *papilloma* virus, *papilloma* virus humain.
i.d. : Intradermique.
i.m. : Intramusculaire.
i.n. : Intranodulaire.
i.p. : Intrapéritonéale.
IP : Iodure de propidium.
i.v. : Intraveineuse.
IFN : Interféron.
LFA : Lipofectamine.
LT : Lymphocyte T.
LPD : Liposome polymer DNA, complexe ADN/ARNm-polymères-liposomes.
LPR : Liposome polymer RNA, complexe ARNm-polymères-liposomes.
MAGE : Melanoma-associated antigen, antigène associé au mélanome.
MAPK : Mitogen activated protein kinase, protéine kinase activée par les mitogènes.
MART1/MelanA : Melanoma antigen recognized by T cells / melanoma antigen A, antigène A du mélanome.
Mo-DCs : DC dérivées des PBMC.
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide.

NBD-PE : N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt.

NK : cellules « Natural Killer ».

NLS : Nuclear location signal, signal de localisation nucléaire.

ODN : Oligodésoxynucléotides.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PAP : Prostatic acidic phosphatase, phosphatase acide de la prostate.

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, cellules mononuclées circulantes.

PBS : Tampon phosphate salin pH = 7,4.

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde.

PEG : Polyéthylène glycol.

PEI : Polyéthylèneimine.

PET : PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 µg/ml de trypsine.

pLK: Poly-L-lysine.

pLK-His : Poly-L-lysine histidylée.

RE: Reticulum endoplasmique.

RLU: Relative light units, unités de lumière relatives.

s.c : Sous-cutanée.

SVF : Sérum de veau fœtal.

TAA : Tumor associated antigen, antigène associé aux tumeurs.

TCR : Récepteur des lymphocytes T.

Th : Lymphocytes T auxiliaire (" helper ").

TIL : Tumor infiltrated lymphocyte, lymphocytes T infiltrés.

TLR: Toll like receptor, recepteur de type Toll.

UV: Ultraviolets.

UTR : Untranscribed region, région non transcrite.

Introduction

Le cancer est une maladie déjà décrite par les Egyptiens (papyrus Ebers, 1600-1500 av j.c.) causant 7,4 millions de décès dans le Monde en 2004 et qui mobilise de nombreux chercheurs à travers plusieurs plans nationaux en France, au Royaume-Uni et aux Etats-Unis d'Amérique. Les cancers ont compté pour 32,9% des causes de décès des hommes en France entre 2003 et 2007 et pour 23,4% des causes de décès des femmes sur cette même période (INVS, 2010). Il existe de nombreux types de cancers et si quelques-uns comme les cancers des voies respiratoires et digestives ont diminué avec les restrictions de consommation d'alcool et de tabac, ce n'est pas le cas de la plupart des autres types de cancers. Par exemple, le mélanome est un de ceux dont l'incidence augmente en France et dans le Monde. La régression spontanée de mélanome est rare, elle est estimée à 0.2-0.4% par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 2008) démontrant la nécessité de développer des traitements appropriés et en particulier des vaccins.

M. Harald zur Hausen a reçu en 2008 le prix Nobel de Médecine pour avoir montré le lien entre le *papilloma* virus humain (*Human Papilloma Virus*, HPV) et le cancer du col de l'utérus. Deux sociétés pharmaceutiques (Merck et Glaxo Smith Kline) commercialisent des vaccins contre ce virus (Gardasil et Cervarix respectivement). Selon les modèles de projection de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'administration de ces vaccins à plus de 70% des jeunes adolescentes (10-13 ans) permettra s'ils sont efficaces pendant au minimum 10 ans, de diminuer fortement l'incidence des cancers du col causés par les génotypes viraux 16 et 18 responsables de 70% des cancers du col invasifs dans le monde (OMS, 2009).

Les traitements utilisés pour les mélanomes diffèrent selon l'évolution de la pathologie. Les mélanomes de stade précoce localisés de façon superficielle dans la peau ou les ganglions proches de la tumeur primaire peuvent être excisés chirurgicalement. D'autres traitements sont nécessaires pour stopper la progression et prévenir la formation de métastases comme la chimiothérapie (dacarbazine, temozolamide), la radiothérapie, ou l'immunothérapie. Cette dernière consiste à stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules tumorales. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une expression dérégulée de gènes ou par des mutations affectant leur fonction. Ces anomalies conduisent à une production de protéines anormales, à la surexpression des protéines normales ou à l'expression de nouvelles protéines. Pour certains cancers, un (des) antigène(s) a (ont) été identifié(s). Ainsi, dans les cancers à mélanome, il existe des antigènes spécifiques des mélanocytes transformés en cellules tumorales tels que MAGE-1 et MAGE-3 (Melanoma Antigen) et d'autres tels que tyrosinase, gp-100 (glycoprotéine de 100 kDa) et MART-1 (Melanoma Antigen Recognized by T Cells 1) présents sur les mélanocytes normaux, et surexprimés par les cellules du mélanome. Ces antigènes peuvent être utilisés pour induire une réponse immune vis-à-vis des cellules cancéreuses pouvant conduire à l'élimination des mélanomes.

Pour stimuler une réponse immune anti tumorale, le(s) antigène(s) peuvent être introduits dans l'organisme sous forme protéique ou sous forme de peptides (polypeptides de moins de 50 acides aminés). On peut également utiliser l'acide nucléique (ADN ou ARNm) codant l'antigène pour faire produire directement l'antigène tumoral par les cellules immunitaires et notamment les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques (DC).

L'induction d'une réponse immune spécifique par injection de l'ARNm d'un antigène tumoral est une approche innovante. C'est de plus une alternative sécurisante aux stratégies de vaccination ADN par thérapie génique virale et non virale. L'injection d'une formulation contenant l'ARNm est également une alternative intéressante et moins coûteuse par rapport aux stratégies de thérapie cellulaire avec des cellules dendritiques ou de transfert adoptif de lymphocytes.

L'équipe du Dr Patrick Midoux a développé une formulation vaccinale originale pour le mélanome constituée de lipopolyplexes (LPR) contenant l'ARNm d'antigène MART-1. Les LPR sont une formulation à trois partenaires composée de l'ARNm condensé avec un polymère cationique et de liposomes (Mockey et coll., 2007). Dans le modèle du mélanome murin B16F10, la vaccination avec ces LPR induit des lymphocytes T cytotoxiques anti-B16F10 qui conduisent à un retard de développement de tumeurs primaires et de métastases pulmonaires.

Au cours de ma thèse, je me suis consacré à l'optimisation de ces formulations, en développant d'autres lipopolyplexes et un ciblage des lipopolyplexes spécifique aux cellules dendritiques.

Généralités

I_Les Cancers

A. Incidence et mortalité

Entre 1996 et 1998, 43% des hommes et 38% des femmes avaient un risque de développer un cancer au cours de leur vie aux Etats-Unis d'Amérique (Jemal et coll., 2002). Ces pathologies ont été responsables de 6 millions de morts en 2000 dans le Monde (OMS, 2002). Selon les estimations de l'OMS, 12 millions de personnes ont été diagnostiquées porteuses d'un cancer en 2008, 7 millions en sont mortes et 25 millions vivent avec le cancer. Pour 2009, les estimations faisaient état de 12,4 millions de cas de cancers à travers le Monde et 7,6 millions de morts. Le cancer qui a la plus forte prévalence est le cancer du poumon pour les hommes et celui du sein pour les femmes (IARC, 2008). Comme on peut le voir dans le tableau 1, le risque de développer un cancer a pratiquement doublé en France entre 1980 (168 850 cas) et 2005 (319 380 cas) ; 146 000 personnes sont mortes d'un cancer en 2005. L'incidence des cancers a augmenté de 93% pour les hommes et 84% pour les femmes. Elle augmente plus fortement que leur mortalité. Ceci s'expliquerait par le fait que plusieurs tumeurs agressives ont reculé, suite à la diminution de la consommation d'alcool et de tabac et que des cancers dits « de diagnostic favorable » sont plus fréquemment diagnostiqués (Institut de Veille Sanitaire, 2008). Les trois types de cancers les plus diagnostiqués aux Etats-Unis d'Amérique chez les femmes en 2008 sont les cancers du sein (26%), du poumon, du colon et du rectum. Ces deux derniers représentent 50% des cancers. On s'aperçoit que la mortalité due au cancer aux Etats-Unis d'Amérique est la même aujourd'hui qu'il y a 50 ans alors que la mortalité due aux maladies cardiaques, vasculaires ou infectieuses a diminué de 2/3 (Varmus, 2006 ; Jemal et coll., 2008). Cette disparité montre la difficulté de trouver des traitements contre les cancers.

Tableau 1 : Répartition du nombre de malades de cancer en France entre 1980 et 2005.

	1980	1985	1990	1995	2000	2005
Lèvre-Bouche-Pharynx	13280	14414	14812	14549	13660	12270
Œsophage	5494	5591	5542	5381	5091	4721
Estomac	8904	8420	7942	7529	7074	6794
Colon-rectum	23804	26470	29187	31990	34623	37413
Foie	1768	2381	3190	4191	5276	6433
Pancréas	2652	2877	3351	4129	5331	7218
Larynx	4774	4886	4794	4542	4177	3735
Poumon	17912	19982	22186	24685	27440	30651
Plèvre	343	493	651	794	887	906
Mélanome de la peau	2210	3202	4386	5628	6701	7401
Prostate	10756	14190	18979	26760	39636	62245
Testicule	977	1157	1349	1544	1745	2002
Sein	21704	25114	29649	35392	42000	49814
Col de l'utérus	5136	4431	3939	3576	3295	3068
Corps de l'utérus	4287	4427	4640	4912	5274	5774
Ovaire	3403	3613	3818	4023	4218	4375
Vessie	7149	8198	9055	9631	9795	9679
Rein	3689	4653	5647	6614	7420	7949
Système nerveux central	2360	2700	3057	3429	3770	4120
Thyroïde	1352	1773	2415	3366	4726	6672
Lymphome malin non Hodgkinien	3727	5160	6684	8179	9395	10224
Maladie de Hodgkin	1422	1428	1431	1431	1463	1544
Myélome	1865	2237	2681	3215	3827	4516
Leucémies aiguës	1985	2144	2320	2534	2779	3082
Leucémie lymphoïde chronique	1810	2033	2286	2576	2883	3224
Tous cancers	168850	188742	211776	239792	273518	319380

D'après (Belot et coll., 2008).

B. Le mélanome

Bien que les mélanomes ne représentent que 4% des cancers dermatologiques, ils sont responsables de 80% des morts de cancer de la peau (Miller et Mihm, 2006). De plus, leur incidence et leur mortalité ont augmenté ces dernières années (Tableau 1 et Fig. 1). Les chirurgiens sont confrontés à un dilemme face à des patients avec des mélanomes primaires localisés. L'ablation du ganglion le plus proche est souvent responsable de la mortalité et est rarement associée à un bénéfice pour le patient. L'excision de la tumeur primaire est une alternative possible et est suivie d'observations régulières du patient pour détecter des métastases dans les ganglions. Chez les 20% de patients qui développent des métastases ganglionnaires durant la période d'observation, les ganglions sont ensuite excisés. Ceci permet pour 80% des patients d'éviter la mort mais pour les 20% de patients restants, le délai dû à l'observation permet aux métastases de gagner d'autres ganglions. Ainsi, aucune des deux approches n'est optimale pour le traitement de mélanomes de stade précoce (Cochran et coll., 2006).

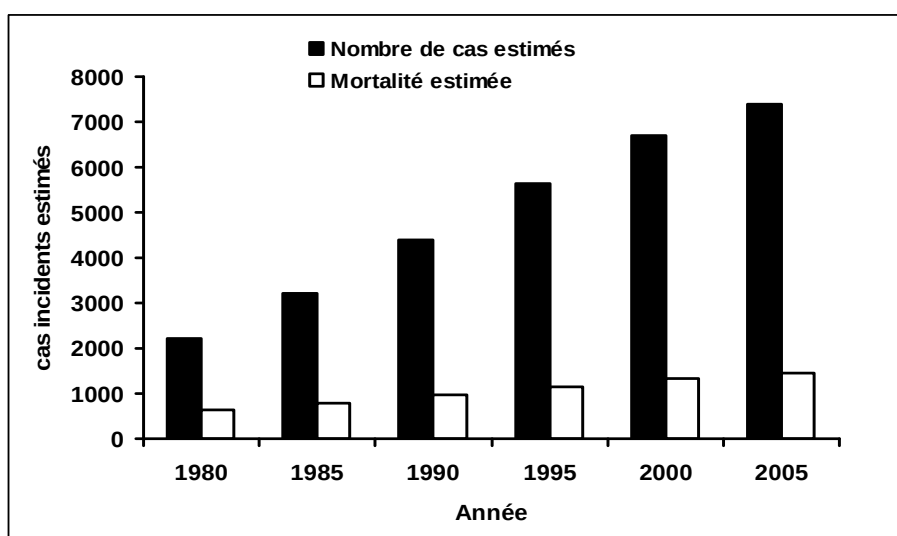


Figure 1 : Estimation Nationale de l'incidence et de la mortalité des mélanomes de 1980 à 2005 en France. A partir des données de (Belot et coll., 2008).

Selon les estimations, il y aurait eu en France, 7401 nouveaux cas de mélanome en 2005 (12^{ème} rang chez les hommes et 8^{ème} rang chez les femmes) avec des taux d'incidence de 7,6 pour 100 000 pour les hommes et 8,8 pour 100 000 pour les femmes ; 1440 décès en France et 20% d'augmentation depuis 1980 (HCSP, 2009).

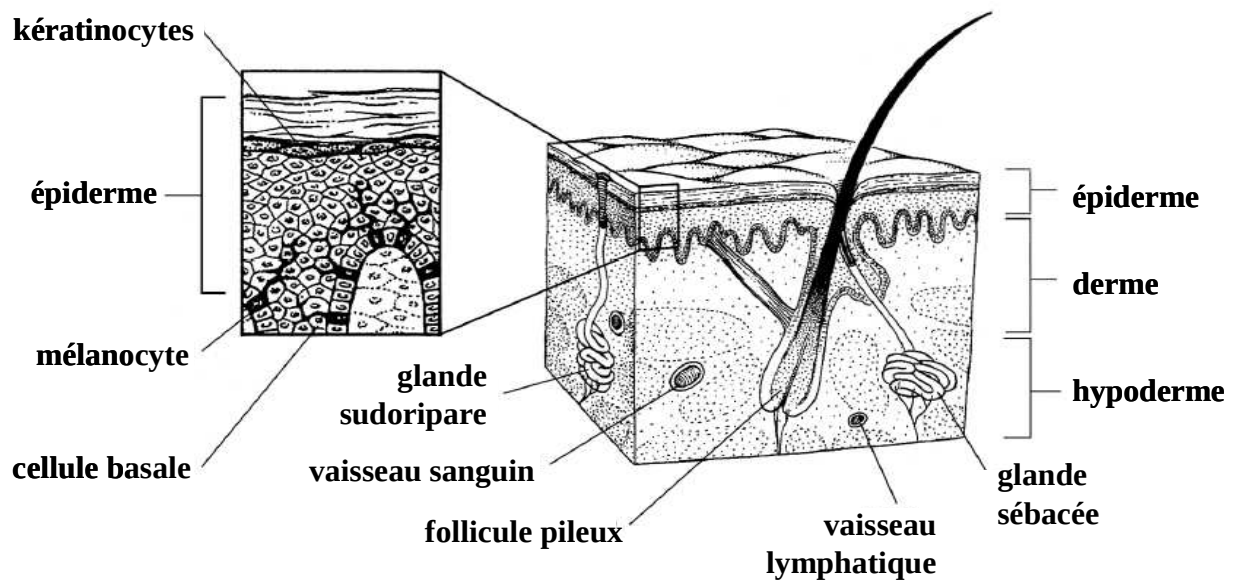


Figure 2 : Schéma de la peau. A partir de (ACS, 2010).

Les mélanomes dérivent des mélanocytes présents dans la lame basale de l'épiderme (Fig. 2). Les mélanocytes sont les photo-protecteurs de la peau. Ces cellules ont pour fonction de sécréter la mélanine et de protéger des radiations UV les autres cellules de la peau. Le bronzage est une réponse de défense aux UV. Les mélanocytes sécrètent de la mélanine qu'ils transfèrent aux kératinocytes où elle absorbe et dissipe l'énergie UV. Si la plupart des kératinocytes et des autres cellules de la peau répondent aux radiations UV en mourant ou en arrêtant leur cycle cellulaire après lésion de l'ADN, les mélanocytes résistent mieux à ces radiations. Ces derniers stimulent la production de facteurs de croissance par les kératinocytes qui agissent sur la croissance des mélanocytes. Les UV induisent des mutations, empêchent les réactions immunes dans la peau, augmentent la production locale de facteurs de croissance et provoquent la formation de radicaux libres délétères pour les kératinocytes et les mélanocytes (Gandini et coll., 2005 ; Aggarwal et coll., 2006 ; Miller et Mihm, 2006 ; Gray-Schopfer et coll., 2007).

Lors de la tumorigénèse, les mélanocytes échappent au contrôle des kératinocytes et forment des mélanomes. 80% des cas de mélanome seraient dûs à une exposition au soleil et les risques augmenteraient avec certains facteurs tels que la peau blanche, les cheveux roux, des taches de rousseur, l'exposition au soleil pendant l'enfance même sans coups de soleil, l'exposition intermittente au soleil et utilisation de lampes de bronzage (Giblin et coll., 2007). Les mélanomes apparaissent à partir de grains de beauté dans 20-30% des cas. Il existerait une corrélation entre les inflammations dues aux coups de soleil et à la fumée de cigarette et le développement de cancers du poumon et de mélanome. De plus, les mélanomes possèderaient des facteurs de risque propres tels que goudron de houille, arsenic et radiation. Il y a un risque accru de mélanome pour les personnes

ayant pratiqué le bronzage artificiel avant l'âge de 30 ans, ce qui pourrait avoir entraîné des effets délétères sur la réponse immune.

Les UV générés par des lampes à bronzer sont d'intensités supérieures à ceux reçus du soleil après filtration atmosphérique de la plupart des UV B et C. Les UV B sont les plus dangereux et sont des carcinogènes directs alors que les UV A sont des carcinogènes indirects (IARC, 2006 ; ACS, 2008 ; OMS). Mais, bien que les mélanomes soient liés aux UV, les zones de distribution sur le corps ne sont pas toujours liées à celles exposées (Rees, 2008).

C. Diagnostic et classification

a. Dépistage

Une détection précoce des tumeurs augmente les chances de succès des traitements, le nombre de cellules tumorales à détruire est plus faible et celles-ci n'auraient pas encore acquis tous les mécanismes de résistance à la réponse immune ni formé des métastases dormantes ou actives, sources de récurrences. Dans le cas des mélanomes, la détection se fait classiquement par observation et palpation. Les lésions mélanomales ressemblent fréquemment à des lésions bénignes ne nécessitant aucun traitement (Marghoob et coll., 2009). L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), la radiographie et l'échographie sont aussi utilisées. Des biopsies sont fréquemment pratiquées pour confirmer un diagnostic visuel mais celles-ci peuvent être partielles et l'excision peut avoir été réalisée dans une zone saine. 80% des cas de mélanome sont traités de cette façon (Lipsker et coll., 2007).

b. Classification

Les mélanomes cutanés sont classés en quatre sous-types principaux :

- lentigo : le mélanome apparaît dans un lentigo qui est plus fréquemment présent dans la région tête et cou.
- superficiel : développement superficiel du mélanome avant l'invasion verticale.
- nodulaire : progression rapide du mélanome ; type le plus agressif.
- acral lentiginous melanoma : lésions pigmentées sur paume, plante, sous les ongles, rares.

Des caractéristiques phénotypiques communes permettent la classification entre mélanome *in situ*, tumeur primaire ; mélanome issu de grain de beauté dont il a gardé la forme et qui possède une couleur uniforme ; mélanome invasif touchant plusieurs couches de la peau et nodules (Fig. 3).

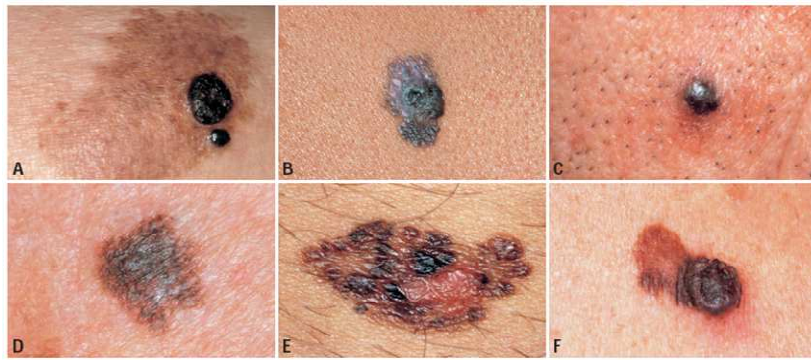


Figure 3 : Caractéristiques phénotypiques des principaux types de mélanome (OMS).

- a) Mélanome issu d'un grain de beauté.
- b) Mélanome : noter l'asymétrie, les bords irréguliers et la couleur non uniforme.
- c) Petit mélanome < 3 mm.
- d) Mélanome *in situ* : lésion plate, brune avec bords irréguliers.
- e) Mélanome invasif : forte asymétrie et différences de couleur.
- f) Nodule de mélanome.

La classification de Clark pour les tumeurs est basée sur l'invasion des tissus sous-jacents par les mélanocytes. Elle comprend quatre stades (I à IV) : stades I et II = localisé (confiné à l'organe d'origine), stade III = régional (aux alentours de l'organe d'origine), stade IV = distant / métastatique (loin du foyer tumoral) (Marghoob et coll., 2000 ; Owen et coll., 2001) (Fig. 4).

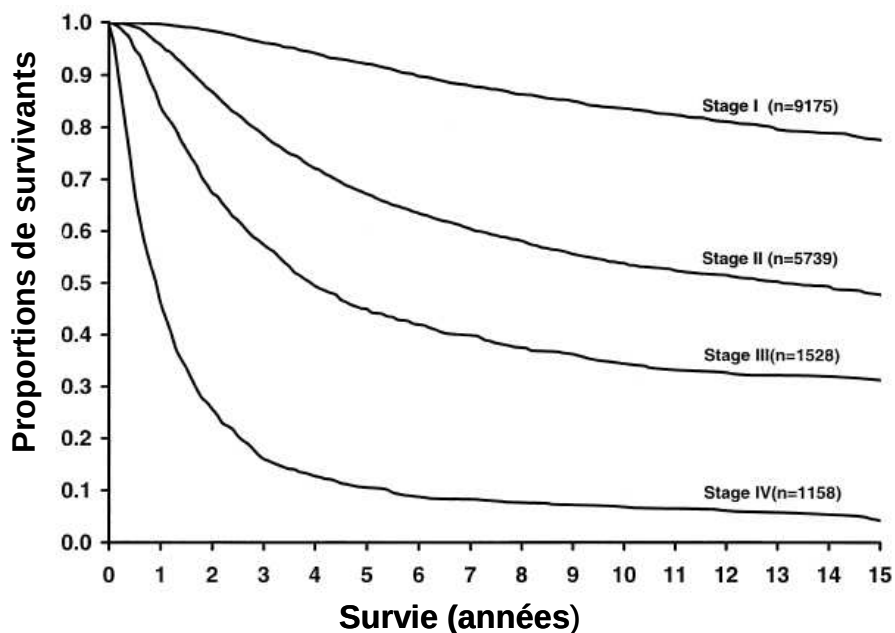


Figure 4 : Survie de patients atteints de mélanome selon le temps et le stade de progression de la maladie (n = nombre de patients). Adapté d'American Joint Committee on Cancer, 2002

Les patients atteints de mélanome métastatique (stade IV) ont une espérance de vie moyenne de 6 mois et des chances de survie à 2 ans de 5 à 15% (Cummins et coll., 2006 ; Dudley et coll., 2008). Les taux de survie à 5 et 10 ans sont respectivement de 91% et 89% mais ils sont respectivement de 65% et 15% à 5 ans pour un mélanome régional et distant. Il est important de noter que les traitements pour lesquels aucun recul n'existe sont d'abord essayés sur des patients atteints de mélanomes à des stades avancés (III ou IV) pour en déterminer l'innocuité (Fig. 4). Ces mêmes traitements s'ils étaient utilisés sur des patients de stades précoces pourraient avoir plus de succès.

La détermination d'un effet clinique en réponse aux traitements anticancéreux, a été standardisée et la réponse objective au traitement (Objective Clinical Response, RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) est définie par 30% de réduction de la somme des plus grands diamètres des lésions mesurés avant traitement. Pour l'OMS une réponse objective signifie 50% de réduction dans la somme des produits des diamètres perpendiculaires des lésions. Dans les deux cas, il ne doit pas y avoir apparition de nouvelles lésions pendant le traitement (Dalton et Friend, 2006 ; Rosenberg et coll., 2008).

D. Mécanismes de la transformation mélanomale

Dans les conditions physiologiques, la prolifération des mélanocytes est régulée par les kératinocytes soit par contact cellulaire soit via des facteurs de croissance. La transformation des mélanocytes s'accompagne d'une modification de l'expression des molécules d'adhésion (E-cadhérine vers N-cadhérine) et d'une altération des jonctions serrées entre kératinocytes et mélanocytes.

Pendant leur transformation en cellules cancéreuses (Fig. 5), les mélanocytes acquièrent la capacité de croissance non régulée puis celle de formation de métastases. Ces modifications s'accompagnent de mutations de gènes contrôlant la prolifération cellulaire, les propriétés adhésives des cellules et l'apoptose.

La transformation des mélanocytes est détectable morphologiquement en suivant la règle ABCD pour asymétrie (A), irrégularité de contour (Border), modification de la couleur (C) et du diamètre de la lésion (D).

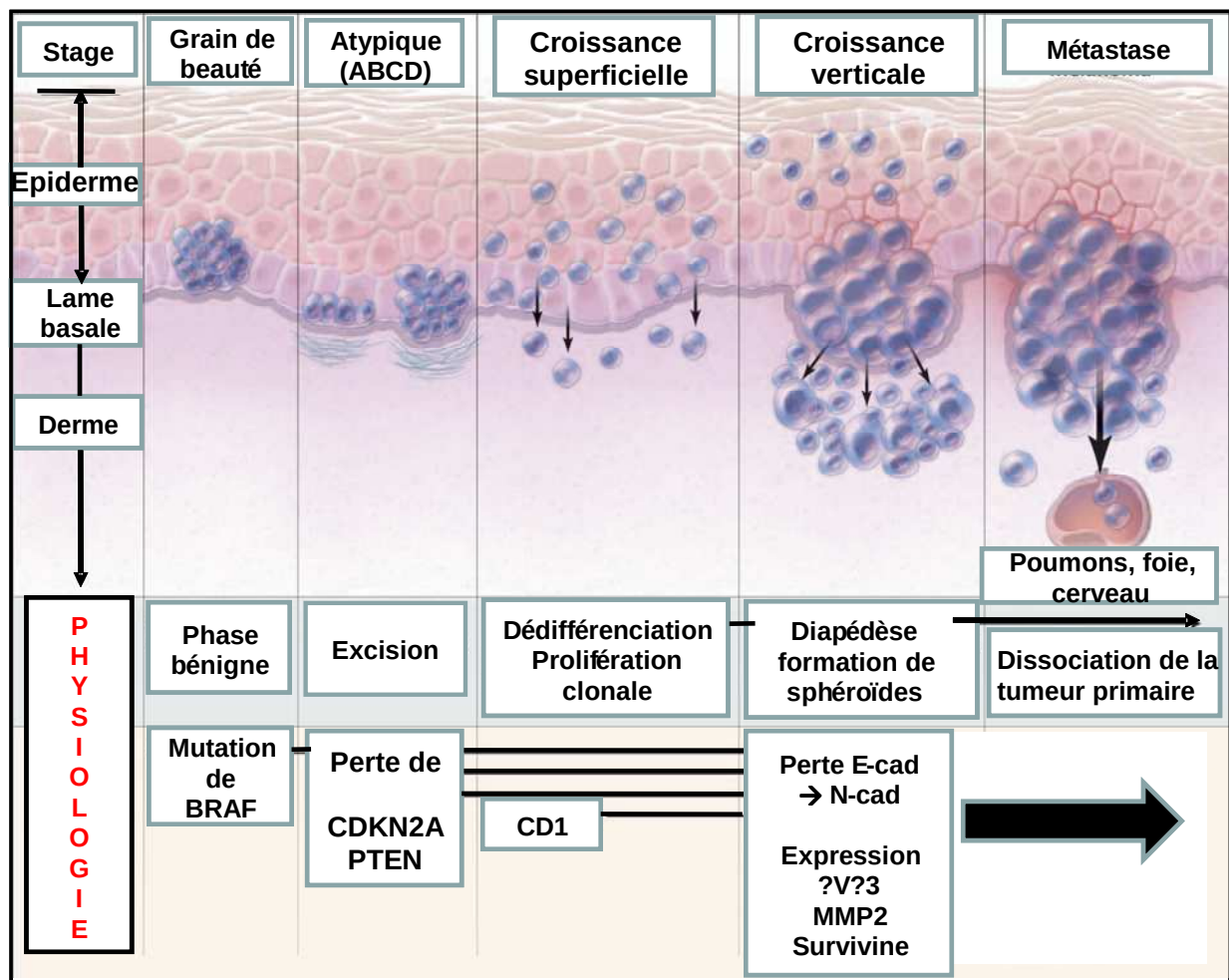


Figure 5 : Changements phénotypiques et physiologiques associés à la progression du mélanome. Adapté de (Miller et Mihm, 2006).

E. Antigènes de mélanome

Plusieurs antigènes spécifiques des mélanomes sont reconnus par les lymphocytes T autologues. Deux types d'antigènes de tumeurs peuvent être distingués : mutations ponctuelles qui génèrent de nouveaux peptides ou qui donnent de nouveaux épitopes et expression de gènes tumeur spécifique. Un faible pourcentage est spécifique de la lignée germinale (Cancer Testis Antigens). Les antigènes présentent des séquences immunodominantes, c'est-à-dire qui stimulent plus efficacement le système immunitaire, qui sont utilisées sous forme de peptides et de protéines (Tableaux 2 et 3) (Sato et coll., 2009). Plusieurs de ces antigènes sont communs à d'autres types de cancers.

Le tableau 2 montre que trois antigènes de mélanome (tyrosinase, MART-1 et gp 100) sont exprimés dans les métastases de plus de 90% des patients atteints de mélanome à stade métastatique.

Tableau 2 : Principaux antigènes de mélanome reconnus par les lymphocytes T, pourcentage d'expression de ces antigènes dans les métastases de patients

Gène	Expression dans les métastases (nombre de cas)	Restriction HLA	Séquence peptidique	Position dans la protéine
MAGE-A1	46%	A2	KVLEYVIKV	278-286
		A3	SLFRAVITK	96-104
MAGE-A3	74%	A1	EVDPIGHLV	168-176
		DP4	KKLLTQHFVQENYLEY	243-258
MAGE-A4	28%	A2	GVYDGREHTV	230-239
MAGE-A10	47%	A2	GLYDGMEHL	254-262
MAGE-A12	62%	Cw7	VRIGHLYIL	170-178
MAGE-C12	59%	A2	ALKDVEERV	336-344
Tyrosinase	> 90%	A2	YMDGTMSQV	369-377
Melan-A/MART1	> 90%	A2	ELAGIGILTV	26-35
gp100	> 90%	A2	IMDQVPFSV	209-217 (T210M)

Adapté de (Boon et coll., 2006).

Dans le tableau 3, les différents types d'antigènes de mélanome sont présentés, on distingue :

- antigènes de différenciation (gp 100, MART-1) exprimés par les mélanocytes et les mélanomes. Ils sont exprimés dans les tumeurs mais également de façon limitée dans les cellules normales des tissus sains correspondants. La plupart sont retrouvés dans le mélanome et les mélanocytes. Parmi eux la tyrosinase, gp100, MelanA/MART-1 qui participent à la biosynthèse de la mélanine dans les mélanocytes.
- antigènes uniques subdivisés en deux groupes: les antigènes dus à des mutations ponctuelles (uniques) comme CDK4 et α -caténine et ceux présents dans les mélanomes et absents dans les mélanocytes comme GnT-V (N-acetylglucosamyl transférase C). Les mutations présentes entraînent l'activation de voies cellulaires comme la prolifération. C'est notamment le cas BRAF, dont les mutations sont associées à 50% des mélanomes. Ces mutations sont mutuellement exclusives et causent l'activation constitutive de sérines-thréonine kinases de la voie MAPK permettant une expansion des cellules cancéreuses (Miller, 2006).
- antigènes de prolifération associés à une stimulation du cycle cellulaire (cyclines A, B1, D1, D3 et E, cdk2), à la surexpression de la télomérase.
- antigènes de signalisation avec diminution de sensibilité aux régulateurs de croissance (baisse d'expression de PTEN) et augmentation de l'expression d'oncogènes comme c-myc. Ce groupe comprend également des protéines anti-apoptotiques (survivine), hTERT et les protéines suppressives de tumeurs (p53, Bcl2).
- antigènes de profil métastatique qui par modification d'expression des protéines d'adhésion extracellulaires (perte d'expression de l'E-cadhérine au profit de la N-cadhérine) et par expression de protéases de digestion de la matrice extracellulaire (MMP) permettent la dissémination tumorale.

Barrow et coll. ont comparé l'expression d'antigènes de mélanome en fonction du stade par immunohistochimie sur des biopsies de mélanomes primaires, de métastases ganglionnaires, de métastases sous-cutanées et de métastases distantes (Barrow et coll., 2006). Ils ont montré que les antigènes de différenciation des mélanocytes sont exprimés à tous les stades dans les biopsies de plus de 90% des patients. Leur étude a permis de montrer que certains antigènes sont corrélés à la progression des mélanomes vers le stade métastases. En effet, les antigènes MAGE-A1 et MAGE-A4 sont exprimés, respectivement, dans 20% et 9% des mélanomes primaires et 51% et 44% des métastases distantes ce qui en fait des marqueurs de diagnostic.

Tableau 3: Marqueurs de mélanome.

Différenciation	Tyrosinase gp100, MART1	TRP-1, TRP-2 MC1R	AIM-1 S-100	Mitf HMW-MAA
Prolifération	Cyclines A, B1, D1/D3, E ↑	Cdk2 ↑, p15 ↓ p16 ↓	p21 ↑, p27 ↓ Ki67 ↑	PCNA ↑, mdm-2 ↑ télomérase ↑
Signalisation	c-kit ↓ c-myc ↑	N-ras ↑ α-caténine ↓ EGFR ↑	Récepteur à la transferrine ↑	PTEN ↓
Facteurs de transcription	ATF-1 ↑	AP-2 ↓	NFκB ↓	
Adhésion	E-cadhérine ↓ N-cadhérine ↑ VCAM-1 ↓	ICAM-1 ↑ MCAM ↑ ALCAM ↑	αvβ3 ↑, αvβ6 ↑ CD44 v6 ↑	
Protéases	MMP-1, 2, 9, 13 ↑	MT1-MMP ↑ TIMP-1, 3 ↑	EMMPRIN ↑	PA-system ↑ Cathépsines B, D, H, L ↑
Autres	CD63 ↓ HLA classe I ↓ HLA classe II ↑	CTAs ↑	Ostéonectine ↑ Fas/Fas ligand ↑	

↑ expression augmente avec la progression tumorale, ↓ expression diminue avec la progression tumorale. TRP: protéine reliée à la tyrosinase; MC1R: récepteur à la mélanocortine 1; AIM-1: absent du mélanome; S-100: 100% soluble dans le sulphate d'ammonium à pH neutre ; Mitf: facteur de transcription de la microphthalmie; HMW-MAA: antigène de haut poids moléculaire associé au mélanome; PCNA: antigène des cellules en prolifération; MDM2: oncogène murin double minute ; N-ras: homologue de l'oncogène viral RAS des neuroblastomes; EGFR: récepteur au facteur de croissance de l'épiderme; PTEN: homologue de la phosphatase et de tensin; ATF-1: facteur de transcription activateur 1; AP-2: protéine activatrice 2 ; VCAM: molécule d'adhésion des cellules vasculaires; ICAM: molécule d'adhésion intercellulaire; ALCAM: molécule d'adhésion des cellules leucocytaires activées ; MMP: metallo protéinase de la matrice; EMMPRIN: inducteur des metallo protéinases de la matrice extracellulaire ; PA-system: système phosphatase alcaline; CTAs: antigènes de cancer des gonades. A partir de données de (Lowe et coll., 2007 ; Melnikova et Bar-Eli, 2008 ; OMS).

II_ Le système immunitaire

A. Les voies de la présentation antigénique

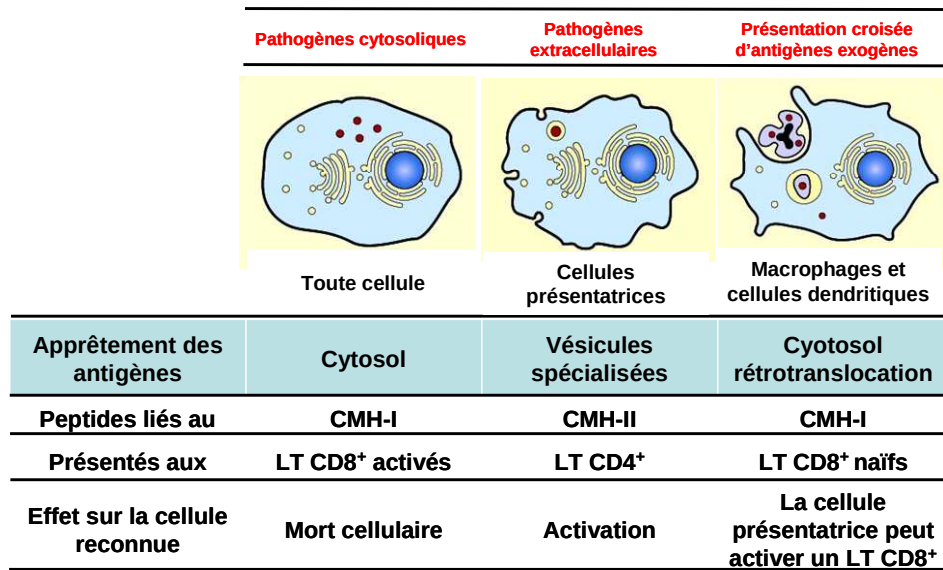


Figure 6 : Modes de présentation des antigènes. Adapté de (Murphy et coll., 2010).

Classiquement on distingue trois types de voies de présentation ou apprêtement de l'antigène : la présentation des pathogènes cytosoliques sur les complexes CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I), la présentation des pathogènes extracellulaires sur les complexes CMH-II (CMH de classe II) et la présentation croisée des molécules exogènes sur le CMH-I (Fig. 6).

Tous les types cellulaires expriment les molécules du CMH-I mais présentent l'antigène avec des efficacités très différentes. La majorité des cellules peut donc être la cible de lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, ces derniers doivent auparavant être activés par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui sont les lymphocytes B (LB), les macrophages et plus particulièrement les cellules dendritiques (DC) (Trombetta et Mellman, 2005 ; Robson et coll., 2010). Bien que les LB ne soient pas les plus professionnelles, elles sont les plus spécifiques. Leur capacité à présenter l'antigène est liée à leur fonction primaire de sécrétion des immunoglobulines, alors que pour les DC la fonction principale est la stimulation des lymphocytes. Les macrophages expriment CMH-I et II, et en augmentent les niveaux après inflammation. Mais ces niveaux sont faibles comparés aux LB ou aux DC ce qui explique pourquoi les macrophages stimulent moins efficacement les LT. De plus, même avec leur forte capacité d'endocytose, les endosomes des macrophages ne sont pas spécialisés pour la présentation des antigènes et seraient plus adaptés à la digestion du matériel internalisé. Contrairement aux macrophages et aux LB, la fonction primaire des DC est la présentation des antigènes. Les DC et les macrophages stimulent les lymphocytes T naïfs (Pozzi et coll., 2005).

a. Voie endogène de présentation sur les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I)

Les antigènes d'un pathogène intracellulaire (bactérie, virus) ou d'une protéine endogène anormale sont dégradés dans le protéasome après ubiquitinylation. Les épitopes peptidiques issus de cette dégradation sont transportés du compartiment cytosolique vers le reticulum endoplasmique (RE). Au niveau de la membrane interne du RE, le repliement correct de la chaîne lourde du CMH-I et de la $\beta 2$ microglobuline permet la fixation des peptides qui est facilitée par l'interface créée par la tapasine et les TAP (protéines associées au transport de l'antigène). La molécule CMH-I est un hétérodimère assemblé dans le RE. Avant liaison du peptide, les nouvelles molécules de classe I sont retenues dans le RE par des interactions avec les molécules chaperonnes calnexine, calciréticuline et ERp57 ainsi que d'autres protéines associées comme la tapasine. Les molécules du CMH-I présentent un peptide de 8 à 10 acides aminés (Wolf et Ploegh, 1995). En absence du peptide, les hétérodimères de classe I sont instables et se dissocient à température physiologique (Rock et Goldberg, 1999). La liaison d'un peptide stabilise l'interaction entre les chaînes lourdes et légères et permet au complexe peptide – CMH-I d'être transporté vers la membrane plasmique (Fig. 7). Des lymphocytes T cytotoxiques antigène-spécifiques ou CTL, après reconnaissance du complexe CMH-I-peptide par le récepteur des lymphocytes T (TCR) seront activés et iront détruire les cellules qui présenteront le même couple CMH-I-peptide.

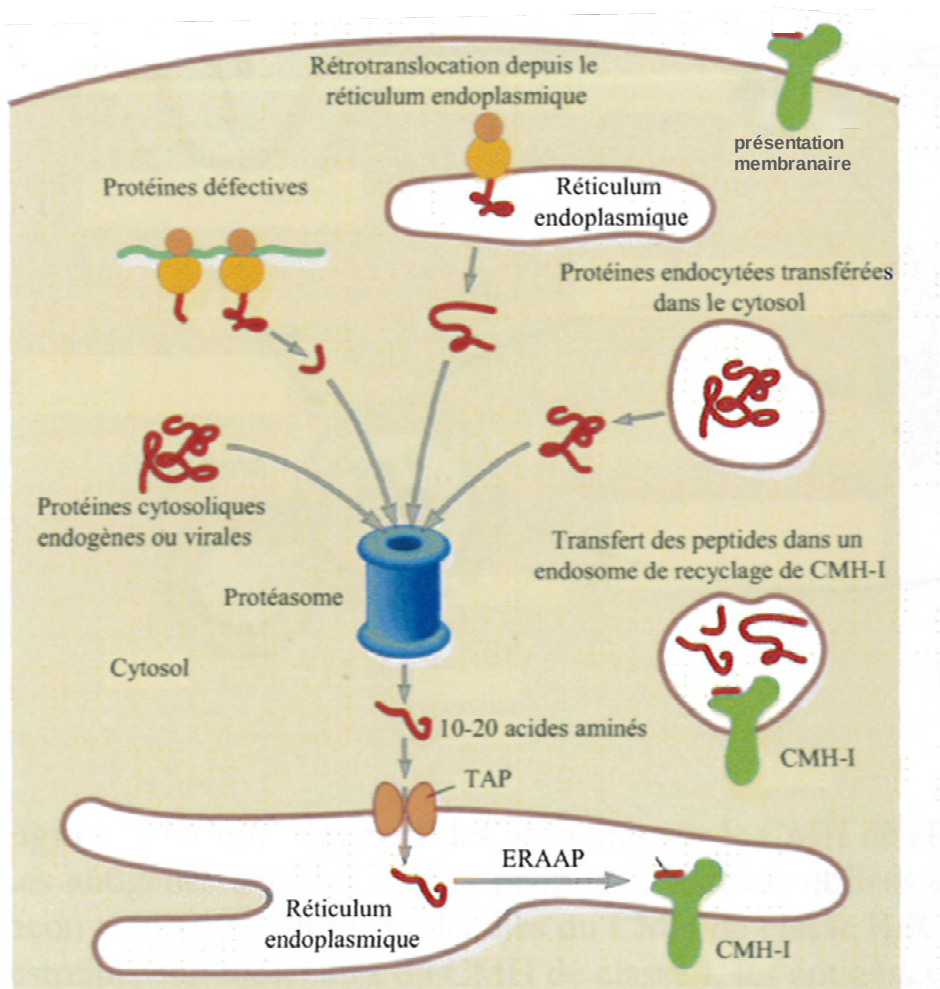


Figure 7 : Origine des peptides présentés sur le CMH de classe I.
D'après (Trombetta et Mellman, 2005).

b. Voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe II

Les pathogènes extracellulaires sont endocytés ou phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et dégradés dans les lysosomes ou phago-lysosomes. Les fragments peptidiques produits ne sont pas transportés vers le RE, mais associés aux molécules CMH-II présentes dans des vésicules de sécrétion particulières. Les molécules CMH-II sont localisées initialement à la membrane interne du RE où elles sont sous une forme inactive car complexées à la molécule invariante Ii (CD74) (Bryant et coll., 2002). La dégradation de la chaîne invariante Ii par les protéases contenues dans les endosomes tardifs génère un fragment de 21 acides aminés appelé CLIP (peptide Ii associée aux classes II). Ce peptide reste associé au site de fixation peptidique de la molécule de CMH-II. Arrivé dans un compartiment endosomal spécialisé, CLIP est libéré par l'action de la molécule HLA-DM chez l'Homme et H2-M chez la souris. L'accumulation de molécules CMH-II néo synthétisées observée dans un endosome tardif spécialisé a conduit à la dénomination de « MIIC » (compartiments riches en CMH-II), ou « CIIV » (vésicules de classe II). Les complexes CMH-II-peptide retournent à la surface de la cellule et participent à la stimulation

des lymphocytes auxiliaires ou T helper (Th). Ces lymphocytes organisent par la suite une réponse immune à médiation cellulaire et/ou humorale contre le pathogène reconnu.

Pour qu'une réponse T soit efficace, outre reconnaissance de l'antigène sur les CMH des CPA, il faut également des signaux de co-stimulation. Au départ la co-stimulation n'était censée représenter que des interactions ligands récepteurs autres que le TCR mais ce processus est plus complexe (Croft, 2003 ; Krogsaard et coll., 2007).

a. « Présentation croisée » ou voie vacuolaire de présentation sur les molécules du CMH-I

Récemment il a été montré que les CPA et plus particulièrement les DC, possèdent également la capacité à présenter des antigènes exogènes sur les molécules de classe I et à activer des LT CD8⁺ (Rock et Goldberg, 1999 ; Ackerman et coll., 2004). Ce mécanisme cassant le dogme « antigène endogène-CMH-I / antigène exogène-CMH-II » est appelé « présentation croisée » (cross-presentation ou cross-priming) (Rock et Goldberg, 1999) (Fig. 8). Cette présentation s'effectue à partir d'antigènes aussi bien issus de cellules mortes par capture de corps apoptotiques qu'après contact avec des cellules vivantes (Matheoud et coll., 2010).

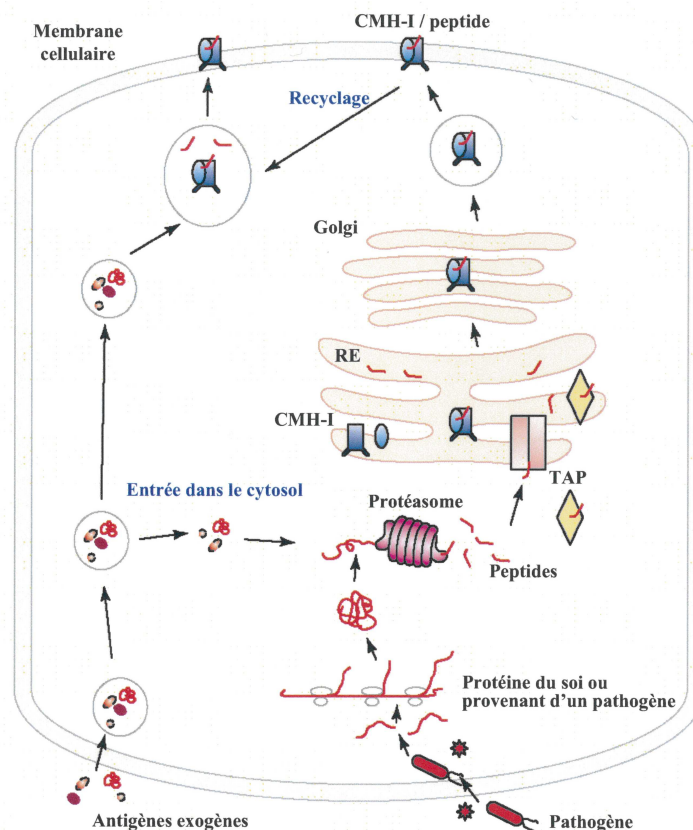


Figure 8 : Présentation Croisée. D'après (Larsson et coll., 2001).

Les antigènes internalisés rejoignent le cytosol soit après fusion des phagosomes avec le reticulum endoplasmique, reticulum qui contient les molécules CMH-I soit après clivage peptidique des antigènes par la cathépsine S et liaison à des molécules CMH-I présentes dans les endosomes (Rock et Shen, 2005 ; Groothuis et Neefjes, 2005). Ce mécanisme de présentation fait intervenir le protéasome pour certains antigènes comme le montre le blocage de la présentation croisée par des inhibiteurs du protéasome (Amigorena et Savina, 2010). Lorsque les antigènes sont internalisés par une endocytose via le récepteur DEC-205 (lectine reconnaissant des sucres dont le mannose) et la phagocytose, ils peuvent conduire à une présentation croisée (Ackerman et coll., 2003). Bonifaz et coll. ont montré un ciblage des cellules dendritiques et une présentation du peptide ovalbumine sur les complexes CMH-I dans un modèle murin après administration sous-cutanée d'ovalbumine conjuguée à un anticorps monoclonal anti-DEC 205 (Bonifaz et coll., 2004). Comme DEC 205, le récepteur mannose (CD 206) participe activement à l'immunité adaptative. Il permet la délivrance d'antigènes internalisés dans des compartiments riches en molécules du CMH de classe II (Sallusto et coll., 1999), de les présenter et d'activer les lymphocytes T CD4⁺ (Engering et coll., 1997; Engering et coll., 1997). CD 206 permet également de présenter de façon croisée des antigènes solubles pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (Burgdorf et coll., 2006 ; Burgdorf et coll., 2007). De façon intéressante, le peptide KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, protéine immunogène extraite de mollusques), fréquemment utilisé comme adjuvant doit, au moins en partie, ses effets immunogènes à une interaction avec le récepteur mannose (Presicce et coll., 2008).

Dans le cas de la phagocytose, la formation d'un compartiment mixte phagosome / reticulum endoplasmique, spécialisé dans la présentation croisée a été proposée. Il contiendrait à la fois les antigènes exogènes, les molécules de CMH-I et l'ensemble de la machinerie nécessaire à l'apprêtement ce qui permettrait de limiter la compétition avec les antigènes endogènes présents en grande quantité dans le cytosol et favoriserait l'induction d'une réponse immunitaire contre une agression extérieure (Guermonprez et coll., 2002 ; Houde et coll., 2003).

b. Les récepteurs TLR

Les récepteurs de type Toll (TLR, Toll Like Receptor) sont des récepteurs reconnaissant des pathogènes. Il existe deux groupes de TLR, l'un présent à la surface des cellules, l'autre intracellulaire (Kawai et Akira, 2005 ; Paulos et coll., 2007).

Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont situés dans la membrane plasmique et reconnaissent des composants de micro-organismes notamment des motifs de la surface de bactéries comme des glycoconjugués de la paroi bactérienne. Les TLR 1, 2 et 6 reconnaissent des lipoprotéines bactériennes. Le TLR 4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram-. Le TLR 5 détecte la flagelline, un constituant du flagelle des bactéries Gram + et Gram -.

Les TLR intracellulaires se trouvent dans des endosomes et reconnaissent des motifs exposés après internalisation et dégradation des microorganismes. L'activation de ces récepteurs se produit dans les endosomes tardifs, compartiments dans lesquels on ne trouve normalement pas les acides nucléiques de l'hôte. Le TLR 3 est spécifique des ARN double brin, les TLR 7 et 8 reconnaissent les ARN viraux simple brin qui sont riches en paires guanine/uracile et le TLR 9 les motifs CpG non méthylés des ADN bactériens et viraux. L'activation de ces récepteurs dans les DC se traduit par le déclenchement d'une réponse immune innée (Napolitani et coll., 2005).

B. Les réponses immunitaires de type Th1 et Th2

Il existe deux types de lymphocytes T qui sont distinguables par l'expression des protéines de surface CD4 et CD8. Ces deux types de cellules ne reconnaissent pas les mêmes molécules CMH, les lymphocytes CD4 reconnaissent les complexes peptide-CMH-II et les CD8 les complexes peptide-CMH-I. Les lymphocytes CD8 sont dits effecteurs. La réponse immunitaire spécifique contre la plupart des antigènes est dépendante des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th).

Après activation, les LT CD4⁺ naïfs se différencient en cellules fonctionnelles de soutien (Th 1 ou 2) selon qu'elles produisent, respectivement, de l'IFN γ ou de l'IL-4. Les cellules Th1 sont essentielles à la protection contre les infections intracellulaires alors que les Th2 protègent de certaines infections extracellulaires (Seder et Ahmed, 2003). Pour la différenciation des Th1, l'interleukine 12 (IL-12) produit par les cellules présentatrices d'antigènes en réponse aux stimulations TLR, agit de concert avec les voies de signalisation et les facteurs de transcription comme STAT4 et T-bet pour produire une réponse Th1 avec la sécrétion d'IFN γ . De la même façon, IL-4, STAT6 et le facteur de transcription GATA-3 sont essentiels au contrôle de la différenciation Th2.

a. La réponse de type Th1

Ce type de réponse est dirigé contre un antigène intracellulaire, comme ceux rencontrés lors d'une infection virale ou d'un processus tumorigène. Les CPA (macrophages ou DC) présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺ sur les molécules du CMH-II. La production d'IL-12 stimule les lymphocytes T CD4⁺ vers une réponse de type Th1.

Les lymphocytes Th1 produisent à leur tour de l'IL-2 et de l'IFN- γ . Ces 2 cytokines stimulent les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que les CPA et amplifient la réponse immunitaire. Bien qu'une réponse primaire CTL puisse exister en absence de lymphocytes T CD4⁺, ceux-ci sont nécessaires à l'établissement d'une réponse mémoire qui permettra un déclenchement immunitaire plus rapide en cas de nouvelle stimulation (Bevan, 2004 ; Harty et Badovinac, 2008).

b. La réponse de type Th2

La réponse Th2 est caractérisée par une étroite collaboration entre les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes B dans la lutte contre le même antigène. Les lymphocytes B jouent un rôle prépondérant en tant que CPA. Lors d'une réponse de type Th2, les lymphocytes T CD4⁺ produisent les interleukines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 et favorisent la commutation de classe et la production d'anticorps (Seder et Ahmed, 2003).

III_ Vaccination contre le mélanome

Un cas de régression complète et spontanée de mélanome a été observé, mais le mécanisme en reste inconnu (King et coll., 2001). Dans la plupart des cas, la régression des mélanomes est corrélée à une infiltration de cellules immunitaires et en particulier de lymphocytes T cytotoxiques capables de détruire les cellules tumorales. En 1988, Itoh et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer l'activité cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales, de lymphocytes T infiltrés prélevés sur des patients atteints de mélanome (Itoh et coll., 1988).

Plusieurs stratégies de vaccination anticancéreuse sont mises en œuvre pour stimuler ce type de cellules. Il faut distinguer la vaccination préventive pour prémunir contre le développement d'une pathologie, c'est le cas du vaccin contre le papillomavirus humain, de la vaccination thérapeutique qui a pour but d'éradiquer les cellules tumorales chez les patients (Koutsky et coll., 2002).

La vaccination consiste à introduire un agent extérieur (le vaccin) dans un organisme vivant afin de créer une réaction immunitaire positive contre une maladie. Le principe actif d'un vaccin est un antigène destiné à stimuler les défenses naturelles de l'organisme, le système immunitaire. Le vaccin préventif a pour objectif d'éduquer le système immunitaire pour qu'il reconnaisse un pathogène avant l'apparition de symptôme et qu'il puisse l'éliminer définitivement. Le vaccin thérapeutique est lui administré dans un contexte pathologique. Les acteurs principaux de la réponse immunitaire sont les anticorps, les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques.

Le mélanome est un cancer très étudié d'une part parce que les cellules cancéreuses issues de biopsies de mélanome sont faciles à prélever, les tumeurs primaires étant cutanées, à cultiver et à immortaliser. D'autre part, il existe pour ce type de cancer à la fois des modèles bien caractérisés comme le modèle murin B16F10 et des modèles de mélanome spontanés chez la souris qui permettent l'étude de la progression tumorale et de la formation de métastases (Poste et coll., 1982 ; Cruz-Munoz et coll., 2008 ; Dankort et Curley, 2009). Ceci en fait un modèle de choix pour la vaccination anticancéreuse.

L'analyse des résultats de vaccination thérapeutique contre le mélanome réalisées entre 1995 et 2004 par l'Institut National du Cancer des Etats-Unis d'Amérique (NCI : National Cancer

Institute) a révélé un taux de réponse global de 3% quel que soit le type d'antigène utilisé sous forme de peptides administrés directement, de virus ou de cellules dendritiques. Cependant, un des problèmes de regroupement des résultats des différentes études est que dans certains cas, les critères d'évaluation des réponses cliniques ne sont pas précis (arrêt temporaire de croissance, disparition des symptômes, nécrose tumorale, maladie stable, survie plus longue que prévu) et non une réponse objective. Les essais de vaccination anti-mélanome en utilisant des épitopes peptidiques des antigènes MART-1, gp100 et tyrosinase chez des patients atteints de mélanome de stade métastatique ont été un échec. De même, les essais par thérapie génique en utilisant des virus codant ces antigènes n'ont pas permis d'obtenir de réponses satisfaisantes. Enfin, un très faible nombre de patients a répondu après traitement avec des cellules tumorales modifiées (corps apoptotiques ou lysats cellulaires) ou des cellules dendritiques stimulées avec différentes formes d'antigènes (Rosenberg et coll., 2004).

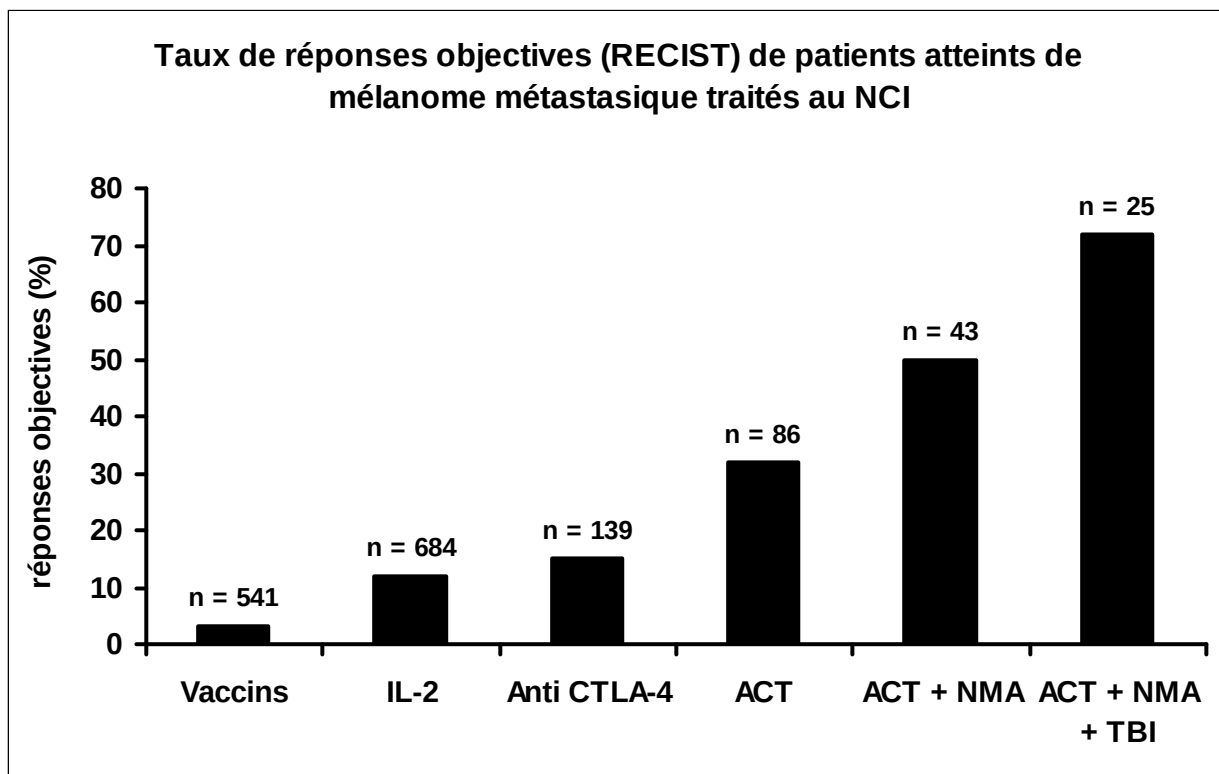


Figure 9 : Pourcentages de réponses objectives de patients traités avec différents modes de vaccination aux Etats-Unis entre 1995 et 2004. RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, réponses objectives des tumeurs solides, n : nombre de patients traités, ACT : Adoptive Cell Transfer / transfert adoptif de lymphocytes, NMA : Non Myelo Ablative : traitement lymphodépiléatif, TBI : Total Body Irradiation / Irradiation. Adapté de (Rosenberg et Dudley, 2009).

La figure 9 compare les succès de différents protocoles de vaccination contre le mélanome en administrant soit :

- de l'IL-2 ou des anticorps anti-CTLA-4 (antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques).
- des antigènes : peptides, protéines ou acides nucléiques codant un antigène tumoral.
- des cellules immunes : réinjection de lymphocytes autologues amplifiés et activés *ex vivo*.

Les résultats indiquent que l'administration d'antigènes, d'IL-2 ou d'anticorps anti-CTLA-4 est peu efficace. La vaccination de patients atteints de mélanome métastatique avec des antigènes définis a entraîné des réponses favorables chez une minorité de patients (5-10%) (Boon et coll., 2006). Par contre, l'administration de lymphocytes autologues (ACT pour Adoptive Cell Transfer) avec ou sans traitement lymphodépresseur (NMA : Non Myelo Ablative, lymphodépresseur chimique ; TBI : Total Body Irradiation, lymphodépresseur par irradiation) montre de meilleurs résultats (50-72%) (Rosenberg et Dudley, 2009).

L'irradiation est utilisée comme traitement destructeur des cellules cancéreuses, il faut cependant noter que cette thérapie agressive a également un effet délétère sur les cellules du système immunitaire. En effet, Liao et coll. ont montré que l'irradiation de mélanomes B16 empêche le développement d'une réponse immune dirigée contre l'antigène MART-1 dans un modèle murin (Liao et coll., 2009).

Malgré de bons résultats préliminaires, très peu de vaccins se révèlent efficaces du fait de la résistance des cellules de mélanome à l'apoptose (Ivanov et coll., 2003 ; Yang et coll., 2006 ; Chouaib et coll., 2009). Cette résistance importante des cellules cancéreuses en général a entraîné l'échec des tests de phase III de 13 vaccins anti-cancer contre mélanome, cancer colorectal, cancer du sein, cancer du pancréas, lymphome et cancer de la prostate (Berinstein, 2009). Les mécanismes de résistance à l'apoptose font l'objet de cibles chimio-thérapeutiques et des molécules mimétiques d'activateurs de l'apoptose sont maintenant utilisées pour lever cette résistance à l'apoptose et permettre d'augmenter l'efficacité des traitements (Dai et coll., 2009).

A. Vaccination par thérapie cellulaire

a. cellules dendritiques

De nombreuses approches vaccinales anticancéreuses par thérapie cellulaire utilisent les cellules dendritiques (DC) pour présenter les antigènes et stimuler une réponse immune vis-à-vis des cellules cancéreuses, principalement des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, Bringmann et coll., 2010).

Trois types de DC sont couramment utilisés :

- les MoDC de phénotype $CD14^+/CD11c^+/CD123^-$ qui sont des DC générées *ex vivo* à partir des monocytes circulants du patient.
- les DC circulantes du patient, de phénotype $CD14^-/CD11c^+/CD123^-$.
- les DC $CD34^+$ générées *ex vivo* à partir des cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ prélevées au patient.

Les MoDC sont les plus utilisées car les plus faciles à obtenir en grande quantité (100-150 10^6 cellules par prélèvement de Leucocytes) alors que la différenciation est plus difficile à partir de DC circulantes ou de cellules $CD34^+$. A partir de la littérature, il est cependant difficile d'établir quel type de ces DC est préférable pour la thérapie cellulaire (Aarntzen et coll., 2008 ; Ballestrero et coll., 2008 ; Lesterhuis et coll., 2008). De plus, les MoDC présentent une activité immunitaire sans différenciation préalable en DC avant contact avec les antigènes. En effet, le vaccin sipuleucel-T (Provenge) constitué de monocytes autologues, activés après prélèvement par des protéines chimères GM-CSF / phosphatase acide de la prostate, a montré une augmentation de la survie de patients atteints de cancer de la prostate de 33% par rapport au groupe contrôle après un suivi de trois ans (Higano et coll., 2009). Cette thérapie est maintenant approuvée par l'autorité de régulation des drogues des Etats-Unis d'Amérique et représente la première immunothérapie validée comme traitement contre le cancer (Drake, 2010).

Après prélèvement et amplification, les DC sont activées *ex vivo* avec des peptides ou des protéines antigéniques ou bien transfectées avec des acides nucléiques codant les antigènes tumoraux (Granucci et coll., 2005 ; Lesterhuis et coll., 2008 ; Engell-Noerregaard et coll., 2009 ; Van Nuffel et coll., 2010).

L'utilisation de peptides et de protéines ne permet pas de réponses immunes maximales d'une part parce que ces produits sont rapidement dégradés et, d'autre part parce qu'ils ne donnent des réponses que chez les patients possédant les cellules lymphocytaires avec les complexes peptide-CMH adéquats. Pour ces raisons, l'utilisation d'acides nucléiques qui permet la génération de tous les épitopes après transfection est préférée (Polak et coll., 2009).

Les DC sont efficacement transfectées avec des vecteurs viraux. En particulier, les lentivirus dérivés du VIH (Virus d'Immunodéficience Humain) ou du VIS (Virus d'Immunodéficience Simien) ont un tropisme naturel pour les DC (Chang, 2010). Ils peuvent transduire 50% des DC immatures. Les DC génétiquement modifiées gardent leur capacité de maturation et restent phénotypiquement identiques aux DC non modifiées sans que leur viabilité ne soit affectée (Gruber, 2000). Cependant, l'utilisation de ce type de vecteur présente deux risques majeurs. Le premier étant l'intégration dans une région entraînant l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Gunter et coll., 1993 ; Hacein-Bey-Abina et coll., 2003). Le second

est le développement indésirable d'une réponse antivirale par la présentation d'antigènes du vecteur à la surface des DC infectées.

Des approches de transfection non virale sont préférables pour des problèmes de sécurité et de coût de production liés aux vecteurs viraux. L'électroporéabilisation avec de l'ARNm permet de transfecter 90-95% des DC (Weissman et coll., 2000 ; Van Tendeloo et coll., 2001 ; Landi et coll., 2007 ; Yamamoto et coll., 2009).

Ces résultats montrent donc une plus forte efficacité de transfection des cellules dendritiques avec l'ARNm.

Bien que plusieurs validations de ces approches *ex-vivo* aient été obtenues dans des modèles murins où il a été possible d'éradiquer des tumeurs de 1cm³ après injection de DC chargées avec des peptides tumoraux, les réponses cliniques de vaccination contre le mélanome avec des DC, ne dépassent pas 5-10% (Zhang et coll., 2007 ; Lesterhuis et coll., 2008). En vaccinant plus de 200 patients avec des DC activées avec des peptides d'antigènes tumoraux, Aarntzen et ses collaborateurs ont remarqué que les réponses n'avaient jamais lieu chez les individus à forte charge tumorale, à forts taux de LDH (Lactate DesHydrogénase), avec des métastases dans le cerveau ou avec des cancers à évolution rapide (Aarntzen et coll., 2008). Le taux de réponse (SD = stable disease, maladie stable) était de 10-15% sur 1 an, des réponses immunes ont été obtenues chez 60% des malades avec des cancers localisés et chez 30% des patients avec des cancers métastatiques.

Après transfection *ex vivo*, les DC sont injectées aux patients selon différentes voies à savoir intraveineuse, intradermique, intraganglionnaire et sous-cutanée. Lesterhuis et coll. ont regroupé tous les résultats de thérapie cellulaire avec cellules dendritiques pour comparer statistiquement les protocoles utilisés (Lesterhuis et coll., 2008). Selon eux, bien que plusieurs auteurs affirment que certaines voies d'injection des DC sont supérieures à d'autres pour l'induction de réponses immunes, ce résultat n'est pas démontré statistiquement.

La plupart des DC injectées restent au site d'injection et seulement 1% migrent vers les ganglions drainants chez l'Homme, migration nécessaire à la stimulation de lymphocytes (De Vries et coll., 2003 ; De Vries et coll., 2005). Les auteurs ont rapporté que moins de 4% de DC avaient migré vers les ganglions des patients après injection intradermique de DC marquées avec ¹¹¹In. Selon Aarntzen et collaborateurs, la plupart des DC injectées meurent par nécrose et apoptose après administration. De plus, le suivi de cellules dendritiques marquées avec des particules de fer superparamagnétiques ou de l'iridium a montré qu'après leur injection dans les ganglions de patients atteints de mélanome, seulement 50% étaient réellement dans les ganglions (De Vries et coll., 2005 ; Aarntzen et coll., 2008).

Enfin, Yewdall et coll. ont montré récemment que chez la souris, la stimulation d'une réponse immune après injection de DC pulsées avec des peptides, exigeait le transfert des antigènes aux DC endogènes (Yewdall et coll., 2010).

Une régression efficace et stable chez des patients atteints de mélanomes a été observée avec une absence de résurgence du cancer durant plusieurs années. Ces patients ont été traités avec des cellules dendritiques obtenues par différenciation de monocytes circulants autologues en présence de GM-CSF et d'IL-4 puis activées avec des peptides MART-1. Cependant, de tels succès n'ont été observés que pour deux patients sur les vingt-cinq que comprenait l'effectif vacciné, révélant encore une fois la difficulté à obtenir une régression des cancers (Ray et coll., 2009).

Les chercheurs du Baylor Institute for Immunology Research dirigé par le Docteur Jacques Banchereau ont obtenu de meilleurs résultats en vaccinant des patients atteints de mélanome avec des cellules dendritiques autologues chargées avec le peptide adjuvant KLH et des peptides de quatre antigènes de mélanome (MART-1, tyrosinase, MAGE-3 et gp 100). Certains patients ont développé seulement des réponses CTL spécifiques et d'autres des réponses cliniques. Il est intéressant de noter que les patients qui n'avaient pas déclenché de réponse immune n'ont pas développé de réponse clinique. Cependant, le chargement des DC avec des peptides a entraîné sa restriction allélique ; c'est pourquoi cet Institut a démarré un autre essai clinique dans lequel les DC autologues sont stimulées par des lysats de cellules de mélanome.

Les limites des efficacités cliniques des essais présentés doivent toutefois être tempérés par le fait que la plupart des essais cliniques ont été faits sur des patients ayant des tumeurs métastatiques mesurables et ayant déjà subi de lourds traitements (Ballestrero et coll., 2008).

b. Transfert adoptif de lymphocytes

Il a été montré une relation entre la présence de lymphocytes T infiltrés (Tumor Infiltrated Lymphocytes, TIL), la survie des patients et les réponses cliniques (Robbins et coll., 2004 ; Pages et coll., 2005 ; Zhou et coll., 2005 ; Mihm et coll., 1996). De plus, une orientation vers un profil Th1 est associée à un plus faible risque de récurrence, les lymphocytes T étant capables de détruire les cellules cancéreuses et de se différencier en cellules mémoires (Disis et coll., 2009).

Le transfert adoptif de lymphocytes (ACT, Adoptive Cell Transfer) a été utilisé en 1988 pour la première fois et amélioré en 2002 en l'associant à une lymphodéplétion (Rosenberg et coll., 1988 ; Dudley et coll., 2002).

Dans 50% des cas, les patients atteints de mélanome métastatique dont les tumeurs ont résisté aux autres traitements ont eu des réponses positives. Le transfert de CTL dirigés contre l'antigène MART-1 a entraîné des régressions. Des lymphocytes infiltrés dirigés contre des antigènes de mélanome sont détectés chez 80% des patients (Dudley et coll., 2003). Chez ces

patients, les lymphocytes doivent être présents en nombre suffisant pour être prélevés puis cultivés. Les lymphocytes infiltrés sont prélevés puis amplifiés et activés *ex vivo* avant réinjection. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque leur administration est réalisée après un traitement lymphodépresseur. Il reste cependant que 20% des patients n'ont pas de lymphocytes infiltrés.

Lonchay et coll. ont montré que, bien que la fréquence des lymphocytes T spécifiques augmente après vaccination, ceci n'est pas toujours corrélé à un rôle effecteur de ces cellules dans la régression tumorale (Lonchay et coll., 2004). Ils ont montré que d'autres lymphocytes T tumeur-spécifiques présents avant la vaccination étaient plus augmentés après vaccination que les cellules contre lesquelles le vaccin était destiné. Selon leur hypothèse, les lymphocytes T stimulés par le vaccin interagiraient avec la tumeur et permettraient aux autres lymphocytes T de devenir actifs et prolifératifs. L'augmentation des fréquences de lymphocytes T spécifiques résultant de la vaccination peut donc entraîner la régression tumorale de façon directe ou indirecte.

Le phénotype des LT injectés est important. Les cellules CD7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD62L⁺ (type LT mémoire centraux) sont plus efficaces que des LT plus différenciés ayant perdu ces marqueurs. Il a aussi été mis en évidence que les LT ayant les plus longs télomères étaient les plus efficaces. Les TIL ne sont pas des populations clonales de lymphocytes T mais des populations très hétérogènes comprenant à la fois des cellules très réactives et d'autres non. La compréhension des caractéristiques des sous-populations qui les composent pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des vaccinations directes ou par transfert adoptif (Oved et coll., 2009).

Le problème inhérent au transfert adoptif est la standardisation : en effet, ce traitement est hautement personnalisé, demande du temps et un grand savoir faire. Le traitement de chaque patient est différent et un nouveau réactif est créé pour chaque patient. Le transfert de TIL n'est pas toujours possible car ces cellules n'existent que chez certains patients. De plus, leur identification et leur culture *ex vivo* restent difficiles (Rosenberg et coll., 2008 ; Rosenberg et Dudley, 2009).

Il apparaît que pour une thérapie efficace par transfert de TIL, les populations injectées doivent posséder des lymphocytes spécifiques d'antigènes du cancer. Kawakami et col. ont montré un lien entre l'efficacité du traitement et la présence de lymphocytes spécifiques de gp100 parmi les cellules administrées (Kawakami et coll., 1995). D'autres résultats semblent indiquer que la persistance à long terme (un mois) des lymphocytes transférés serait nécessaire pour permettre des régressions (Zhou et coll., 2005). Yee et ses collègues ont transféré des lymphocytes T activés provenant des cellules leucocytaires circulantes de patients atteints de mélanome (Yee et coll., 2002). Ces lymphocytes ont été stimulés par des cellules dendritiques autologues activées avec des épitopes peptidiques des antigènes gp 100 ou MART-1. Après trois étapes de stimulation à une semaine d'intervalle, les lymphocytes spécifiques des antigènes ont été clonés et amplifiés avant leur administration avec de l'IL-2. L'administration d'IL-2 a prolongé la durée de vie des

lymphocytes infiltrés. Ce traitement a permis de freiner la progression des mélanomes chez quelques patients. L'administration de lymphocytes spécifiques des antigènes gp 100 et MART-1 a donné lieu à une sélection des cellules composant les tumeurs. Pour trois patients, il a été mis en évidence une perte d'expression des antigènes MART-1 et gp 100 mais pas de l'antigène tyrosinase, autre antigène de mélanome contre lequel la vaccination n'était pas dirigée (Fig. 10).

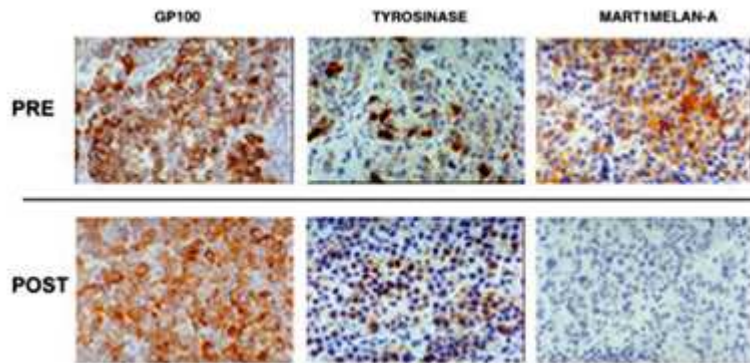


Figure 10 : Analyse immunohistochimique de l'expression des antigènes des protéines gp100, tyrosinase et MART-1 avant (PRE) et après (POST) administration de lymphocytes T activés avec les antigènes gp 100 et MART-1 chez un patient atteint de mélanome (Yee et coll., 2002).

Ce résultat montre que l'administration de lymphocytes spécifiques n'est pas suffisante pour obtenir une régression durable.

L'amplification de TIL à partir d'une tumeur prend 6-8 semaines, et nécessite un grand investissement logistique qui exclurait les patients les plus fragiles ou à stade avancé (Klapper et coll., 2009). En effet, Prieto et coll. ont mis en évidence le développement de métastases chez quelques patients durant ce délai lors d'un traitement de transfert adoptif de lymphocytes et ont exclu ces patients de l'étude clinique (Prieto et coll., 2010). Dreno et coll. et Labarrière et coll. ont montré dans le cas de mélanomes de stade III que l'efficacité du transfert adoptif dépendait du nombre de ganglions infectés, montrant ainsi un lien entre progression cancéreuse et efficacité du traitement (Dreno et coll., 2002 ; Labarriere et coll., 2002).

Enfin, l'administration de TIL pourrait ne pas suffire à entraîner une régression chez des patients atteints de mélanome. Rosenberg et coll. ont vacciné par voie sous-cutanée des patients atteints de mélanome avec 1 mg de peptides gp 100 et tyrosinase en présence de l'adjuvant de Freund (Rosenberg et coll., 2005). Ils ont mis en évidence l'induction de lymphocytes spécifiques des antigènes mais il n'y avait pas de différence dans les quantités de lymphocytes induits pour les patients chez lesquels la maladie a progressé et pour ceux chez lesquels elle n'a pas progressé ce qui montre que la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de mélanome ne suffit pas à la stabilisation de ce type de cancer et à des régressions cliniques. L'absence de réponse clinique

pourrait signifier que les lymphocytes dirigés contre des antigènes de mélanome n'ont peut-être pas eu accès à la totalité de la tumeur.

Ces deux approches de thérapie cellulaire (lymphocytes ou cellules dendritiques) conduisent à des traitements personnalisés difficilement généralisables et nécessitent une logistique lourde avec prélèvement de cellules, amplification, activation, procédures avec de nombreuses opportunités de contamination et difficilement applicables dans les pays peu développés ou en voie de développement.

c. Exosomes

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires sécrétées par plusieurs types cellulaires après fusion d'endosomes tardifs / lysosomes avec la membrane plasmique. Les cellules présentatrices d'antigènes comme les lymphocytes B et les DC sécrètent des exosomes avec des molécules CMH I et II qui stimulent la prolifération de lymphocytes T *in-vitro*. Ces vésicules sont utilisées comme vaccin (Zitvogel et coll., 1998 ; Denzer et coll., 2000). Cependant, celles-ci souffrent des mêmes limites de production que les vaccins cellulaires à savoir le besoin d'une unité de production dédiée possédant du personnel qualifié et un coût important (Viaud et coll., 2010).

d. Cellules de mélanome

Pour la vaccination, des cellules tumorales dont la prolifération a été rendue impossible par irradiation sont également employées. En effet, celles-ci contiennent des antigènes tumeur-spécifique. L'injection de cellules autologues de mélanome irradiées a permis l'induction de réponses immunes mais sans augmenter la survie des patients de la cohorte vaccinée (Morton et Foshag, 1992 ; Faries et Morton, 2005).

Des lysats de cellules de mélanome ont également été employés sans bénéfice clinique (Sondak et Liu, 2002).

B. Vaccination directe

a. Peptides et protéines

De nombreux antigènes de mélanome sont connus. Les séquences de leurs gènes, de leurs protéines ainsi que les épitopes peptidiques dominants ont été identifiées (Tableau 2 p21). Par exemple, dans le cas de l'antigène MART1/Melan-A, la séquence peptidique immunodominante de reconnue chez les patients est localisée dans le domaine transmembranaire de la protéine ce qui limite la diversité de séquence (Zippelius et coll., 2002). Cette protéine est une protéine transmembranaire de type III de 118 acides aminés (13 kDa). Elle se localise principalement au niveau du réticulum endoplasmique et du réseau transgolgien du mélanocyte. Les séquences de ses

épitopes immunodominants chez l'Homme et la souris sont présentées en figure 11. La comparaison des séquences protéiques chez l'Homme (hMART-1) et la souris (mMART-1) montre une identité de séquence de 69% et un épitope immunodominant (résidus 26 à 35) qui se situe essentiellement dans la partie transmembranaire (TM) et ne varie que d'un acide aminé entre les deux espèces.

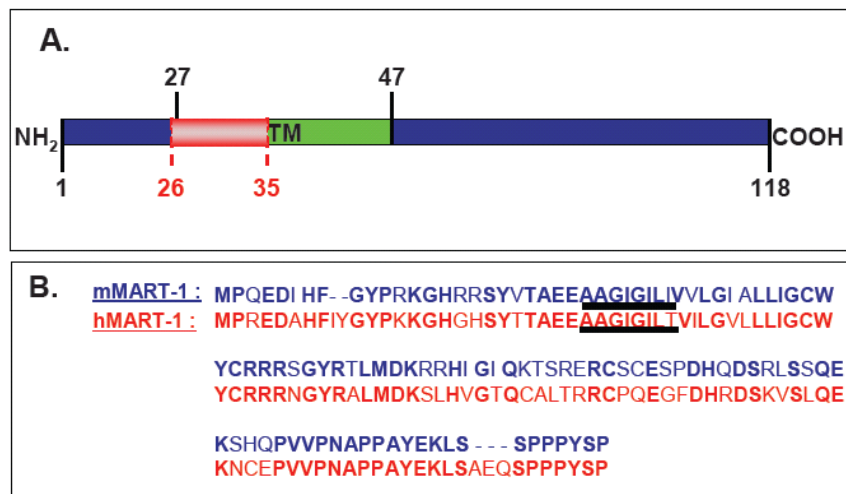


Figure 11 : Séquence des épitopes immunodominants de l'antigène MelanA/MART-1 chez l'Homme et la souris.

Les épitopes peptidiques sont spécifiques pour les patients possédant les mêmes restrictions alléliques du système HLA (Talebi et Weber, 2003 ; Terando et coll., 2007). Les antigènes utilisés sont reconnus par des lymphocytes T ayant échappé à la sélection négative. Ces types de lymphocytes sont généralement activés par des variants d'épitopes optimisés (Slansky et coll., 2000). Une étude des résultats de vaccination anti-mélanomes avec des peptides MART-1, gp 100, tyrosinase, gp 209 ou NY-ESO 1, réalisés à l'Institut National du Cancer aux Etats-Unis entre 1995 et 2004 montre que seulement deux régressions pour plus de 300 patients vaccinés ont été obtenues (Tableau 4) (Rosenberg et coll., 2004).

Tableau 4 : Réponses cliniques observées lors de vaccinations avec des peptides contre le mélanome.

Peptide	Restriction HLA	Nombre de patients	Réponses cliniques
MART1 ₂₇₋₃₅	A2	23	0
MART1 ₂₇₋₃₅ + IL-12	A2	12	0
MART1 ₂₆₋₃₅ (27L)	A2	6	0
TRP-2 ₁₈₀₋₁₈₈	A2	20	0
gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	A2	9	1
gp100 _{209-217(210M)} ^a	A2	32	0
gp100 _{209-217(210M)} + IL-12	A2	28	0
gp100 _{209-217(210M)} + GM-CSF	A2	18	0
gp100 ₂₈₀₋₂₈₈	A2	9	0
gp100 _{280-288(2889V)} ^b	A2	5	0
gp100 ₁₅₄₋₁₆₂	A2	10	0
g209-2M, g280-9V, MART-27L ^c + tyr3D ^d	A2	16	0
gp100 ₄₄₋₅₉	DR4	4	0
gp100 ₄₄₋₅₉ + g209-2M + MART-27L	A2/DR4	22	1
Tyrosinase ₂₄₀₋₂₅₁	A1	16	0
gp100 ₁₇₋₂₅	A3	12	0
Tyrosinase ₂₀₆₋₂₁₄	A2	8	0
TRP-1 ORF1-9	A31	5	0
MAGE-12 ₁₇₀₋₁₇₈	Cw7	9	0
NY-ESO-1 _{157-165(165V)}	A2	19	0
NY-ESO-1 ₁₆₁₋₁₈₀	DP4	6	0
NY-ESO-1 _{161-180 + 157-165(165V)}	A2/DP4	11	0
Her2/neu ₃₆₉₋₃₇₈	A2	6	0
Téломérase ₅₄₀₋₅₄₈	A2	13	0
Cellules dendritiques + g209-2M + MART-27L	A2	15	0
Total		334	2

(a) g209-2M, (b) g280-9V, (c) MART-1₂₆₋₃₅ (27L), (d) Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ (370D)
Adapté de (Rosenberg et coll., 2004).

Récemment, l'administration du peptide gp100 (209-217 avec substitution d'une thréonine par une méthionine en position 210 (210M) pour augmenter l'immunogénicité) et IL-2 a permis d'obtenir une bonne stimulation immunitaire chez des patients atteints de mélanome (Anderson, 2009). Selon les auteurs, ce vaccin ne permettrait de traiter que 50% des patients atteints de mélanome. Dans une autre étude, Lee et coll. ont induit une réponse immunitaire chez 91% des patients atteints de mélanome vaccinés avec le peptide gp100 (Lee et coll., 1998). Cependant, aucun d'entre eux n'a développé de réponse clinique. Suite à ces résultats, les chercheurs de l'Institut du Cancer de l'Université de Pittsburgh ont démarré un essai clinique (NCT 0047 1471) avec un vaccin constitué des trois peptides différents MART1₂₇₋₃₅, gp100_{209-217 (210M)} et tyrosinase en présence du GM-CSF (facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages) et d'un

oligodésoxynuléotide CpG 7909 (activateur du récepteur TLR9), le tout administré dans l'adjuvant de Freund incomplet (émulsion de bactéries inactivées).

Cette absence de réponse clinique malgré la présence d'une stimulation de la réponse immunitaire pourrait être due à la présence de lymphocytes T régulateurs dans la tumeur. Les Treg (pour T régulateurs) suppriment les LT CD4⁺ et les NK, empêchent l'activation et la prolifération des LT CD8⁺ (Wang, 2008). Cette inhibition est due à la fois à la destruction de cellules T par contact et à une production de cytokines (Sakaguchi et coll., 2010). Les Treg produisent du TGF- β , de l'IL-10 et expriment CTLA-4, GITR, TNFR et Foxp3. Ils jouent un rôle important dans la prévention des maladies auto-immunes et leur nombre augmente avec la progression tumorale (Zou, 2006 ; Kryczek et coll., 2007 ; Liu et coll., 2007).

L'expansion des Treg et leur présence au sein de la tumeur nuit au bon fonctionnement des lymphocytes T effecteurs ce qui empêche une immunité anti-tumorale efficace (Liyanage et coll., 2002 ; Allan et coll., 2004). En effet, une analyse des tumeurs de plus de 300 patients atteints de cancer du foie a montré une corrélation entre les chances de survie des patients ayant une faible quantité de Treg et une forte quantité de CTL par rapport à ceux ayant beaucoup plus de Treg et peu de CTL (Gao et coll., 2007).

L'utilisation conjointe d'anticorps anti-CTLA-4 qui permettent une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs a permis d'augmenter l'efficacité des vaccinations (Sanderson et coll., 2005). Le traitement de patients atteints de mélanome avec des anticorps anti-CTLA-4 administrés par voie intraveineuse en combinaison avec des peptides gp100 a permis à la fois d'augmenter la survie des patients et des régressions cliniques (2 patients sur 21 ; Phan et coll., 2003 ; Hodi et coll., 2010). Ceci montre le bénéfice clinique de la levée de l'immunosuppression tumorale avec pour contrepartie l'apparition de réactions auto-immunes.

Récemment, Cho et Celis ont publié une étude très prometteuse chez l'Homme avec un vaccin peptidique administré avec des adjuvants (Cho et Celis, 2009). L'administration conjointe de 200 μ g de peptides TRP2₁₈₀₋₁₈₈ plus 50 μ g d'anticorps monoclonal anti-CD40 (activateur des CPA) et un ligand des récepteurs TLR (poly I : C) a permis d'observer que 80% des lymphocytes T CD8⁺ circulants étaient spécifiques de l'antigène et a entraîné la régression de métastases pulmonaires dans le modèle murin de mélanome B16F10. Leurs résultats et notamment les différences observées entre les groupes ayant reçu du poly I : C, du LPS ou des oligonucléotides CpG comme adjuvant montrent la nécessité d'utiliser des adjuvants efficaces lors de la vaccination avec des peptides. Enfin, ils ont observé de bien plus faibles régressions de métastases B16F10 lors de l'administration du vaccin par voie sous-cutanée que par voie intraveineuse, révélant l'importance de la voie d'administration.

b. Vaccination génique : ADN ou ARNm

L'utilisation de vaccins peptidiques ou protéiques nécessite la sélection des patients possédant le système HLA adéquat. Les acides nucléiques ADN et ARNm permettant la production de tous les épitopes des antigènes sont moins restrictifs. De plus, l'utilisation de protéines et peptides est limitée par le coût et la difficulté de leur production en conditions GMP (Good Manufacturing Practices, conditions de production de préparations médicamenteuses), coût et difficulté qui sont moins importants pour les acides nucléiques (Rosenberg et coll., 2003 ; Williams et coll., 2009). Les thérapies avec acides nucléiques, thérapies géniques, sont soumises à des contrôles stricts tant du point de vue de la pureté des préparations pharmaceutiques, de la conformité des laboratoires et du suivi à long terme des patients, qui sont énoncés dans le code de la santé publique et notamment dans l'article L5121-1.

ADN nu

Plusieurs vaccins ADN ont permis d'obtenir une stimulation de la réponse immune vis-à-vis des cellules tumorales (Kutzler et Weiner, 2008 ; Stevenson et coll., 2010).

Tagawa et ses collaborateurs ont administré à des patients atteints de mélanome de façon intranodale, 200µg, 400µg ou 800µg d'ADN plasmidique codant la tyrosinase. Les injections ont été réalisées quatre fois à 14 jours d'intervalle. La présence de lymphocytes spécifiques de la tyrosinase a été mise en évidence chez 11 des 26 patients traités mais sans jamais induire de réponse clinique (Tagawa et coll., 2003).

Yuan et coll. ont administré par voie intramusculaire de l'ADN codant gp100 et montré l'induction de lymphocytes T CD8⁺ chez cinq patients sur 18, stimulation immunitaire sans bénéfice clinique (Yuan et coll., 2009).

Lorsque des patients atteints de mélanome ont reçu par voie intradermique ou intramusculaire quatre injections d'1 mg d'ADN plasmidique codant gp 100 (avec deux injections au même site de 0.5 mg d'ADN en intramusculaire ou cinq injections de 0.1 mg à des sites différents en intradermique) aucune réponse immunitaire ou clinique n'a été observée (Rosenberg et coll., 2003). Cette équipe avait pourtant montré que l'administration de ce plasmide était capable d'induire une réponse immunitaire de type anticorps et cellulaire dans un modèle murin et même de protéger les souris vaccinées contre le développement du mélanome B16. Une absence de réponses immunitaire et clinique a également été observée après injection d'ADN plasmidique codant MART-1 à des patients atteints de mélanome alors que ces mêmes plasmides stimulaient une réponse immune chez la Souris (Tiozzi et coll., 2005).

La différence de résultats entre l'animal modèle et le patient révèle la nécessaire prudence avec laquelle les résultats obtenus chez des animaux de laboratoire doivent être transposés à l'Homme.

ARNm

L'utilisation de l'ARN messager codant l'antigène tumoral présente des avantages par rapport à celle de l'ADN. L'ARNm est exempt de séquences bactériennes, il est composé uniquement de la séquence codante, d'une coiffe en 5' et d'une queue polyadénosine en 3'. Il ne possède pas de séquence promotrices. Il est obtenu par transcription *in vitro*, ce qui élimine le problème de contamination par l'ADN bactérien et/ou plasmidique après un traitement par DNase. De plus, l'expression de l'antigène nécessite qu'il soit uniquement délivré dans le cytosol des cellules présentatrices d'antigènes et ne nécessite pas de pénétration nucléaire contrairement à la transfection ADN. Les cellules dendritiques sont des cellules quiescentes, difficiles à transfecter avec des plasmides ADN. A l'exception des lentivirus, de 1 à 10% des cellules dendritiques sont transfectées avec l'ADN contre 95% dans le cas de l'ARNm (Yamamoto et coll., 2009).

Landi et coll. ont comparé l'efficacité de transfection par électroporéabilisation de cellules dendritiques immatures obtenues par différenciation de cellules mononuclées circulantes humaines avec ADN et ARNm (Landi et coll., 2007). En utilisant un plasmide et un ARNm codant la GFP, ils ont pu mesurer qu'après 8h post-transfection, 57% des cellules étaient transfectées en utilisant l'ADN contre 98% en utilisant l'ARNm.

Strobel et coll. ont montré qu'en utilisant des liposomes cationiques (TransFast, DAC30 et DMRIE-C), la transfection de cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes était également plus efficace avec l'ARNm qu'avec l'ADN plasmidique (Strobel et coll., 2000). De plus, les cellules dendritiques transfectées avec ARNm se sont révélées être de meilleures stimulatrices de lymphocytes T spécifiques de l'antigène que celles transfectées avec l'ADN.

Comme l'ADN, l'ARNm d'un antigène permet de générer tous les épitopes de l'antigène ce qui abolit la restriction allélique inhérente aux vaccins peptidiques (Pascolo, 2004).

Cellules dendritiques transfectées avec l'ARNm

approche *ex-vivo*

La grande majorité des essais cliniques pour lesquels les antigènes ont été utilisés sous forme d'ARNm, ont été réalisés avec des cellules dendritiques autologues transfectées avec de l'ARNm puis ré-administrées aux patients après culture *ex-vivo*. La transfection de MoDC par de l'ARNm codant l'épitope immunodominant pp65 du cytomegalovirus humain a permis la stimulation de lymphocytes CD4 et CD8 prélevés à des patients (Holtkamp, 2006).

Le groupe d'Elil Gilboa a été le premier à démontrer un effet protecteur contre le développement de métastases pulmonaires dans le modèle murin de mélanome B16, en utilisant des cellules dendritiques transfectées avec de l'ARNm issu de tumeurs de mélanomes (Boczkowski et coll., 1996).

Kyte et coll. ont montré que l'injection de cellules dendritiques autologues transfectées avec des ARNm totaux de tumeurs autologues était capable d'induire la prolifération de lymphocytes T circulants chez les patients avec une sécrétion d'IFN- γ (Kyte et coll., 2005). La même équipe a utilisé cette approche dans un essai de phase I/II et obtenu une stimulation de la réponse immune sans toutefois observer de bénéfice clinique (Kyte et coll., 2006).

Schuurhuis et coll. ont déclenché chez des patients atteints de mélanome des réponses cytotoxiques après administration de DC électroporées avec des ARNm gp100 ou tyrosinase (Schuurhuis et coll., 2009).

approche *in-vivo*

Parmi tous les essais cliniques répertoriés par l'Institut National de la Santé et l'Institut National du Cancer des Etats Unis d'Amérique (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>) et ceux listés sur le site gene therapy clinical trials worldwide (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>), seuls quelques-uns, administrent aux patients de l'ARNm sous forme libre ou complexée.

ARNm nu

Hoerr et coll. ont comparé chez la souris les capacités de stimulation d'une réponse adaptative de l'ARN messenger transcrit *in vitro* et stabilisé en 3' et 5' par les séquences non transcrites de la β -galactosidase de Xénope administré soit sous forme nue, sous forme condensée avec la protamine ou sous forme de complexes ternaires ARNm / protamine / liposomes Unifectin (Hoerr et coll., 2000). Toutes ces formulations ont permis l'induction de réponses cellulaire et humorale.

Carralot et coll. ont montré les capacités de stimulation immunitaire d'ARNm nu codant un antigène de mélanome dans un modèle murin (Carralot et coll., 2004 ; Carralot et coll., 2005). Le groupe de Steve Pascolo a été pionnier dans l'administration d'ARNm nu contre le mélanome en réalisant le premier essai clinique de phase I/II en injectant directement l'ARN messenger total extrait de mélanomes à des patients (Weide et coll., 2008). Cependant, aucun effet clinique n'a été observé. Selon les auteurs, l'efficacité de ce vaccin pourrait être améliorée par une vectorisation.

ARNm complexé

Le brevet WO 2010/037539 A1, déposé par CUREVAC GMBH montre que l'administration conjointe d'ARNm nu en plus d'ARNm complexé à la protamine sulfate permet une meilleure stimulation immunitaire et une meilleure vaccination anti-tumorale que le complexe seul, ou de l'ARNm nu seul (GMBH, 2010). Le meilleur résultat obtenu avec l'ARNm complexé révèle la nécessité de complexation de l'ARNm à la fois pour permettre son internalisation et pour le protéger de l'attaque des nucléases. Quant à l'effet synergique observé par co-administration

d'ARNm libre et complexé, l'ARNm libre pourrait avoir un effet stimulateur de la réponse immune par activation des récepteurs TLR 7 et 8 plus important que l'ARNm complexé (Weide et coll., 2008).

La société CUREVAC GMBH, spécialisée dans la production d'ARN messenger a développé une formulation d'ARN messenger appelée RNActive®. Dans une première étude avec des groupes de patients atteints de cancer de la prostate, leur protocole a consisté en cinq administrations intradermiques de quatre ARNm d'antigènes spécifiques différents du cancer de la prostate (320 µg par antigène, 1.5 mg au total) avec diminution de la dose si une toxicité était observée. Dans une seconde étude, cette même société va administrer un vaccin candidat ARNm à des patients atteints de cancer du poumon avec relation dose – toxicité et évaluation de l'effet thérapeutique.

Dans un essai clinique, des patients atteints de mélanome ont reçu par voie intradermique six ARNm obtenus par transcription *in vitro* complexés à la protamine codant Melan-A, Tyrosinase, gp100, Mage-A1, Mage-A3, et Survivine avec le GM-CSF (facteur de stimulation des granulocytes) comme adjuvant et avec ou sans le peptide KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, protéine immunogène extraite de mollusques) (Weide et coll., 2009 ; essai clinique NCT00204516). Contrairement à l'administration d'ARNm nu, cette étude a entraîné une régression chez un patient sur 21 et une stimulation immunitaire chez la plupart des patients. Ils ont également mis en évidence une absence de toxicité des ARNm et de la protamine aux doses injectées. Deux phénomènes semblent responsables de la meilleure réponse immune obtenue après administration d'ARNm complexé par rapport à l'ARNm libre. Premièrement, l'ARNm est une molécule fragile et rapidement dégradée et qui rentre difficilement dans les cellules, sa complexation permet une protection et une meilleure pénétration cellulaire. Deuxièmement, les vecteurs utilisés pour la complexation sont intrinsèquement des activateurs de la réponse immune. En effet, les complexes ARNm / protamine employés par Weide et coll. sont des activateurs des TLR (Scheel et coll., 2005). La stimulation des récepteurs TLR 7 a été également démontrée dans le cas d'ARNm complexé à la polyéthylèneimine, à la fois pour des séquences polyuridine et un ARNm codant pour la protéine fluorescente verte (Diebold et coll., 2004).

IV_Transfert d'Acides nucléiques

Chez l'Homme, l'injection directe d'ADN nu dans le muscle cardiaque, le muscle squelettique et le cerveau a permis d'obtenir une expression de transgène. Mais seulement 1% de la dose injectée est internalisée par les cellules (Lu et coll., 2003 ; Jayankura et coll., 2003). L'injection d'ADN dans la thyroïde, la peau et le foie est également efficace (Wolff et Budker, 2005). Le transfert d'ADN nu reste cependant peu efficace à cause de la dégradation rapide de l'ADN hors et à l'intérieur de la cellule (Kofler et coll., 1998). L'ADN nu pénètre mal dans les cellules et a une durée de vie courte (Mountain, 2000). L'efficacité de transfection *in vivo* du tissu pulmonaire de Macaques et de Souris est fortement augmentée (86 fois chez les Macaques et 54 fois chez la souris) en utilisant l'ATA (Aurintricarboxylic acid), un inhibiteur des nucléases DNase I, RNase A, nucléase S1 et exonucléase III (Glasspool-Malone et coll., 2002).

Un transfert efficace des acides nucléiques (ADN ou ARNm) nécessite l'utilisation de méthodes et vecteurs qui facilitent leur protection et leur internalisation.

Les méthodes de transfection sont divisées en trois catégories : méthodes physiques, vecteurs viraux et vecteurs chimiques.

Dans les essais cliniques de thérapie génique ayant donné des résultats positifs, le transfert du gène correcteur a été réalisé avec des vecteurs viraux dans des cellules prélevées au patient qui lui ont ensuite été ré-administrées après amplification. Ainsi :

- En 2000 et 2002, des enfants atteints d'immunodéficience sévère combinée liée au chromosome X (SCID) due à une mutation du gène codant pour la sous-unité γC des récepteurs des cytokines qui est nécessaire à la différenciation des lymphocytes T et NK, ont été traités par thérapie génique. Cavazzana-Calvo et ses collaborateurs ont prélevé des cellules souches des patients, pour y introduire le gène fonctionnel à l'aide d'un rétrovirus, avant de les réinjecter à ces mêmes patients (Cavazzana-Calvo et coll., 2000 ; Cavazzana-Calvo et coll., 2005). 17 des 20 enfants ainsi traités sont vivants avec une immunité normale, mais pour certains d'entre eux, il y a eu activation de proto-oncogènes et un patient est mort. Pour bien évaluer ce résultat, il faut le comparer à ceux obtenus pour la même pathologie par greffe de moelle osseuse avec laquelle 50-85% de succès sont obtenus mais avec de nombreux patients qui meurent cependant à cause des complications dues à une greffe (Kohn et Candotti, 2009).

- En 2009, l'autogreffe de cellules souches dans lesquelles le gène correcteur ABCD1 (transporteur à cassette de liaison à l'ATP) a été introduit par transduction lentivirale a permis de

stopper la progression de l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X chez deux enfants (Cartier et coll., 2009).

- Un résultat positif a été obtenu après injection locale (œil) d'un gène correcteur avec vecteur viral. Maguire et coll. ont montré une amélioration des capacités de perception de la lumière chez 12 patients atteints d'une dégénérescence rétinienne, l'amaurose congénitale de Leber de type 2, après injection dans la rétine d'AAV codant le gène RPE65 (pigment de l'épithélium rétinien 65) (Maguire et coll., 2009).

Mais la production de ces vecteurs viraux est soumise à des contrôles sanitaires très stricts selon des processus complexes et contraignants. De plus, le décès d'un patient qui souffrait d'une déficience en ornithine transcarbamylase, le 17 septembre 1999 après thérapie génique par adénovirus suite à une réaction inflammatoire contre le vecteur adénoviral a freiné l'utilisation de vecteurs viraux (Raper et coll., 2003). Aucune grande entreprise pharmaceutique ne produit ce type de vecteurs et il n'existe que quelques structures au Monde, comme le Génethon en France, capables de produire des vecteurs dans des quantités permettant leur utilisation clinique à grande échelle.

Les acides nucléiques nus sont également administrés après perméabilisation transitoire de la membrane plasmique. Cette perméabilisation est réalisée soit par bombardement (biolistique) des cellules ou des tissus avec des billes d'or sur lesquelles sont greffés ou absorbés les acides nucléiques, soit par exposition à de forts champs électriques (électroperméabilisation) ou à des ultrasons (sonoperméabilisation) qui entraînent des déstabilisations transitoires et localisées qui permettent l'entrée de molécules exogènes à proximité comme les acides nucléiques d'intérêt (Zelenin et coll., 1997 ; Zhang et Yu, 2008 ; Escoffre et coll., 2009).

Si le bombardement de particules ne permet de transfecter avec de l'ADN que 10% à 20% des cellules épidermiques et 1% à 5% des cellules musculaires, l'administration par biolistique d'un ARNm codant l'antigène de mélanome TRP2 fusionné à l'EGFP a permis, dans un modèle murin de mélanome, l'induction d'une immunité humorale et cellulaire ainsi qu'une protection contre le développement de métastases B16F10 (Zelenin et coll., 1997 ; Steitz et coll., 2006).

L'administration par voie intradermique de 40µg d'un plasmide codant la survivine, antigène exprimé par une grande variété de tumeurs mais également par les cellules endothéliales et absent des tissus différenciés, suivie de l'application d'un champ électrique aux sites d'injection a permis l'induction de lymphocytes CTL spécifiques et d'une protection contre le développement de mélanomes dans le modèle murin B16 (Lladser et coll., 2009).

Une dernière stratégie utilise l'injection hydrodynamique qui introduit de l'ADN nu dans les cellules d'organes fortement perfusés, notamment le foie. Il y a injection rapide des complexes (1,6 à 1,8 mL de solution saline d'ADN pour une souris soit un volume égal au volume sanguin total en 5s ; Liu et coll., 1999). L'administration de ce grand volume en un temps court sature la veine cave cardiaque et dirige le volume injecté vers la veine hépatique ce qui permettra la transfection des hépatocytes (Andrianaiso et coll., 2004). Cette méthode serait cependant difficilement transposable à l'homme car elle nécessiterait l'injection de 7,5 L de solution à grande vitesse.

A. Vecteurs chimiques

La membrane plasmique des cellules est une structure dynamique relativement lipophile et négativement chargée. C'est pourquoi, elle ne laisse pas entrer la plupart des molécules volumineuses et chargées négativement comme les acides nucléiques.

Dans le cas du transfert de gènes plusieurs barrières membranaires sont à franchir pour permettre la délivrance du transgène dans le noyau cellulaire (Fig. 22) : (1) liaison à la surface cellulaire et internalisation, (2) fuite endosomale, (3) acheminement vers le noyau, (4) passage au travers de l'enveloppe nucléaire (Fig. 12).

Dans le cas de l'ARNm, l'acheminement vers le noyau et le passage de l'enveloppe nucléaire ne sont pas nécessaires pour une expression du transgène. C'est pourquoi nous nous concentrerons ici à décrire les étapes ne concernant que le transfert d'ARNm.

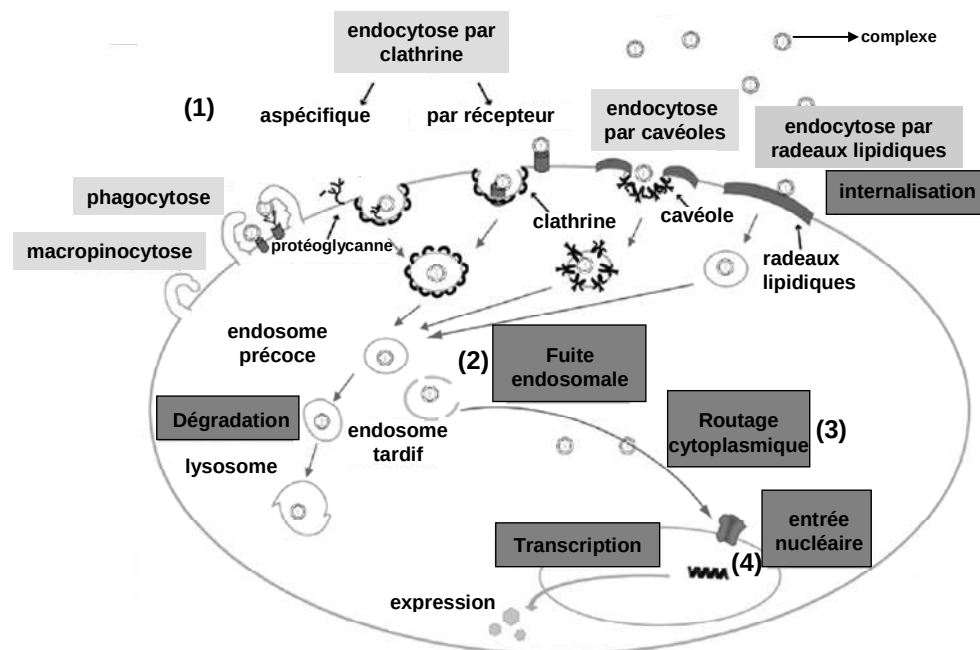


Figure 12: Principaux obstacles rencontrés par les complexes pour leur internalisation dans la cellule. Adapté de (Morille et coll., 2008).

B. Les différentes voies d'endocytose

Les cellules internalisent en permanence les fluides et les molécules de l'environnement selon des processus regroupés sous le terme endocytose avec plusieurs types d'endocytose (Fig. 12). Je ne vais décrire brièvement que les principales voies d'endocytose : clathrine dépendante, par cavéoles, macropinocytose et phagocytose (Conner et Schmid, 2003 ; Midoux et coll., 2008 ; Doherty et McMahon, 2009). Des voies d'endocytose clathrine et cavéoline indépendantes existent également mais peu d'études font état d'internalisation de complexes par ces voies (Mayor et Pagano et coll., 2007 ; Sahay et coll., 2010).

Succintement, la voie clathrine dépendante est la voie la mieux caractérisée. Elle est énergie dépendante et implique un réseau de clathrine. Il y a, après reconnaissance des molécules à la surface cellulaire, invagination de la membrane et formation de vésicules mantelées de clathrine qui après élimination du réseau de clathrine vont fusionner entre elles et avec les endosomes précoces. Les molécules internalisées sont ensuite transférées dans les endosomes tardifs puis dans les lysosomes. Un gradient de pH s'établit à l'intérieur de ces vésicules allant des moins acides, endosomes (pH 6,5 – 6,8) aux plus acides, lysosomes (pH 4,5) (Trombetta et Mellman, 2005). Le trafic vésiculaire est contrôlé par de petites GTPases, les protéines rab, spécifiques de chaque type de vésicules ; en particulier rab5 et rab7 pour les endosomes précoces et tardifs respectivement.

La deuxième voie d'endocytose avec formation de vésicules est la voie cavéole dépendante. Les cavéoles sont des invaginations sans clathrine. Le réseau de clathrine est remplacé par un réseau de cavéoline 1. Les cavéoles sont présentes en particulier dans des îlots lipidiques (lipid rafts) riches en cholestérol et sphingolipides, majoritairement sur les cellules endothéliales. Cette voie est non acide et non digestive.

Enfin, la macropinocytose permet l'internalisation de fluides par des extensions de membrane soutenues par des filaments d'actine et régulées par les rho-GTP-ases. Chez les Mammifères, la phagocytose est particulièrement développée chez les macrophages, les monocytes et les neutrophiles pour éliminer Bactéries, Levures, corps apoptotiques et dépôts graisseux. C'est un processus actif faisant intervenir des récepteurs et des cascades cellulaires spécifiques avec des Rho-GTP-ases.

Comme nous le verrons par la suite les complexes entre les vecteurs chimiques et les acides nucléiques sont pour la plupart positivement chargés et selon le type de vecteur seraient internalisés par endocytose clathrine dépendante ou par cavéoles après interactions électrostatiques avec les protéoglycanes et glycosaminoglycanes, macromolécules anioniques présentes sur la face externe de la membrane plasmique (Khalil et coll., 2006 ; Douglas, 2008 ; Midoux et coll., 2008).

Les protéoglycanes sulfatés font partie des composants cellulaires les plus négativement chargés. Ils sont formés d'un noyau protéique lié de façon covalente à des glycosaminoglycanes : héparine, héparane sulfate, dermatane sulfate, chondroïtine sulfate et kératane sulfate. La charge des protéoglycanes est principalement due aux groupements sulfatés et cette sulfatation est inhibée par le chlorate de sodium. La participation de ces molécules lors de la transfection *in vitro* et *in vivo* par des vecteurs chimiques a été démontrée suite à un traitement par l'héparinase I ou à une pré-incubation des cellules avec des polysaccharides chargés négativement (Mislick et Badeschwieler, 1996 ; Mounkes et coll., 1998 ; Mannisto et coll., 2007).

Deux types de vecteurs chimiques sont développés : les polymères cationiques et les lipides cationiques. Ces molécules polycationiques forment des complexes avec les groupements phosphates des acides nucléiques chargés négativement. Ils permettent la formation de complexes ADN/polymère (polyplexes, PX), ADN/liposomes (lipoplexes, LX) et de complexes ternaires ADN/polymère/liposome (lipopolyplexes, LPD) (Felgner et coll., 1997).

C. Polymères cationiques et polyplexes

La polylysine a été le premier polymère cationique utilisé pour transfecter des cellules (Wu et Wu, 1987).

Actuellement, le PEI (polyéthylèneimine) est le polymère cationique le plus utilisé. Il existe sous forme branchée de 25 kDa ou linéaire de 22 kDa (ExGen 500 ; Fermentas Life Sciences ou JetPEI ; Polyplus Transfection) (Fig. 13). Ces polymères condensent l'ADN dans des structures toroïdes et globulaires.

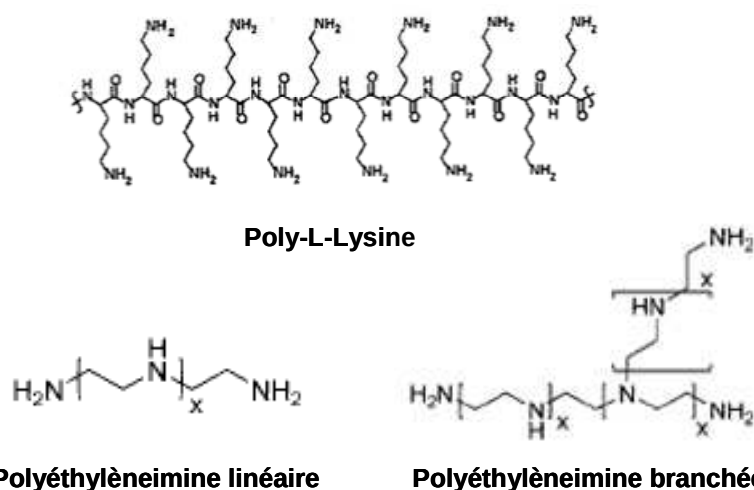


Figure 13 : Formules développées de la polyéthylèneimine et de la poly-L-Lysine.

Dans le cas de la polylysine, la complexation de l'ADN est due aux amines primaires (ϵ -NH₂ des résidus lysine). Dans le cas du PEI branché, elle est due aux amines primaires (R-NH₂) et secondaires (R₂-NH). Enfin pour le PEI linéaire, il s'agit des amines secondaires (R-NH).

Le PEI est efficace *in vitro* et *in vivo*, de façon plus importante pour le PEI linéaire (Goula et coll., 1998 ; Zou et coll., 2000 ; Brissault et coll., 2006). Le polymère présente une forte toxicité notamment à cause du PEI libre restant après formation de complexes avec l'ADN (Clamme et coll., 2003). La toxicité a été attribuée à la forte densité de charge positive sur le squelette macromoléculaire. Des effets létaux ont été observés chez des souris ayant reçu des polyplexes PEI linéaire de 22 kDa en i.v. (Zhang et coll., 2004).

Après internalisation dans les cellules, la libération des complexes présents dans les vésicules d'endocytose, est une étape essentielle pour permettre une expression du transgène dans le noyau pour l'ADN ou dans le cytosol pour l'ARNm. Le pH acide des endosomes est dû à l'action d'une ATPase à protons qui les concentre à l'intérieur des vésicules endosomales et lysosomales. Le PEI possède des amines secondaires protonables en milieu acide qui sont capables de capter les H⁺ dans les endosomes ce qui permet de déstabiliser les membranes des endosomes par un effet tampon. Le remplacement des amines protonables par des amines quaternaires, non protonables, diminue de 20 fois les capacités de transfection du PEI (Thomas et Klibanov, 2002).

Cet effet tampon, aussi appelé éponge à protons, entraîne une entrée massive d'ions chlorure à l'intérieur des vésicules (Sonawane et coll., 2003). La forte augmentation de la concentration ionique dans les endosomes entraîne par osmose une entrée conséquente d'eau qui favorise une déstabilisation membranaire voire sa rupture suite à son gonflement (Fig. 14) (Zuber et coll., 2001 ; Bieber et coll., 2002 ; Sonawane et coll., 2003).

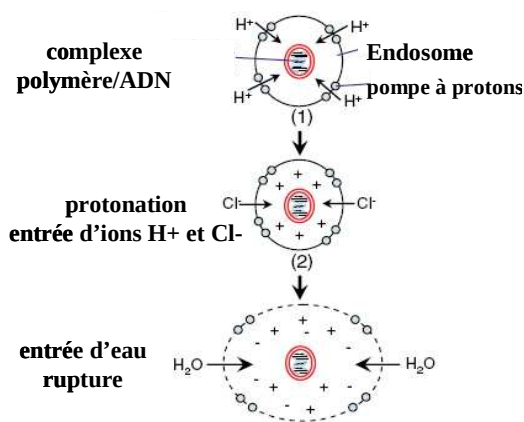


Figure 14: Illustration de l'hypothèse de l'éponge à protons.
D'après (Medina-Kauwe et coll., 2005).

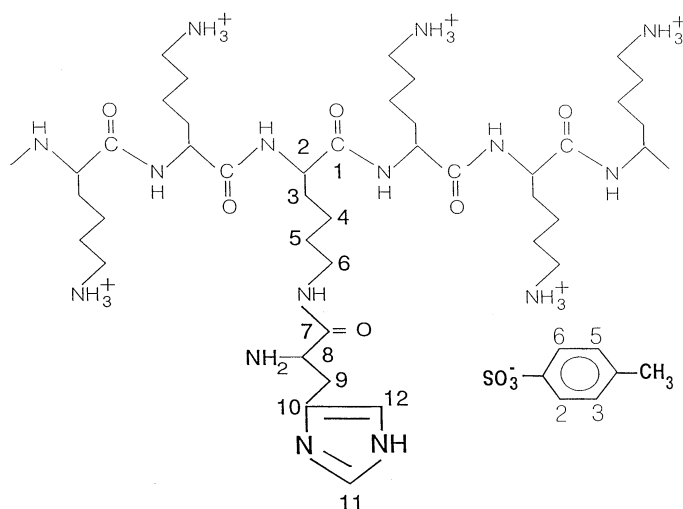


Figure 15: Poly-L-Lysine histidylée.

Il est également possible de créer un effet éponge à protons en utilisant l'histidine qui possède un noyau imidazole protonable à $\text{pH} \leq 6$. Midoux et Monsigny (1999) ont montré pour la première fois que le greffage de 90 résidus d'histidine sur la poly-L-Lysine de 190 résidus lysine permet d'augmenter très fortement l'efficacité de transfection comparativement à la polylysine nue (Midoux et Monsigny, 1999) (Fig. 15). L'efficacité de transfection des polyplexes ADN/polylysine histidylée est fortement inhibée (1000 fois) en présence de bafilomycine A_1 , un inhibiteur de la pompe à protons endosomale. Ceci montre que la protonation du noyau imidazole des histidines est impliquée dans la transfection et probablement pour la délivrance de l'ADN dans le cytosol.

La diminution de l'efficacité de transfection en présence de bafilomycine A_1 a également été observée pour le PEI par Brissault et coll. (Brissault et coll., 2006). En plus de l'effet éponge à protons, la poly-L-lysine histidylée pourrait également avoir un effet perméabilisant ou fusiogène en milieu acide (Midoux et coll., 2009).

Depuis la poly-L-Lysine histidylée, de nombreux polymères et peptides contenant des résidus histidine ou imidazole ont été synthétisés par de nombreux autres groupes dans le monde. Ils sont listés dans le tableau 5.

Très récemment, Midoux et coll. ont synthétisé un PEI linéaire substitué par des résidus histidine et montré que ce polymère est au moins aussi efficace que le PEI linéaire pour la transfection de cellules mais surtout qu'il est beaucoup moins toxique *in vitro* (brevet (Cheradame, 2009)).

Tableau 5 : Polymères et peptides contenant de l’histidine.

Nom	Type	Référence
HpK, HIS, His-pLK	Polylysine histidylée	1–4
HoK	Oligolysine histidylée	4,5
PLH-g-PLL	N-Ac-poly(L-hisidine)-graft-poly(L-lysine)	6
Im-pK	Polylysine imidazole	7,8
KGH6	Dendrimère	9
PDHP	poly(DMAEA/His(Boc)-OMe)phosphazene	10
HK; HHK4b; HHHK8b	Copolymères linéaires et branches d’histidine et lysine	11–16
His6 RPCs	(CH6K3H6C)_n	17,18
CDPim	B-cyclodextrine histidylée	19,20
UCA	Chitosan imidazole	21–23
Im-PEI	PEI branché imidazole	24
PLH-NH₂, PVIm-NH₂, PVIm-Bu	poly(L-histidine) aminée, poly(1-vinylimidazole) aminée, poly(1-vinylimidazole) alkylée	25–28
cRGD-hk	cRGD-[(H)KKKK]₆	29
HoKC	K[K(H)KKK]5-K(H)KKC	30
LAH4; LAH4-L1	K2AL2ALALH2LAHLALHLALALK2A; K2AL2AHALHL2AL2ALHLAHALK2A	31,33
Tat-10H & C-5H-Tat-5H-C	Peptide lié covalamment à 10 résidus histidines	34
O₁₀H₆	Peptides ornithine & histidine	35
MS(O₁₀H₆)	Microspheres mantelées K₁₀H₆	36,37
(KHKHKHKHKK)6-FGF2	Protéine recombinante fusionnée à un polymère	38,39

D’après (Midoux et coll., 2009), références citées dans la revue.

D. Lipides cationiques et lipoplexes

Ils sont utilisés sous forme de vésicules lipidiques appelées liposomes.

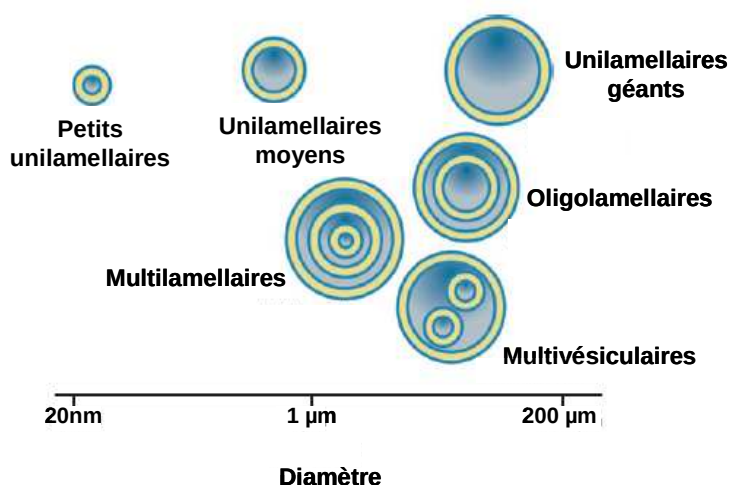


Figure 16: Morphologie des différents régimes de taille de liposomes.
D'après (Jesorka, 2008).

Les liposomes se distinguent selon leur taille (Fig. 16): les petits unilamellaires / SUV (Small Unilamellar vesicles 0.02µm à 0.2µm), les unilamellaires intermédiaires / LUV (Large Unilamellar Vesicles 0.2µm à 1µm), les vésicules multilamellaires / MLVs (Multilamellar Vesicles) et les unilamellaires géants / GUV (Giant Unilamellar Vesicles > 1µm) (Jesorka, 2008).

Les lipides cationiques sont constitués de trois domaines : une chaîne hydrophobe, un groupe espaceur et une tête polaire hydrophile chargée (Fig. 17). Ces trois domaines sont reliés la plupart du temps par un squelette glycérol comme c'est le cas pour les principaux lipides cationiques utilisés en transfection dans la figure 18.

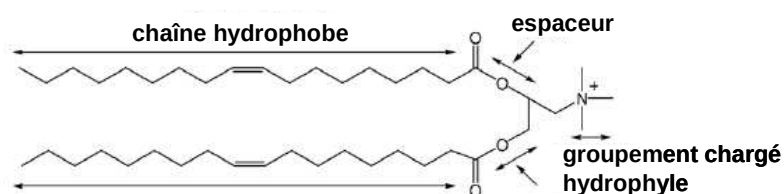


Figure 17 : Structure du lipide DOTAP (Dioléyltriméthylammoniumpropane)
D'après (Lv et coll., 2006).

Dans un milieu aqueux, la partie hydrophobe est protégée et les groupements hydrophiles cationiques sont exposés en surface. Ces derniers permettent les interactions électrostatiques avec les acides nucléiques et leur condensation pour former des lipoplexes (Felgner et coll., 1997).

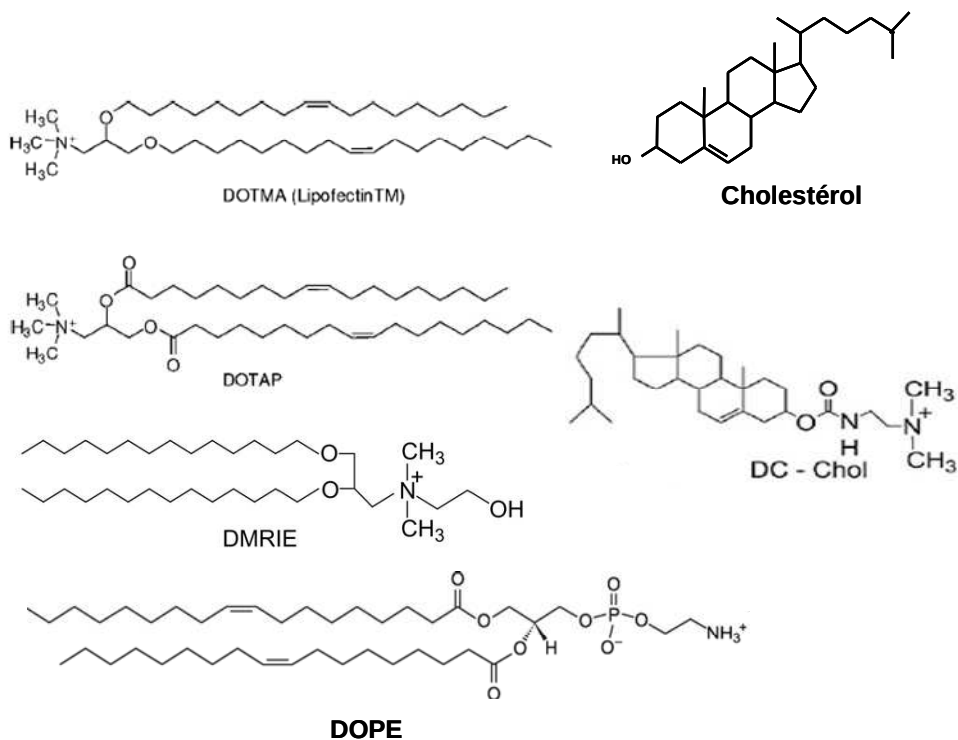


Figure 18 : Formules développées de lipides fréquemment utilisés. DOTAP : N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium Methylsulfate ; DC-Chol : 3β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl] cholesterol ; DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine ; DOTMA : 1,2-di-O-octadécenyl-3-triméthylammonium propane (chloride salt) ; DMRIE : 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxy ethyl ammonium bromide. (Mintzer et Simanek, 2009 ; Morille et coll., 2008).

Les liposomes sont utilisés comme vecteurs pour délivrer des drogues cytotoxiques comme le paclitaxel ou la doxorubicine ou encore des acides nucléiques (Zamboni, 2005 ; Davis et coll., 2008).

La première expérience *in vivo* de transfection avec de l'ADN et des lipides cationiques date de 1989 et le premier essai chez l'Homme de 1993 (Brigham et coll., 1989 ; Nabel et coll., 1993). Les lipides cationiques sont rares chez les êtres vivants et seule la sphingosine est présente dans les cellules et à de faibles quantités, d'où leur toxicité élevée (Kuvichkin et coll., 2009).

La mucoviscidose est due à une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). L'administration à huit patients atteints de 400 µg d'ADN codant un gène CFTR fonctionnel complexé à des liposomes DOTAP, a permis chez deux d'entre eux un recouvrement partiel de l'activité de ce gène (Porteous et coll., 1997).

Stopeck et coll. ont administré de façon intratumorale à des patients atteints de mélanomes de stade IV une à trois doses de 10, 50 ou 250 µg d'ADN codant pour les protéines CD80 (B7.1) et β2m, impliquées dans la présentation antigénique et sous-exprimées par les cellules de mélanome,

complexé avec des liposomes DMRIE/DOPE. Ceci a permis la régression des nodules injectés de plus de 25% chez 7 des 14 patients (Stopeck et coll., 1997).

a. Importance des trois domaines

i. Chaîne hydrophobe

Les chaînes hydrophobes représentent la partie apolaire et peuvent être divisées en trois catégories: simple chaîne, double chaîne, cholestérol.

Les lipides simple chaîne sont le plus souvent des surfactants à cause de leur capacité à former des micelles en solution. Ils sont peu utilisés car très toxiques. Les lipides à double chaîne sont les plus utilisés et l'acide oléique (C18:1) est la chaîne insaturée la plus fréquente. La longueur de la chaîne hydrophobe des lipides module leur efficacité de transfection (Felgner et coll., 1987 ; Floch et coll., 2000). Les chaînes hydrophobes sont en général reliées au glycérol par des liaisons éther. Plusieurs études ont montré que ceux ayant des liaisons esters hydrolysables, sont moins toxiques (Zhi et coll., 2010).

i. Groupe espaceur

L'espaceur permet un contact optimal entre la tête polaire cationique et les phosphates de l'ADN. Une relation entre l'espaceur et le taux de transfection existe : les lipides avec des espaceurs stables (DOTMA, DMRIE) sont plus toxiques que ceux avec des liaisons labiles (DOTAP). La majorité de ces domaines charnières est formée par des esters (DOTAP, Fig. 18). Cependant, les esters sont hydrolysables dans la circulation sanguine. Les fonctions éthers plus stables permettent de meilleures vectorisations. Cette stabilité limite leur dégradation mais entraîne une toxicité (Pedroso de Lima et coll., 2001 ; Lv et coll., 2006). Pour les lipides cationiques à double chaîne, le glycérol sert d'espaceur (DOTMA, DOTAP, ...). Pour les dérivés du cholestérol comme le DC-Chol, un espaceur de 3 à 6 atomes de carbone est optimal : tête polaire- $[\text{CH}_2]_x$ - ancre hydrophobe (Fig. 18) (Ma et coll., 2007 ; Nakamura et coll., 2009).

ii. Tête polaire chargée

Obata et coll. ont comparé les efficacités de transfection de lipides cationiques avec des têtes polaires comportant soit de la lysine, de l'arginine ou de l'histidine. L'efficacité de transfection suivait l'ordre $\text{lysine} \geq \text{arginine} > \text{histidine}$ (Obata et coll., 2008). Des études structure-activité ont montré que les lipides cationiques avec la plus forte efficacité de transfection partagent les caractéristiques suivantes : une tête polaire cationique deux fois plus courte que la chaîne aliphatique, une liaison éther (3 atomes) entre les chaînes aliphatiques et le squelette hydrophobe et une paire de chaînes oléyle comme partie hydrophobe. Ceci pourrait refléter la nécessaire proximité

des chaînes hydrophobes et des têtes cationiques dans la formation de complexes avec les acides nucléiques (Ren et coll., 2000 ; Lv et coll., 2006).

La densité de charge de membrane (σ_M) influence l'efficacité de transfection. Les complexes devraient avoir une densité de charge optimale pour l'interaction à la fois avec les membranes cellulaires et intracellulaires (Ahmad et coll., 2005 ; Mintzer et Simanek, 2009). L'échappement endosomal pourrait être proportionnel à la fois à la protonation des vecteurs utilisés mais également à leur densité de charge. Cette dernière serait critique à la formation d'un contact entre liposomes et membranes précédant leur fusion (Hafez et Cullis, 2001).

Ainsi, les phosphonolipides avec la charge sur un atome de phosphore ou d'arsenic, sont moins toxiques que si la charge est portée par un azote (Floch et coll., 2000 ; Lin et coll., 2003 ; Lv et coll., 2006). Ces atomes sont plus volumineux que l'azote, la densité de charge diminue (Mintzer et Simanek, 2009).

Plusieurs types de groupements chargés positivement ont été utilisés pour préparer des phosphonolipides, des lipides avec du pyridinium, avec nucléoside ou avec hydroxyalkylamine (Fig. 19). L'utilisation de nucléosides est avantageuse parce qu'en plus des interactions électrostatiques communes à tous les lipides cationiques entre la charge portée par le groupement hydrophile et les groupements phosphates de l'ADN, ceux-ci forment des liaisons hydrogènes et des interactions π - π avec les bases des acides nucléiques (Mintzer et Simanek, 2009). Ces lipides avec nucléosides sont capables de former des complexes avec l'ADN et de transfecter des cellules et ce avec une faible toxicité (Chabaud et coll., 2006).

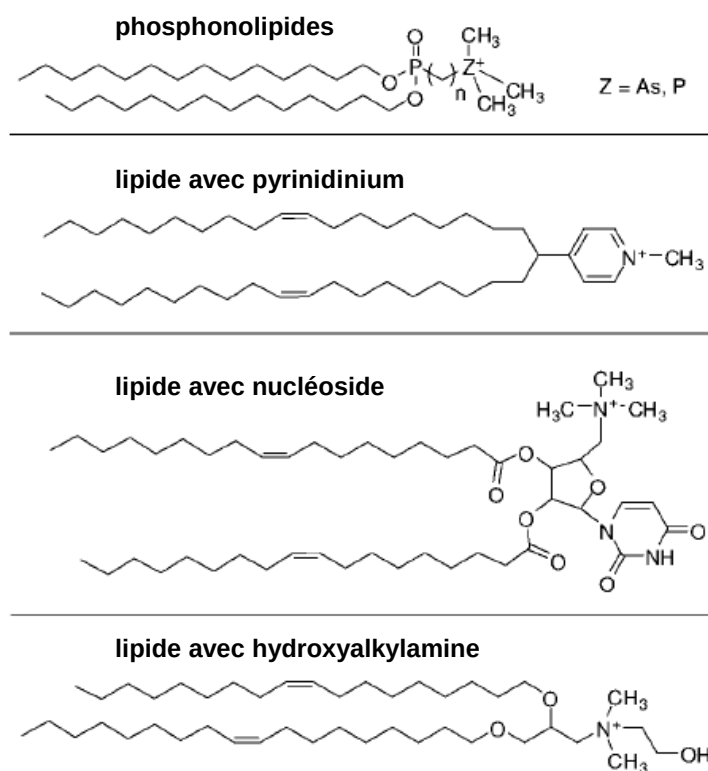


Figure 19: Modifications du groupement hydrophyle (Mintzer et Simanek, 2009).

Enfin, l'efficacité de transfection est augmentée en modifiant la valence des lipides avec des têtes polaires portant plusieurs charges (Fig. 20).

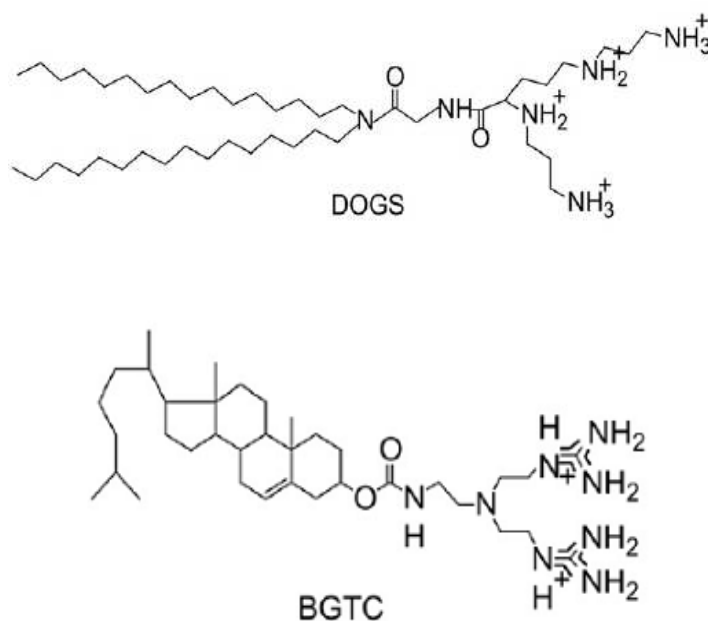


Figure 20: Structure de lipides cationiques multivalents. DOGS : 5-carboxyspermylglycine-dioctadécylamine; BGTC : Bis-Guanidium-Tren-Cholestérol (Morille et coll., 2008).

b. importance de la structure

Les molécules lipidiques polaires (amphiphiles) peuvent s'auto assembler pour former diverses particules colloïdales (Fig. 21), en fonction de la température et de la force ionique (Lasic, 1998). On peut distinguer :

- des micelles (savons, détergents, lysophospholipides).
- des bicouches (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, DODAC).
- des micelles inverses (phosphatidyléthanolamine, cardiolipide).

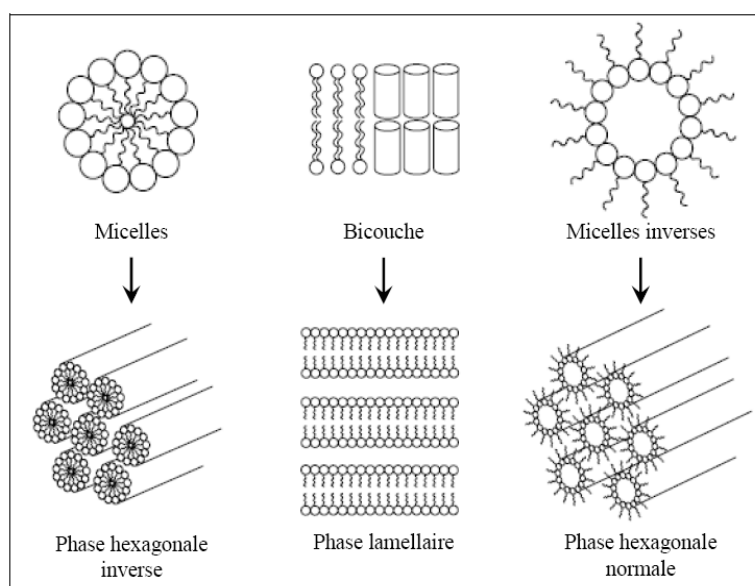


Figure 21: Structures organisées de lipides. D'après (Lasic, 1998).

La phase lamellaire est la structure la plus couramment rencontrée parmi les lipoplexes. Il est souvent admis que l'incorporation de DOPE (DiOléyl PhosphatidylEthanolamine) dans les liposomes permet une augmentation de l'efficacité de transfection. Le DOPE, utilisé comme co-lipide, joue un rôle dans la libération de l'ADN des lipoplexes mais son rôle le plus important serait la déstabilisation des membranes endosomales (Zuhorn et coll., 2005 ; Pedroso de Lima et coll., 2001). Ceci serait dû à sa capacité à former des phases hexagonales inversées (H_{II}) instables à pH acide (Koltover et coll., 1998). Bien que le DOPE soit très efficace *in-vitro*, il a tendance à s'agréger dans le sang à cause d'un effet hydrophobe et est remplacé *in vivo* par le cholestérol (Lin et coll., 2003). Le cholestérol n'adopte pas de structure inversée hexagonale mais est utilisé pour diminuer l'agrégation des complexes *in vivo* (Faneca et coll., 2002 ; Dass, 2004). Il permet également d'augmenter la stabilité des bicouches (Brunel et coll., 1999).

Leblond et coll. ont montré une amélioration de l'efficacité de transfection de lipoplexes formés avec des lipopolythiurés, lipides non cationiques, après optimisation de la structure de la tête polaire (Leblond et coll., 2006 ; Leblond et coll., 2007).

Dans le cas des lipoplexes, l'échappement de l'ADN des endosomes pourrait être provoqué par un flip-flop des lipides de la membrane de l'endosome avec formation de paires d'ions entre les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques membranaires, ce qui déstabiliserait les lipoplexes et libérerait l'ADN dans le cytoplasme (Xu et Szoka, 1996 ; Fig. 22).

Le DOPE permet la fusion des liposomes avec la membrane endosomale à pH acide. Il est possible qu'il y ait formation de pores qui laisseraient échapper l'ADN (Conner et Schmid, 2003).

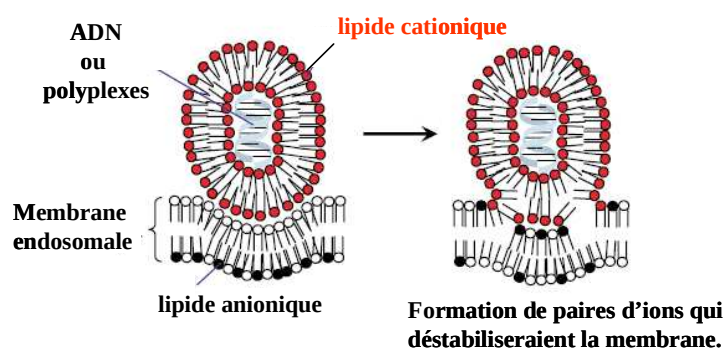
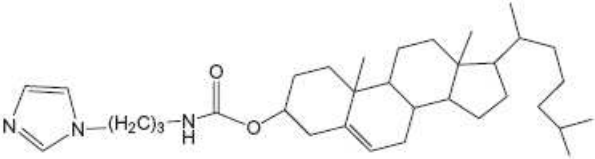
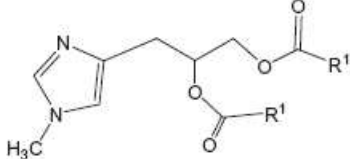
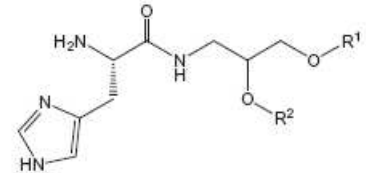
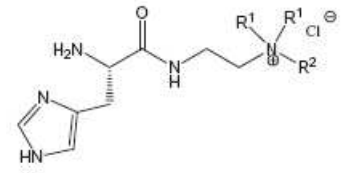
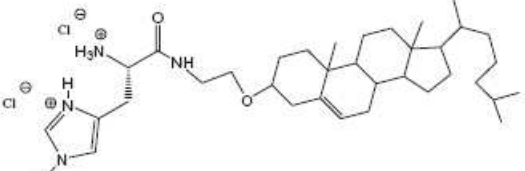
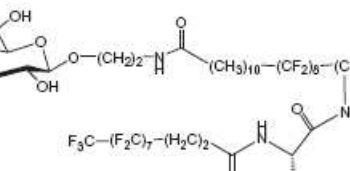
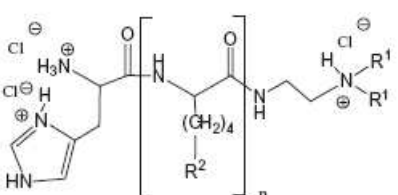
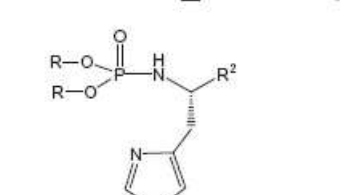
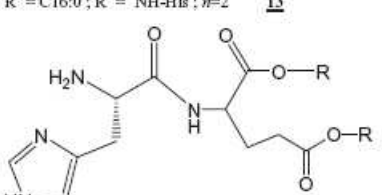
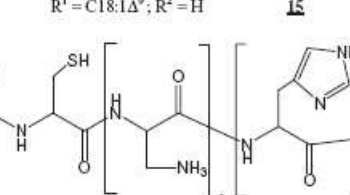
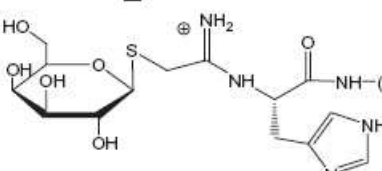
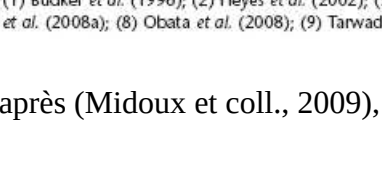
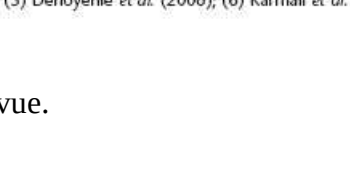


Figure 22: Illustration de la théorie des paires d'ions.
D'après (Medina-Kauwe et coll., 2005).

Des lipides fusiogènes avec des groupements histidyls ou imidazoles ont été proposés pour augmenter la fusiogénicité des lipoplexes et remplacer la DOPE (Tableau 6). Le groupement imidazole, comme pour les polymères, pourrait permettre un échappement endosomal après protonation.

Tableau 6 : Formules développées de lipides contenant des imidazoles utilisés comme vecteurs de transfection.

Chemical structure	Reference	Chemical structure	Reference
	1		1
	2		2
$R^1 = C12:0$; $R^2 = C12:0$ $R^1 = C18:0$; $R^2 = C12:0$	3	$R^1 = C17:1$ $R^1 = C15:0$	3
	4		4
$G = H$ $G = Ts$	5	$R^1 = C16:0$; $R^2 = H$ $R^1 = C16:0$; $R^2 = CH_3$	5
	6		6
$R^1 = C16:0$; $R^2 = NH_3$; Cl^- ; $n=1$ $R^1 = C16:0$; $R^2 = NH-His$; $n=1$ $R^1 = C16:0$; $R^2 = NH-His$; $n=2$	7	$F_3C-(F_2C)_7-(H_2C)_2$ O_2CCF_3	7
$R^1 = C16:0$; $R^2 = NH_3$; Cl^- ; $n=1$ $R^1 = C16:0$; $R^2 = NH-His$; $n=1$ $R^1 = C16:0$; $R^2 = NH-His$; $n=2$	8	$R^1 = C18:1\Delta^9$; $R^2 = CO_2CH_3$ $R^1 = C18:1\Delta^9$; $R^2 = H$	8
	9		9
$R = C14:0$ $R = C18:0$	10	$R = C11H_{23}$ $R = C_{15}H_{31}$	10
	11		11
$R = C16:0$	12		12
	13		13

21

(1) Budker *et al.* (1996); (2) Heyes *et al.* (2002); (3) Kumar *et al.* (2003); (4) Singh *et al.* (2004); (5) Denoyenle *et al.* (2006); (6) Karmali *et al.* (2006); (7) Mevel *et al.* (2008a); (8) Obata *et al.* (2008); (9) Tarwadi *et al.* (2008); (10) Shigeta *et al.* (2007).

D'après (Midoux et coll., 2009), références citées dans la revue.

Suite aux résultats obtenus avec les polymères histidylés, le Dr. P. Midoux en collaboration avec le Dr Arabinda Chaudhuri (Inde) ont développé des lipides cationiques histidylés. Ainsi la L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)éthylamide (HDHE, **3**, Tableau 6) associée au cholestérol forme des liposomes cationiques fusiogènes en milieu acide ($5 < \text{pH} < 7$) (Kumar et coll., 2003). Ces liposomes ont une taille de $78 (\pm 24)$ nm et une charge globale de surface de $+ 32 (\pm 1,5)$ mV à pH neutre. Leur combinaison avec de l'ADN plasmidique conduit à la formation de lipoplexes de $490 (\pm 20)$ nm ayant un potentiel ζ de $- 2,5$ mV. Cette formulation a une efficacité de transfection comparable à celle du FuGENE 6 et au DC-Chol/DOPE sur les lignées cellulaires A549, 293T7 et HeLa, et supérieure dans le cas des cellules hépatiques HepG2 (Kumar et coll., 2003). Le L-histidine-cholestéryl-éthylamide (**4**, Tableau 6) a été synthétisé et a permis un transfert de gène efficace dans différentes lignées cellulaires (A549, HEK293 et HeLa) avec une absence de toxicité (Singh et coll., 2004).

Depuis, de nombreux lipides possédant des imidazoles ont été mis au point, leurs formules développées sont présentées dans le tableau 6.

En collaboration avec le Pr. Jaffrès, le Dr. Midoux a développé des lipides contenant des groupements imidazoles de structure bioinspirée (Mével et coll., 2007; Mével et coll., 2008; Mével et coll., 2008). Ce sont des lipophosphoramidates qui ressemblent aux phospholipides membranaires comme la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline (Fig. 23). Dans ces lipides, c'est un phosphoramidate qui est utilisé comme groupement espaceur. Les phosphoramidates diffèrent des phosphonates par le remplacement d'une liaison P-O par une liaison P-N, ces vecteurs sont plus solubles dans l'eau et moins toxiques (Lamarche et coll., 2007; Le Gall et coll., 2010).

McNeil et coll. ont comparé les efficacités de transfection *in vitro* et de stimulation immunitaire *in vivo* de lipoplexes formés avec des liposomes DOPE :DC-Chol (1 :1 mol/mol), Chol :DC-Chol (1 :1), PC : Chol :DC-Chol (16 :8 :4) ou PC : Chol :DC-Chol (1 :1 :1). Les lipoplexes PC : Chol :DC-Chol (16 :8 :4) d'efficacité presque nulle *in vitro* se sont avérés être les meilleurs stimulateurs de sécrétion d'IL-12 et d'interféron γ par les splénocytes après administration de lipoplexes contenant un plasmide codant un antigène de surface de l'hépatite B à des souris par voie sous-cutanée. Ainsi, pour l'optimisation des formulations liposomiques, l'étude des capacités de transfection *in vitro* pourraient ne pas suffire.

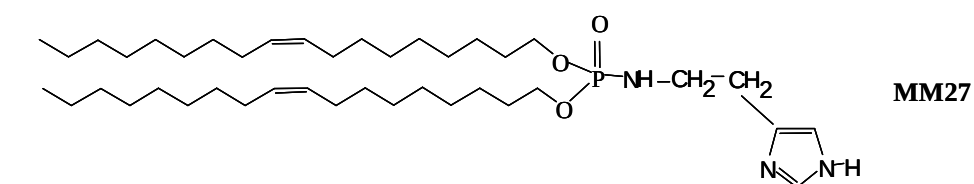
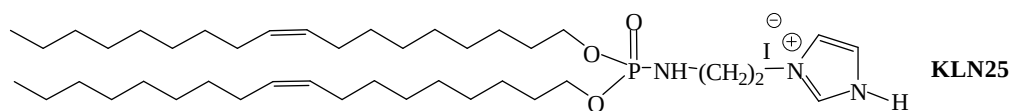
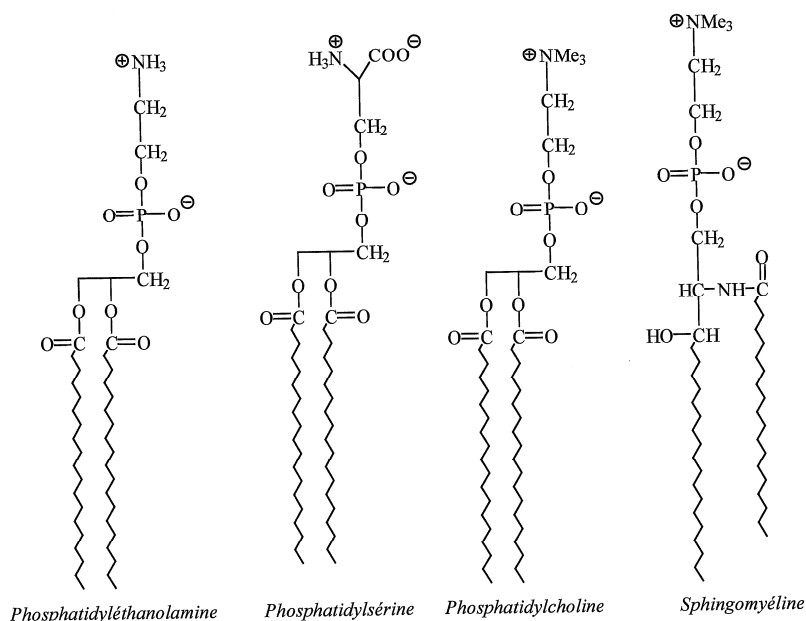


Figure 23 : Structure des lipophosphoramidates imidazoles et de lipides membranaires (Mevel et coll., 2008; Mevel et coll., 2008).

E. Lipopolyplexes

Le groupe de Huang Leaf a été le premier à utiliser des LPD obtenus en complexant l'ADN plasmidique avec soit la polylysine hydrobromide ($M = 25\,600$ Da), la protamine ou la protamine sulfate et en utilisant des liposomes DOTAP (Gao et Huang, 1996 ; Li et Huang, 1997). Une meilleure protection contre la digestion enzymatique de l'ADN et une plus importante expression du gène rapporteur luciférase *in vivo* ont été obtenues par rapport aux lipoplexes DOTAP / ADN.

Les LPD sont des complexes ternaires Lipid-Polycation-DNA (LPD) ou LPR lorsqu'ils sont formés avec de l'ARNm (Lipid-Polycation RNA) (Fig. 24). Au laboratoire, une formulation à base de LPR dans lesquels l'ARNm est complexé avec de la poly-L-Lysine histidylée PEGylée, les liposomes cationiques constitués avec HDHE/Cholestérol (Mockey et coll., 2007). L'administration d'un ARNm codant l'antigène tumoral MART-1 sous forme LPR a permis l'induction d'une réponse immune chez la Souris ainsi qu'un retard de croissance de mélanomes B16F10.

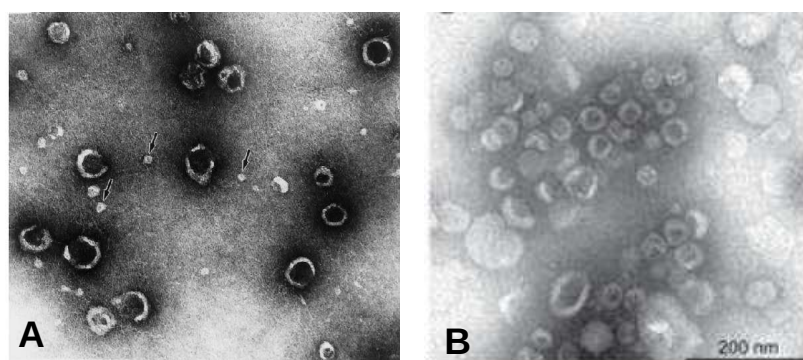


Figure 24 : Structure de lipopolyplexes en microscopie électronique de transmission. A : ADN / polycation Poly-L-Lysine histidylée PEGylée et liposomes DOPE / DOPS (Lee et coll., 1996) ; B : ARNm / polycation polylysine histidylée PEGylée et liposomes HDHE / Cholestérol (Mockey et coll., 2007).

Des exemples de lipopolyplexes sont présentés dans le tableau 7.

Garcia et coll. ont comparé les capacités de transfection de LPD réalisés avec de l'ADN pré-complexé par des PEI linéaire de 22 kDa ou branché de 25 kDa et 800 kDa et utilisant des liposomes DOTAP/Cholestérol (Garcia et coll., 2007). Ils ont montré que si l'ajout de liposomes n'entraînait pas une meilleure complexation de l'ADN, celle-ci permettait d'augmenter l'efficacité de transfection qui s'est révélée être supérieure à celle des polyplexes et lipoplexes correspondants. De plus, ils ont mis en évidence une supériorité des LPD formés avec le PEI linéaire de 22 kDa par rapport à ceux formés avec les PEI branchés de 25 kDa et 800 kDa.

Tableau 7: Exemples de lipopolyplexes utilisés pour la transfection.

Complexes		Référence
Polycation	Liposomes	
Poly-L-Lysine_PEG (25.6 kDa)	DOPE / CHEMS	(Lee et coll., 1996)
Poly-L-Lysine_PEG (25.6 kDa)	DOPE / DOPS	
PEI branchée (25 kDa) ou Poly-L-Lysine (16,1 kDa)	DOTAP	(Foglieni et coll., 2000)
Protamine sulfate	DOTAP / Cholestérol	(Tsai et coll., 2002)
PEI linéaire (22kDa)	DOTAP / Cholestérol	(Garcia et coll., 2007)
PEI branchée (25 kDa ou 800 kDa)		
Oligolysine (7-30 lysines)	DOCSPER	(Golda et coll., 2007)
Oligolysine (18 résidus)		
Poly-L-Lysine_PEG histidylée (50 kDa)	HDHE / Cholestérol	(Mockey et coll., 2007)
PEI (25 kDa)	DSPE-PEG2000-biotine	(Hu et coll., 2010)
	streptavidine-Ac anti transferrine	
Peptide adénoviral mu	DC-Chol / DOPE	(Perouzel et coll., 2003)
Peptide NLS SV40	DC-Chol / DOPE	(Keller et coll., 2003)
Peptide Tat modifié ou Antigène T de SV40 ou Protamine sulfate	Lipofectamine	(Moon et coll., 2007)
Oligopeptides lysine histidine cystéine		
	DMB-Chol / DOPE	(Tokunaga et coll., 2004)

CHEMS: Cholestéryl hemisuccinate; DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DOPS: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine ; DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane ; DOCSPER : 1,3-dioleoyloxy-2-(N5-carbamoyl-spermine)-propane ; HDHE : L-Histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide ; DSPE-PEG2000: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)-2000] ; DC-Chol : 3β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol ; peptide Tat modifié : Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Cys

Hu et coll. ont développé un nouveau type de LPD ciblé avec complexation ADN /PEI (25 KDa) /DSPE-PEG200-biotine / streptavidine-anticorps monoclonal dirigé soit contre le récepteur à l'insuline soit contre le récepteur à la transferrine (Hu et coll., 2010). Ce type de complexe a permis *in vivo* une expression dans les tissus exprimant ces récepteurs à savoir les tumeurs hépatiques et les cellules du foie.

Tojunaga et coll. ont précomplexé de l'ADN plasmidique avec des oligopeptides contenant lysine, histidine et cystéine avant complexation avec des liposomes DMB-Chol/DOPE (Tokunaga et coll., 2004). L'utilisation du complexe ternaire a permis une meilleure protection de l'ADN que les oligopeptides seuls et une augmentation des capacités de transfection des complexes.

Perouzel et coll. ont utilisé des LPD ADN plasmidique / peptide adénoviral mu (MRRAHHRRRASHRRMRGG) / liposomes DC-Chol/DOPE (Perouzel et coll., 2003). Ils ont mis en évidence que le peptide adénoviral mu qui a des propriétés de déstabilisation des membranes cellulaires permet d'augmenter l'efficacité de transfection des LPD par rapport aux lipoplexes.

Toutes ces équipes ont ajouté des liposomes à des acides nucléiques d'abord complexés par des polycations ce qui montre l'importance de l'ordre d'addition des composants. Moon et coll. ont montré que les complexes formés par addition de lipofectamine à des plasmides précomplexés par des peptides Tat-C étaient plus efficace que ceux formés par ajout successif de peptide Tat-C, de Lipofectamine (LFA) et d'ADN. Les complexes (ADN-Tat-C) + LFA étaient également de meilleurs transfectants que les polyplexes ADN + Tat-C et les lipoplexes ADN + LFA (Moon et coll., 2007).

F. Ciblage des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques expriment plusieurs récepteurs présentés dans le tableau 8. La plupart des stratégies de ciblage des DC visent le récepteur mannose.

Tableau 8 : Récepteurs exprimés par les cellules dendritiques.

Récepteur	Famille de récepteur	Expression du récepteur par les cellules humaines
Récepteur au mannose	CLR	DC immatures, monocytes, macrophages, sous-types de cellules endothéliales, épithélium de la rétine, cellules du rein, cellules musculaires lisses de la trachée
CD205	CLR	DC matures, cellules épithéliales thymiques, monocytes, lymphocytes B et T, cellules NK
DC-SIGN	CLR	DC immatures, macrophages, megakaryocytes
LOX1	CLR	DC immatures, macrophages, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales
Dectin-1	CLR	DC immatures, monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles, lymphocytes B et T
FcγRI	FcR	DC, monocytes, macrophages, neutrophiles activés
FcγRIIa	FcR	DC, monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles, plaquettes
FcγRIII	FcR	DC, monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles activés
FcγR	FcR	DC matures, monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles
CD11c/CD18	Intégrine	DC, monocytes, macrophages, granulocytes, cellules NK, lymphocytes B activés
MAC1	Intégrine	DC, monocytes, macrophages, granulocytes, cellules NK, sous-types de lymphocytes B et T
CD40	Superfamille du récepteur TNF	DC, monocytes, macrophages, granulocytes, cellules NK, sous-types de lymphocytes B et T
Siglec-H	Siglec	Le récepteur chez l'Homme reste inconnu

CLR : récepteur lectine de type C, DC-SIGN : molécule d'adhésion intercellulaire spécifique aux DC, FcR : récepteur au fragment constant des immunoglobulines, LOX1 : récepteur aux lipoprotéines de faibles densités oxydé de type lectine lectin, MAC1 : Récepteur 1 des macrophages, Siglec : lectine de type immunoglobuline liant l'acide sialique, TNF : facteur de nécrose des tumeurs. D'après (Tacke et coll., 2007).

Le récepteur mannose fait partie d'une famille de récepteurs qui comprend le récepteur mannose (CD206), Endo 180 /CD280/uPARAP (urokinase-type Plasminogen Activator Receptor-Associated Protein), DEC-205 et PLA₂R (Récepteur à la phospholipase A₂ de type M). Il lie et internalise aussi le collagène et la gélatine (Martinez-Pomares et coll., 2006 ; Llorca, 2008). Il est exprimé par les macrophages (Stahl et Gordon, 1982) et les DC en culture (Sallusto et coll., 1995 ; Avrameas et coll., 1996). Comme DEC 205, le récepteur mannose intervient dans la présentation antigénique croisée mais il est peu exprimé par les cellules dendritiques spléniques (Burgdorf et coll., 2006 ; Burgdorf et coll., 2007). Dans ces cellules, il n'est pas indispensable à la présentation croisée (Segura et coll., 2009). Le ciblage de ce récepteur présente un intérêt thérapeutique. Il a ainsi permis l'induction d'une immunité anti-tumorale chez la Souris dans un modèle de cancer du sein (Wei et coll., 2009). Le couplage d'une protéine d'un antigène tumoral (gp 100) à un anticorps dirigé contre le récepteur mannose a permis une présentation des antigènes sur des complexes CMH de classes I et II par des cellules dendritiques dérivées de monocytes circulants humains (Ramakrishna et coll., 2004). Mais ce bénéfice n'a pas encore été confirmé cliniquement (Caminschi et coll., 2009).

Le mannose est également reconnu par une lectine présente dans le sérum, la lectine MBP (Protéine de liaison au mannan) (Kawasaki et coll., 1978). Cependant, cette lectine est présente en faible quantité dans le sérum (5-80µg/mL) et il serait possible de s'en affranchir en augmentant les quantités de vecteurs (Hansen et coll., 2000). Bien que plusieurs récepteurs soient capables de lier le mannose, les modes d'internalisation diffèrent. Les ligands reconnus par DEC-205 et le récepteur mannose, dont le mannose, sont dirigés vers les endosomes. DEC-205 permettrait une meilleure présentation des antigènes (Mahnke et coll., 2000). L'expression de DEC205 est plus restreinte chez l'Homme que chez la souris mais elle est partagée par les DC, les LB, les LT, les monocytes, les macrophages et les cellules NK (Tableau 8) ce qui explique peut être pourquoi ce récepteur semble plus efficace dans l'induction de la présentation croisée que le récepteur mannose (Kato et coll., 2006 ; Aarntzen et coll., 2008). De plus, le récepteur étant aussi présent sur les cellules endothéliales, il pourrait être avantageux pour la transfection de ces cellules dans l'angiogénèse tumorale.

Dans la rate, deux types de cellules dendritiques coexistent, les cellules CD8⁻ DCIR2⁺ et les CD8⁺ DEC-205⁺. Les cellules DEC-205⁺ et CD8⁺ sont plus efficaces dans la présentation croisée des antigènes. (Dudziak et coll., 2007 ; Shortman et Heath, 2010). Ces deux types cellulaires présentent les antigènes aux lymphocytes et sont distinguables par leur phénotype (Tableau 9). Les

DC CD8⁺ sont plus efficaces pour la phagocytose des cellules apoptotiques et dans la présentation croisée et ont des équivalents chez l'Homme (Villadangos et Shortman, 2010).

Tableau 9 : Maqueurs et récepteurs TLR permettant une distinction des cellules dendritiques CD8⁺ (DEC205⁺) et CD8⁻ (33D1⁺) de la rate chez la souris.

Molécule	DC spléniques CD8⁺	DC spléniques CD8⁻
Clec9A (DNGR I)	+	-
CD205	++	+
Clec I 2A	++	+
DCIR2	-	+
Dectin-1	-	+
CD36	+	-
CD24 (HSA)	++	+
CD172a (Sirpα)	+	++
CD11b	+	++
Cystatine C	+	-
TLR 3	+	-
TLR 12 (TLR 11)	+	-
TLR 7	-	+
CD11c	++	++

Clec9A: membre 2A de la famille 1 des récepteurs de type lectine de type C, DNGR1: récepteur lectine du groupe 1 des DC et cellules NK, DCIR2: récepteur 2 d'inhibition des DC, HSA: antigène thermostable, Sirpα: protéine a régulatrice de signalisation. D'après (Shortman et Heath, 2010).

van Broekhoven et coll. ont montré un ciblage de DC murines *in vitro* par des liposomes fonctionnalisés avec des anticorps anti-CD11c ou anti-CD205 (van Broekhoven et coll., 2004). De plus, Moriya et coll. ont mis en évidence la plus forte capacité des DC CD8⁺ DEC-205⁺ à induire une réponse immune contre le mélanome que les DC DCIR2⁺ dans le modèle murin B16F10 (Moriya et coll., 2010).

De nombreuses études ont utilisé des liposomes mannosylés pour cibler les cellules dendritiques avec des composés mono-mannosylés (Hattori et coll., 2006 ; Lu et coll., 2007 ; Inoh

et coll., 2009), di-mannosylés (Espuelas et coll., 2008), tri-mannosylés (Copland et coll., 2003) ou tetra-mannosylés (Espuelas et coll., 2008) (Fig. 25). Le groupe de Mitsuru Hashida a mis en évidence une meilleure efficacité de transfection de macrophages murins *in vitro* avec des lipoplexes réalisés avec des liposomes mannosylés et histidylés et une bonne expression *in vivo* dans les cellules dendritiques murines six heures après administration par voie intrapéritonéale de 100µg d'un plasmide codant la luciférase (Hattori et coll., 2006 ; Nakamura et coll., 2009). En effet, l'utilisation des lipoplexes mannosylés a permis *in vivo* une transfection 7 fois plus efficace des DC spléniques par rapport aux lipoplexes non mannosylés (Hattori, 2006). Ils ont mis en évidence que la formation des lipoplexes mannosylés avec un lipide porteur d'un groupement histidyl permet une meilleure expression du transgène dans les macrophages murins *in vitro* que les lipoplexes sans histidyls (Nakamura, 2009). Les capacités de transfection des complexes mannosylés étaient bien dues au mannose comme le montre la forte diminution de l'activité luciférase des macrophages transfectés avec les lipoplexes mannosylés en présence de mannose (Kawakami et coll., 2000).

L'utilisation de lipoplexes mannosylés a permis une transfection plus efficace que les lipoplexes non mannosylés de DC spléniques murins après administration par voie intrapéritonéale de 100µg d'ADN codant la luciférase par Souris (Hattori et coll., 2006).

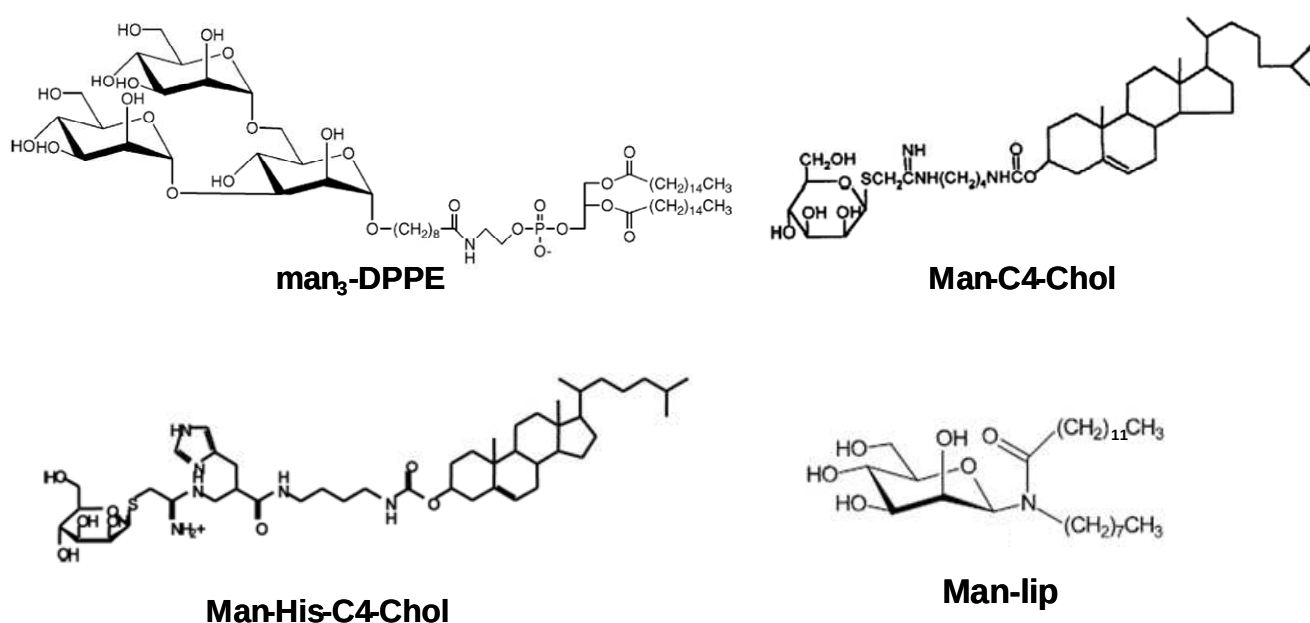


Figure 25 : Formule développée de lipides mannosylés utilisés pour la transfection de cellules dendritiques ou de macrophages. man₃-DPPE : trimannose-dipalmitoylphosphatidylethanolamine) (Copland, 2003); Man-C4-Chol: cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-b-D-thiomannosylethyl) amino)alkyl) formamide (Hashida et coll., 2001); Man-His-C4-Chol : (Nakamura et coll., 2009) ; Man-lip : N-β-D-Mannopyranosyl-N-dodecylhexadecanamide (Montier et coll., 2004).

Ces résultats montrent un ciblage des cellules dendritiques et des macrophages avec des lipoplexes mannosylés. De plus, ils soulignent l'intérêt de l'utilisation de groupements histidyls. Au cours de ma thèse je me suis consacré au développement de lipopolyplexes mannosylés et histidylés pour cibler les cellules dendritiques.

Résultats

Chapitre I : Vaccination anti tumorale contre le mélanome murin B16F10 avec des LPD23 et l'ARNm MART1

A. Comparaison de l'effet vaccinal de l'ARNm MART1 avec une coiffe ARCA ou une coiffe IRES

Une formulation efficace de transfert d'ARNm, les LPR23, a été mise au point au laboratoire par Mickaël Mockey pendant sa thèse. Cette formulation comprend trois partenaires, l'ARNm, des polymères cationiques histidylés de polylysine histidylée PEGylée et des liposomes cationiques histidylés (liposomes 23). Ces vecteurs deviennent fusiogènes en milieu acide et favorisent la délivrance de l'ARNm dans le cytosol après endocytose. L'ARNm a été optimisé par ajout en 5' d'une coiffe ARCA et d'une queue polyA de 100 adénosines. Après injection systémique d'ARNm codant l'antigène de mélanome MART1 sous forme de LPR23, un retard de croissance de tumeurs cutanées et de métastases pulmonaires murines B16F10 a été observé (Mockey et coll., 2007).

L'utilisation de la coiffe ARCA est avantageuse *in vitro* et permet d'augmenter la stabilité et l'efficacité de traduction des ARNm. En effet, ils sont obtenus, par transcription *in vitro*, à partir d'un plasmide matrice codant l'antigène sous le contrôle du promoteur T7 de bactériophage. La transcription est réalisée en présence d'ATP, des nucléotides et un analogue de la coiffe m⁷G grâce à une ARN polymérase de bactériophage.

L'incorporation de la coiffe est nécessaire à l'initiation de la traduction et à la stabilité de l'ARNm mais elle n'est pas optimale lors de la transcription *in vitro* (Mockey et coll., 2006 ; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Il y a en effet premièrement compétition entre l'incorporation de l'analogue m⁷GpppG de la coiffe et le GTP et deuxièmement incorporation de cet analogue dans la bonne ou la mauvaise orientation, c'est-à-dire avec la guanosine méthylée en première ou en deuxième position (m⁷GpppGpN ou Gpppm⁷GpN) ; ces mauvaises incorporations diminuant l'efficacité de la traduction (Pasquinelli et coll., 1995 ; Kuhn et coll., 2010).

Des analogues de la coiffe permettant une incorporation obligée dans la bonne orientation ont été développés dont les analogues ARCA (Jemielity et coll., 2003 ; Kuhn et coll., 2010) (Fig. 26). L'élongation des ARN se fait par liaisons entre les riboses et celle-ci est empêchée à partir de la guanosine méthylée de ces analogues ARCA dont les hydroxyles du ribose sont substitués par des OCH₃ (Fig. 26) soit en 2' m^{7,2'-O}GpppG soit en 3' m^{7,3'-O}GpppG. Les ARNm à coiffe ARCA ont des efficacités de traduction 1,8 fois supérieures aux ARNm sans coiffe ou à coiffe m⁷G dans des lysats de réticulocytes (Stepinski et coll., 2001). De nouveaux analogues contiennent en plus de la modification ARCA sur les riboses une modification phosphorothioate pour augmenter la stabilité des ARNm et sont appelés β-S-ARCA (Grudzien-Nogalska, 2007) (Fig. 26). L'utilisation d'ARNm coiffés avec β-S-ARCA a permis une meilleure expression protéique trois fois supérieure

d'ARNm codant la luciférase *in vivo* chez la souris après injection dans les ganglions inguinaux par rapport aux ARNm coiffés ARCA sous forme nue (Kuhn et coll., 2010).

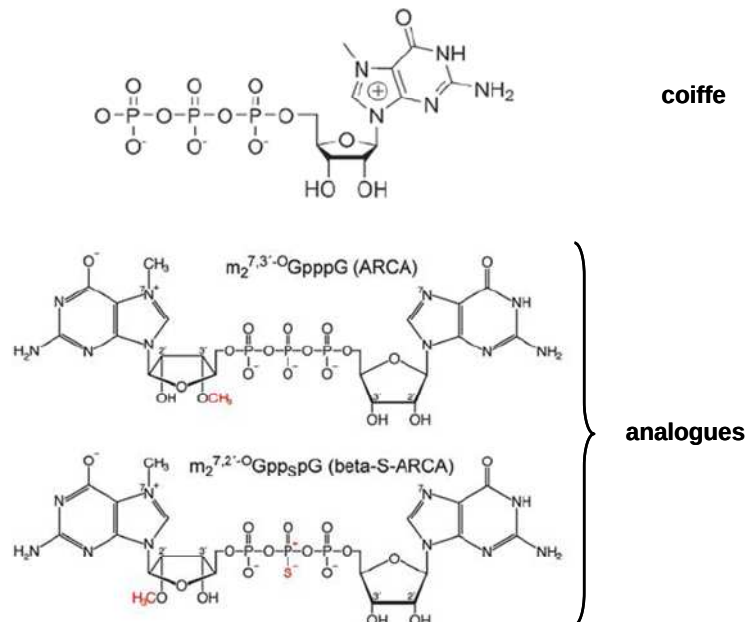


Figure 26 : Structure de la coiffe et de ses analogues chimiques utilisés lors de la transcription *in vitro* (Fischer, 2009 ; Kuhn et coll., 2010).

La préparation en grande quantité d'ARNm pour la vaccination représente un travail important et coûteux. La société CureVac GmbH (Tübingen, Allemagne) produit des ARNm en grande quantité, mais ces ARN ont une queue polyA de 64 adénosines. Comme l'ont démontré précédemment Mockey et coll. cet ARNm n'est pas optimal pour la transfection des DC et la stimulation de CTL spécifiques (Mockey et coll., 2006; Mockey et coll., 2007). Une étape supplémentaire de polyadénylation des ARNm obtenus pour avoir des queues polyA d'au moins 100 adénosines est alors nécessaire. Cependant, la polyadénylation effectuée est peu reproductible comme l'ont montré Holtkamp et coll. en utilisant le même kit de transcription que celui utilisé au laboratoire avec des différences de longueur de queues polyA lorsque des conditions expérimentales similaires sont utilisées (Holtkamp et coll., 2006).

En collaboration avec la société Mitoprod, également spécialisée dans la production de grande quantité d'ARN *via* un système de production *in vivo* chez la levure, nous avons réalisé une matrice ADN IRES-MART-1-A110 permettant d'obtenir en une seule étape, la préparation d'un ARNm coiffé en 5' avec une séquence IRES (Internal Ribosomal Entry Site) et possédant en 3' une queue poly(A) de 110 adénosines sans opération supplémentaire. Par rapport à l'ARNm MART1 utilisé par Mockey, la coiffe ARCA est remplacée par l'IRES du virus EMCV (virus de

l'encephalomyocardite vésiculaire). Cet ARNm diffère donc de celui utilisé précédemment au laboratoire.

Ce procédé permet la production d'ARNm directement coiffés *in vivo*. De plus, la queue polyA de l'ARNm transcrit *in vitro* est ajoutée par polyadénylation alors que celle des ARNm IRES est native et dérive de la séquence matricielle de l'ARNm. La société Mitoprod possède une technologie qui permet de produire en grande quantité ce type d'ARNm en conditions GMP. L'ARNm que nous utilisons est celui de l'antigène MART-1 humain, le même ARNm qui serait utilisé chez l'Homme.

Nous avons comparé l'effet vaccinal des LPR23 contenant les deux types d'ARNm MART-1, l'un avec coiffe ARCA que j'ai produit par transcription *in vitro*, et l'autre avec IRES produit par Mitoprod. Les résultats obtenus montrent que les LPR23 contenant les ARNm IRES permettent d'obtenir un retard de croissance similaire aux LPR23 avec ARNm ARCA (Fig. 27).

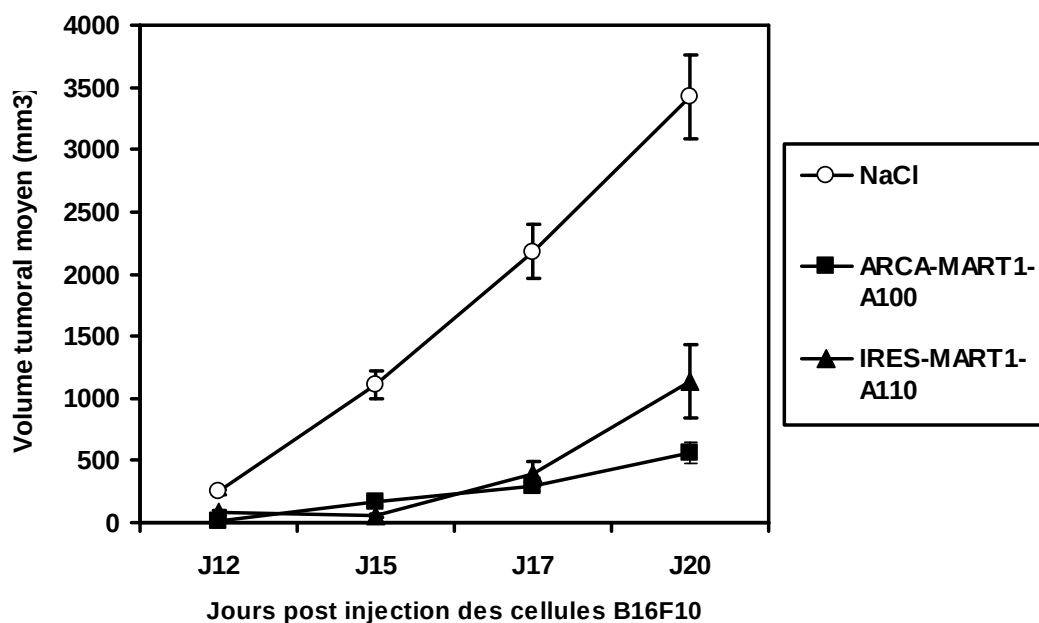


Figure 27 : Inhibition du développement tumoral induite par des LPR23 contenant l'ARNm ARCA-MART1-A100 ou l'ARNm IRES-MART1-A110. Trois groupes de 5 souris ont reçu par voie intraveineuse à J-14 et J-7 des LPR23 contenant 25µg d'ARNm IRES-MART1-A110 ou ARCA-MART1-A110 (200µL). Le groupe contrôle a reçu une solution de 0,15M NaCl. Après implantation intradermique de 10^5 cellules B16F10 à J0, le volume tumoral a été mesuré deux fois par semaine en utilisant un pied à coulisse.

B. Influence de la voie d'administration

Nous avons utilisé l'ARNm IRES pour tester l'efficacité de la vaccination selon différentes voies d'administration. Comme le montrent les résultats de la figure 28, par rapport aux injections intramusculaire et sous-cutanée, seule la voie intraveineuse permet d'obtenir une inhibition de la croissance tumorale. La voie sous-cutanée n'offrait aucune protection. Pour les voies intramusculaire et sous-cutanée, il est possible que les LPR23 ne diffusent pas suffisamment et ne transfectent pas efficacement les cellules présentatrices d'antigènes présentes respectivement dans le muscle et la peau. La voie intraveineuse permettrait une meilleure accessibilité aux organes lymphoïdes comme la rate et une transfection des DC assez importante pour l'induction d'une réponse immune.

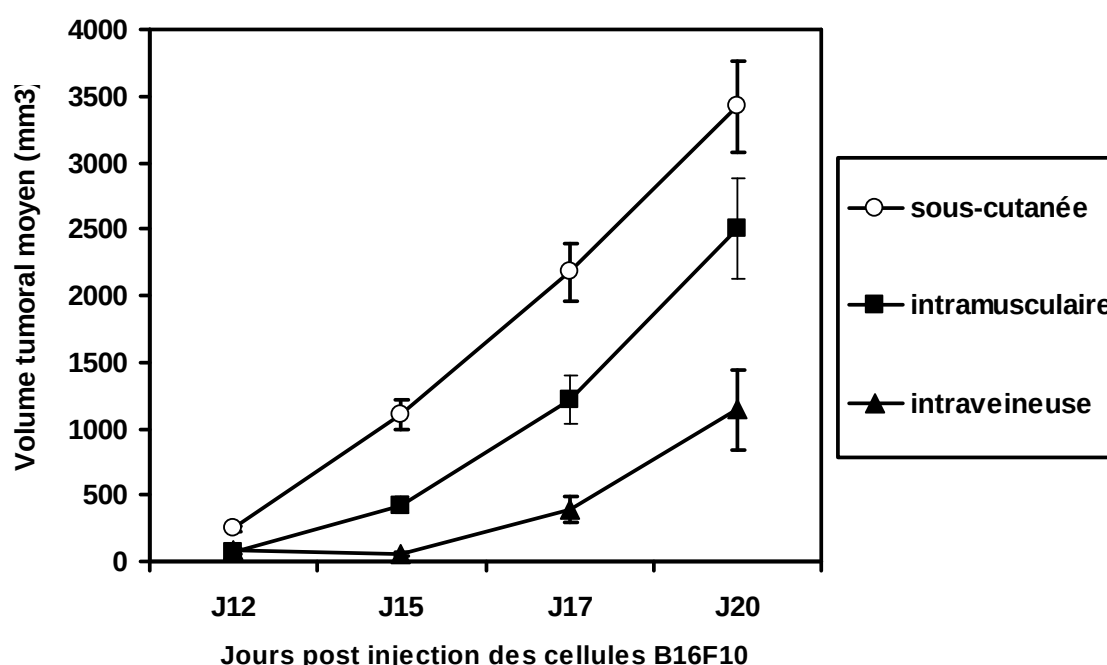


Figure 28 : Influence de la voie d'administration des LPR23 sur l'effet vaccinal. Trois groupes de 5 souris ont reçu par voie intraveineuse des LPR23 contenant 25µg d'ARNm IRES-MART1-A110 soit par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée. Le groupe contrôle a reçu une solution de 0,15M NaCl. Après implantation intradermique de 10^5 cellules B16F10 à J0.

C. Co-administration MART1 / MART1_LAMP1

Mockey et coll. ont montré un meilleur retard de croissance des tumeurs primaires B16F10 lorsque les animaux vaccinés recevaient à la fois des LPR23 contenant de l'ARNm ARCA-MART1 et des LPR23 contenant l'ARNm ARCA-MART1 avec la séquence LAMP1 d'adressage vers les compartiments riches en molécules du CMH de classe II (Mockey et coll., 2007). Nous avons choisi dans un premier temps de remplacer un des deux ARNm par un ARNm IRES produit par Mitoprod.

Comme précédemment, l'administration de LPR23 formulés avec les ARNm IRES MART1 et ARCA-MART1_LAMP1 s'est révélée être la formulation la plus efficace dans le retard de progression de tumeurs primaires (Fig. 29 et 30).

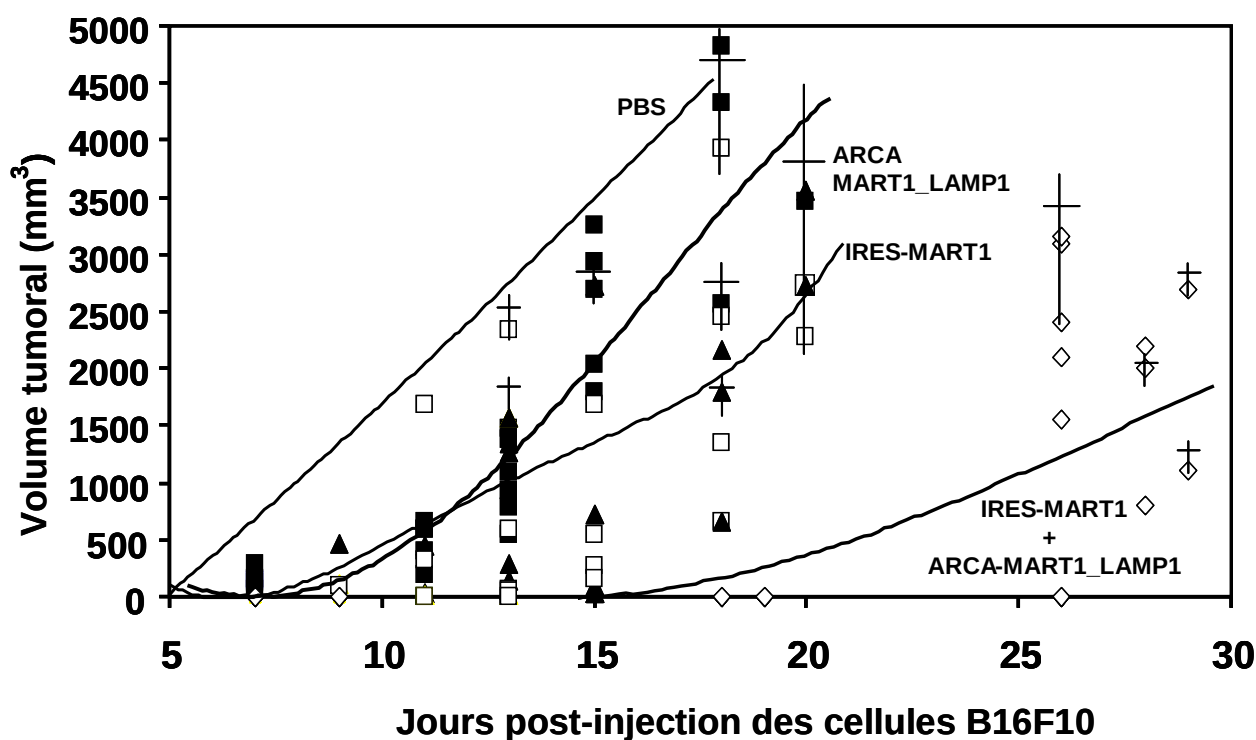


Figure 29 : Effet vaccinal du mélange IRES-MART1 / ARCA-MART1_LAMP1. Les souris ont reçu, par intraveineuse, aux jours -14 et -7 des LPR23 comprenant soit 25µg d'ARNm IRES-MART1-A110 (▲) soit 25µg d'ARNm ARCA-MART1_LAMP1-A100 (□) soit un mélange de LPR distincts de 12,5µg d'ARNm IRES-MART1-A110 d'une part et de 12,5µg d'ARNm ARCA-MART1_LAMP1-A100 (◇) d'autre part, soit du PBS en contrôle (■) avant injection des cellules B16F10 à J0. † Animal mort au jour indiqué. Les courbes représentent l'évolution des volumes tumoraux moyens pour chaque groupe.

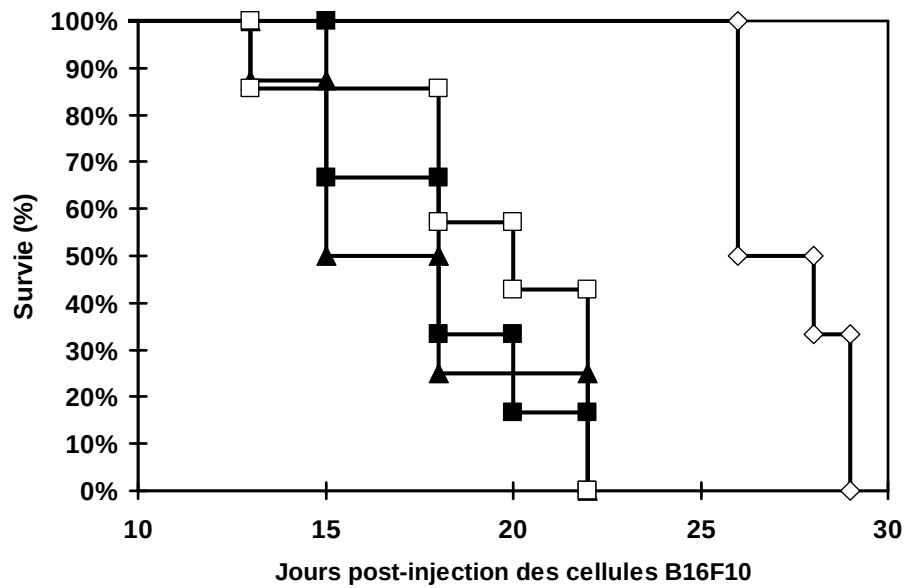


Figure 30 : Courbe de survie des souris porteuses de tumeurs primaires B16F10 vaccinées avec les différentes formulations utilisées en figure 32A. La survie des souris a été comparée entre les groupes par une analyse de Kaplan-Meier, la survie du groupe MART1 + MART1-LAMP1 est statistiquement significative.

Ces résultats (Fig. 29 et 30) montrent un retard de croissance remarquable des tumeurs chez les souris ayant reçu des LPR23 avec ARNm IRES-MART1-A110 et ARCA-MART1_LAMP1-A100 et une augmentation significative ($p = 0.05$ test de kruskal-Wallis) de leur survie suggérant un effet additif. L'effet vaccinal de l'ARNm MART1_LAMP1 seul est très faible. Dans cette série, l'effet vaccinal de l'ARNm IRES-MART1 semble plus faible que celui obtenu dans les figures 27 et 28. Ceci pourrait être dû au fait que les tumeurs des souris non traitées ont une progression plus rapide (3500 mm^3 contre 4500 mm^3).

D. Effet vaccinal sur les métastases pulmonaires

L'effet vaccinal des LPR23 ARNm MART-1 a également été évalué sur un modèle de métastases. Des métastases pulmonaires peuvent être obtenues par injection intraveineuse de 10^5 cellules B16F10. Après deux semaines, les foyers métastatiques sont généralement dénombrés par comptage visuel sous microscope. Cependant, cette méthode rend difficile la détection des micro-métastases et leur numération à des stades précoces. C'est pourquoi, nous avons utilisé des cellules B16F10-GFP-Luc qui expriment les gènes de la protéine verte fluorescente (Green Fluorescent Protein) et de la luciférase. La luciférase permet une amplification du signal et devrait mettre en évidence de faibles quantités de cellules tumorales dans les poumons. La GFP peut être utile pour l'imagerie de fluorescence. Nous avons d'abord vérifié par immunofluorescence que les cellules B16F10 et B16F10-GFP-Luc exprimaient l'antigène MART1 à des niveaux similaires. Comme MART1 est une protéine intracellulaire, les cellules ont été perméabilisées avant l'immunomarquage. Comme le montre la figure 31, les cellules B16F10-GFP-Luc expriment bien MART1 et ce à un niveau comparable aux cellules B16F10 ce qui nous autorise à les utiliser dans des expériences de vaccination avec administration d'ARNm codant cet antigène. Nous avons également vérifié l'expression de la GFP et de la luciférase par les cellules B16F10-GFP-Luc.

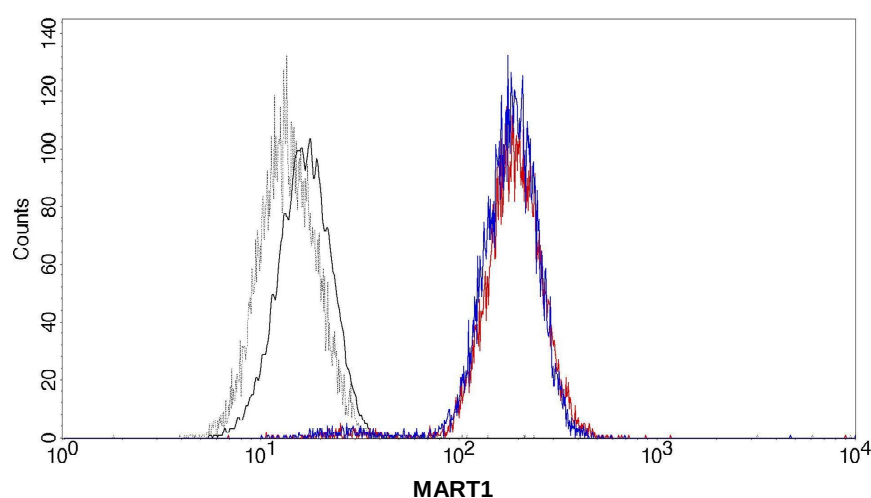


Figure 31 : Mesure de l'expression de la protéine MART-1 dans les cellules B16F10 et B16F10-GFP-Luc. Les cellules B16F10 et B16F10-GFP-Luc ont été perméabilisées au méthanol puis incubées avec un anticorps anti-MART-1-PE ou un isotype-PE avant analyse par cytométrie en flux. Isotype B16F10 (-), Isotype B16F10-GFP-Luc (-), anticorps anti-MART1 sur cellules B16F10, anticorps anti-MART1 sur cellules B16F10-GFP-Luc.

La vaccination des souris avec des LPR23 ARNm IRES MART1 permet une réduction de 85% de l'activité luciférase mesurée dans les poumons (Tableau 10). Cette réduction est associée à un nombre moindre de métastases après comptage visuel. L'administration conjointe de LPR23

avec l'ARNm MART1 et de LPR23 avec ARNm MART1_LAMP1 renforce cette protection et confirme l'effet synergique observé sur les tumeurs primaires.

Tableau 10 : Effet vaccinal sur les métastases pulmonaires.

Formulations	PBS n = 3	MART1 n = 5	MART1 + MART1_LAMP1 n = 5
RLU x 10 ⁶ à J11	268 ± 18,7	41 ± 7,2	5,3 ± 2,2
% d'inhibition	0	85	98

Les souris ont reçu soit du PBS soit des LPR23 contenant l'ARNm IRES-MART1-A110 ou le mélange des LPR23 d'ARNm IRES-MART1-A110 et d'ARNm ARCA-MART1_LAMP1-A100. Les souris ont été sacrifiées 11 jours après l'injection intraveineuse des cellules B16F10-GFP-Luc. L'activité luciférase dans les poumons est exprimée en RLU par mg de protéine. n = nombre de souris. Le bruit de fond mesuré avec des souris n'ayant pas été injectées avec des cellules B16F10-GFP_Luc (n= 3): était de $2 \times 10^4 \pm 9,5 \times 10^3$ RLU/mg.

Il y a donc bien retard de croissance avec une formulation vaccinale contenant un ARNm de coiffe ARCA et un ARNm à coiffe IRES (268×10^6 vs 41×10^6). Il nous reste à évaluer l'efficacité du mélange ARNm IRES-MART1 et ARNm IRES-MART1-LAMP1 sous forme de LPR23.

E. Utilisation d'oligodésoxynucléotides CpG

Afin d'augmenter la réponse immune spécifique induite par les ARNm MART1, nous avons cherché à utiliser des oligodésoxynucléotides (ODN) contenant des motifs CpG non méthylés pour stimuler la réponse immunitaire innée *via* le récepteurs TLR9. L'ODN-CpG utilisé est l'ODN phosphorothioate 1826, efficace dans le modèle murin (Switaj et coll., 2004). Les ODN ont été administrés sous forme de LPD23 formés avec les mêmes rapports acide nucléique / polymères / liposomes utilisés pour l'ARNm. Des souris ont été vaccinées avec des LPR23 d'ARNm MART-1 seuls, ou avec des LPR23 d'ARNm MART-1 et des LPD23 ODN-CpG (25 µg ou 5µg d'ODN-CpG par injection). En contrôle, des souris ont reçu des LPD23 d'ODN-CpG seuls (25µg) ou des LPR23 d'ARNm luciférase. Les résultats obtenus ont montré que l'introduction des ODN-CpG dans le protocole de vaccination n'apporte pas d'amélioration dans la protection des souris contre le développement de tumeurs primaires B16F10 que ce soit en injectant les ODN-CpG le même jour que les ARNm MART-1, 7 ou 14 jours avant les ARNm MART-1. Les quantités d'ODN administrées pourraient être insuffisantes à la stimulation immunitaire ou la stimulation immune induite être insuffisante pour permettre un retard de croissance des mélanomes.

Plusieurs auteurs ont injecté 100µg d'ODN-CpG par souris soit non vectorisés (Chaudhry et coll., 2006 ; Buhtoiarov et coll., 2007) soit complexés à des liposomes cationiques (Wilson et coll., 2009). Nous n'avons utilisé que 25 µg/souris en pensant que la vectorisation sous forme de LPD apporterait un plus ce qui ne semble pas avoir été le cas. L'injection simultanée de LPR d'ARNm MART-1 avec des ODN-CpG non complexés n'a pas été effectuée du fait qu'il y aurait probablement déstabilisation des LPR d'ARNm en présence d'ODN libre.

Il a été rapporté que l'injection de 20µg de CpG 1826 n'a pas produit d'effet sur les tumeurs primaires B16F10 (Kim et coll., 2009). De plus, Fraszczak et coll. ont montré *in vitro* que les cellules dendritiques murines obtenues à partir de cellules souches de la moelle osseuse n'avaient pas d'activité cytotoxique contre des cellules B16F10 après stimulation par des CpG 1826 (Fraszczak et coll., 2010). Ginzkey et coll. ont mis en évidence une augmentation de la taille de gliosarcomes expérimentaux lorsque des ODN CpG étaient administrés de façon stéréotaxique que ce soit avant ou après injection dans le striatum des cellules tumorales (Ginzkey et coll., 2010). Enfin, l'utilisation d'ODN CpG en thérapie anti-mélanome chez l'Homme a donné de faibles taux de réponse (Weber et coll., 2009).

Pour approfondir ces résultats il serait nécessaire d'évaluer l'administration d'oligodésoxynucléotides libres à des quantités plus importantes.

Chapitre II : LPD100 et transfert d'ADN : ciblage de DC avec des LPD100 mannosylés

Au chapitre précédent, nous avons utilisé des LPR formés avec l'ARNm MART1 complexé à la polylysine histidylée PEGylée et aux liposomes cationiques 23. Ces liposomes étaient formés avec la L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide (HDHE, **3**) comme lipide cationique et le cholestérol comme co-lipide dans un rapport molaire 1 : 2 (Schéma 1).

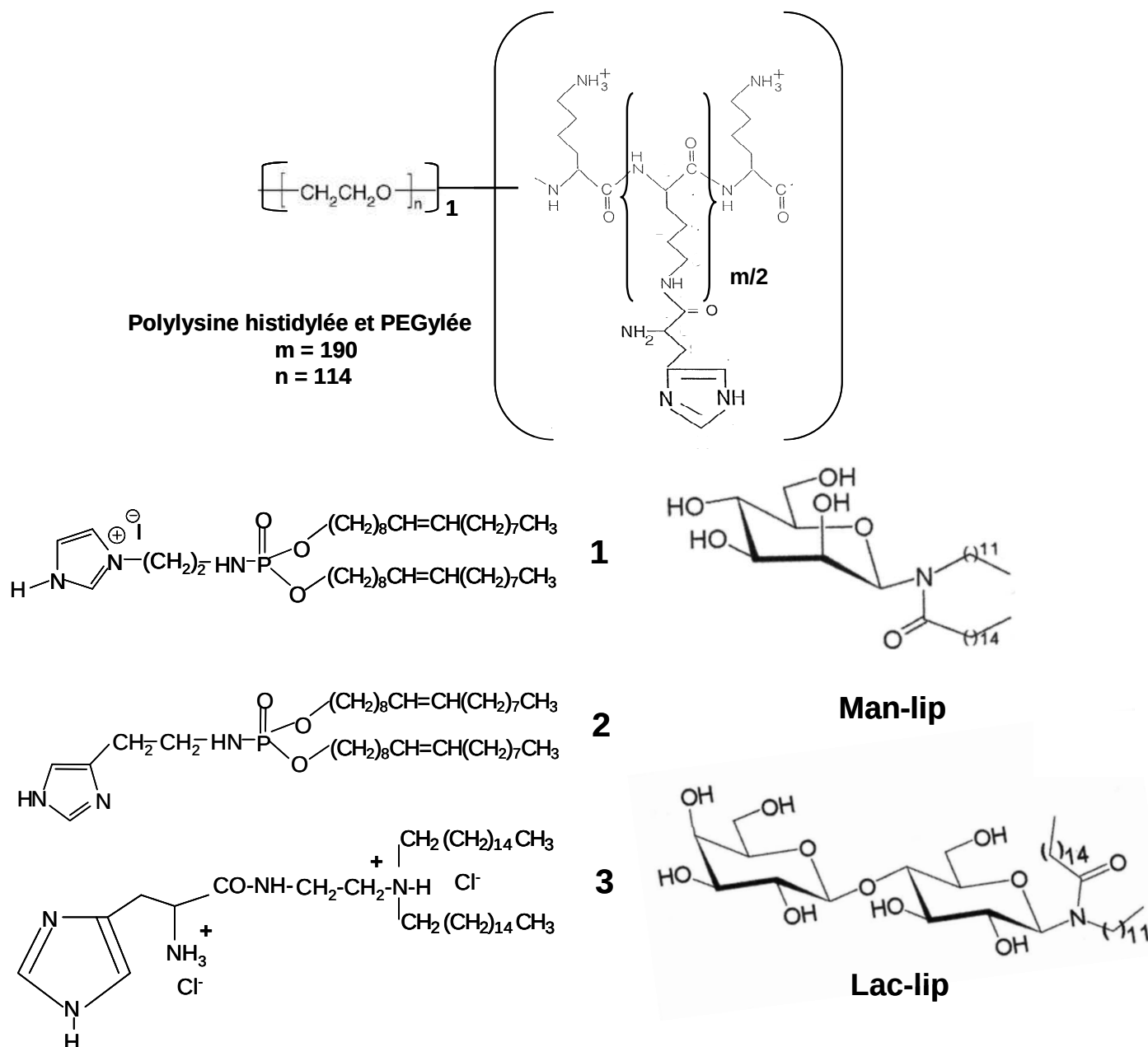


Schéma 1. Structure de la polylysine histidylée PEGylée et des lipides.
 PEG-Hpk : poly-L-Lysine histidylée PEGylée (PEG de 5 kDa) ; 1: O,O-dioléyl-N-[3N-(N-méthylimidazolium iodide)propylène] Phosphoramidate; 2: O,O-dioléyl-N-histamine Phosphoramidate; 3: L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide ;
 Lac-lip : β -D-Galactopyranosyl-(1,4)-N- β -D-glucopyranosyl-N-dodecylhexadecanamide ; Man-lip : N- β -D-Mannopyranosyl-N-dodecylhexadecanamide (Man-Lip) (Kumar et coll., 2003 ; Montier et coll., 2004 ; Mével et coll., 2008).

De nouveaux liposomes, appelés liposomes 100 ont été développés dans l'équipe en collaboration avec le Pr. Paul Alain Jaffrès (Université de Brest). Ils sont composés à part égale, d'un lipide cationique (lipide 1), et d'un colipide neutre pH sensible (lipide 2) (Schéma 1). Le lipide 1 est un lipide cationique de charge permanente portée par un groupement N-methylimidazolium, pour la complexation des acides nucléiques. Le lipide 2 possède est protonable à pH acide ce qui favorise l'échappement endosomal après déstabilisation de la membrane en milieu acide. Dans ces lipides ce n'est pas un ammonium quaternaire mais un atome de phosphore qui fait le lien entre les chaînes carbonées et le noyau imidazole comme dans le cas de la L-histidine-(N, N-di-n-hexadecylamine) ethylamide avec les liposomes 23. Ces lipides sont des lipophosphoramidates dont la structure est inspirée de celles des lipides des membranes qui sont moins toxiques à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Pour les liposomes 23, le groupement pH sensible et la charge permanente sont portés par le même lipide (HDHE) alors que la charge cationique et le groupement pH sensible sont sur deux lipides différents dans le cas des liposomes 100. Ces liposomes permettraient ainsi un meilleur échappement endosomal.

Nous avons utilisé ces derniers pour cibler les cellules dendritiques avec comme objectif l'augmentation de l'effet vaccinal de LPR contenant l'ARNm MART1.

Dans ce chapitre, je vais rapporter les résultats obtenus avec les LPD contenant de l'ADN. En effet, le développement des nouveaux lipopolyplexes a nécessité de nombreuses mises au point, ce qui est plus facile à réaliser avec un ADN plasmidique, moins coûteux et plus facile à préparer en grande quantité. Nous avons émis l'hypothèse que la formation des lipopolyplexes ne dépendait pas drastiquement de la nature de l'acide nucléique.

Je présenterai dans une première partie des résultats montrant que la dialyse des liposomes diminue la cytotoxicité des LPD. Dans une deuxième partie, je montrerai qu'il est possible de conserver les LPD sous forme déshydratée sans perte de leur efficacité de transfection et avec une bonne conservation de leurs paramètres physico-chimiques. Enfin, dans une troisième partie, je présenterai les travaux relatifs à la préparation de LPD mannosylés pour un ciblage des DC.

A. Diminution de la toxicité des LPD en dialysant les liposomes

Un des principaux problèmes des vecteurs cationiques est leur toxicité (Tousignant et coll., 2000). Alors que les liposomes neutres ou anioniques n'entraînent pas de forte toxicité, les liposomes cationiques tels que DOTAP et LipofectAMINE génèrent des radicaux libres de l'oxygène qui sont délétères pour l'organisme (Iwaoka et coll., 2006 ; Yan et coll., 2008). Il a été montré une stimulation de la sécrétion de TNF α par des macrophages humains transfectés avec des liposomes cationiques (Yamane et coll., 2005). Les liposomes cationiques sont toxiques pour les macrophages chez lesquels ils activent la production de molécules inflammatoires (Filion et Phillips, 1997 ; Hashida et coll., 2005). Une toxicité plus importante des lipoplexes par rapport aux liposomes seuls a été démontrée *in vitro* (Nguyen et coll., 2007). De plus, les liposomes et lipoplexes cationiques sont responsables d'hématotoxicité (Norman et coll.; Tousignant et coll., 2000).

Nous avons constaté une diminution de la toxicité des liposomes après dialyse. Les liposomes (500 μ L) ont été dialysés à 4°C dans des boudins de dialyse (Dialysis Tubing Cellulose membrane size : 33mm x 21 mm, Sigma Aldrich, MWCO de 12,4 kDa) contre 500 mL d'HEPES 10mM pH 7,4 pendant 6h puis toute une nuit après changement de tampon.

Pour approfondir ceci, l'influence de la dialyse des liposomes sur la viabilité des cellules en présence des liposomes et des LPD a été étudiée plus finement.

Effet de la dialyse des liposomes sur la viabilité cellulaire

La toxicité des liposomes et LPD a été mesurée par test MTT sur deux types cellulaires : les cellules dendritiques murines DC 2.4 et les cellules épithéliales humaines HeLa. Elles ont été incubées pendant 4h avec des liposomes ou des lipopolyplexes et la toxicité a été évaluée 24h ou 48h après. Les DC 2.4 sont des clones de cellules dendritiques obtenus par l'équipe du Pr. Rock (Shen et Reznikoff, 1997). Elles expriment de forts taux de CMH I et II, de B7-1 et B7-2, de CD32 (Fc γ RII) et CD54 qui sont des marqueurs de DC. Ces cellules expriment également DEC-205 et 33D1, marqueurs plus spécifiques des DC murines.

Les résultats de la figure 32 montrent des effets variables selon le type cellulaire. Ainsi sur les cellules HeLa, les liposomes 23 non dialysés induisent une certaine cytotoxicité (30%) à 24h alors que l'on observe une viabilité supérieure au contrôle à 48h suggérant une division plus importante des cellules. La dialyse de ces liposomes a pour effet de diminuer la toxicité et d'augmenter la viabilité. Dans le cas des liposomes 100, la cytotoxicité observée à 24h qui est de 40% sur les cellules DC2.4 et 10% sur les cellules HeLa est réduite après leur dialyse. Avec les

liposomes 100 une augmentation du nombre de cellules est également mise en évidence après 48h de culture. Nous avons vérifié que cette augmentation ne provenait pas d'une diminution du nombre de cellules dans les contrôles. Resina et coll. ont observé le même phénomène après transfection avec des lipoplexes (Resina et coll., 2009).

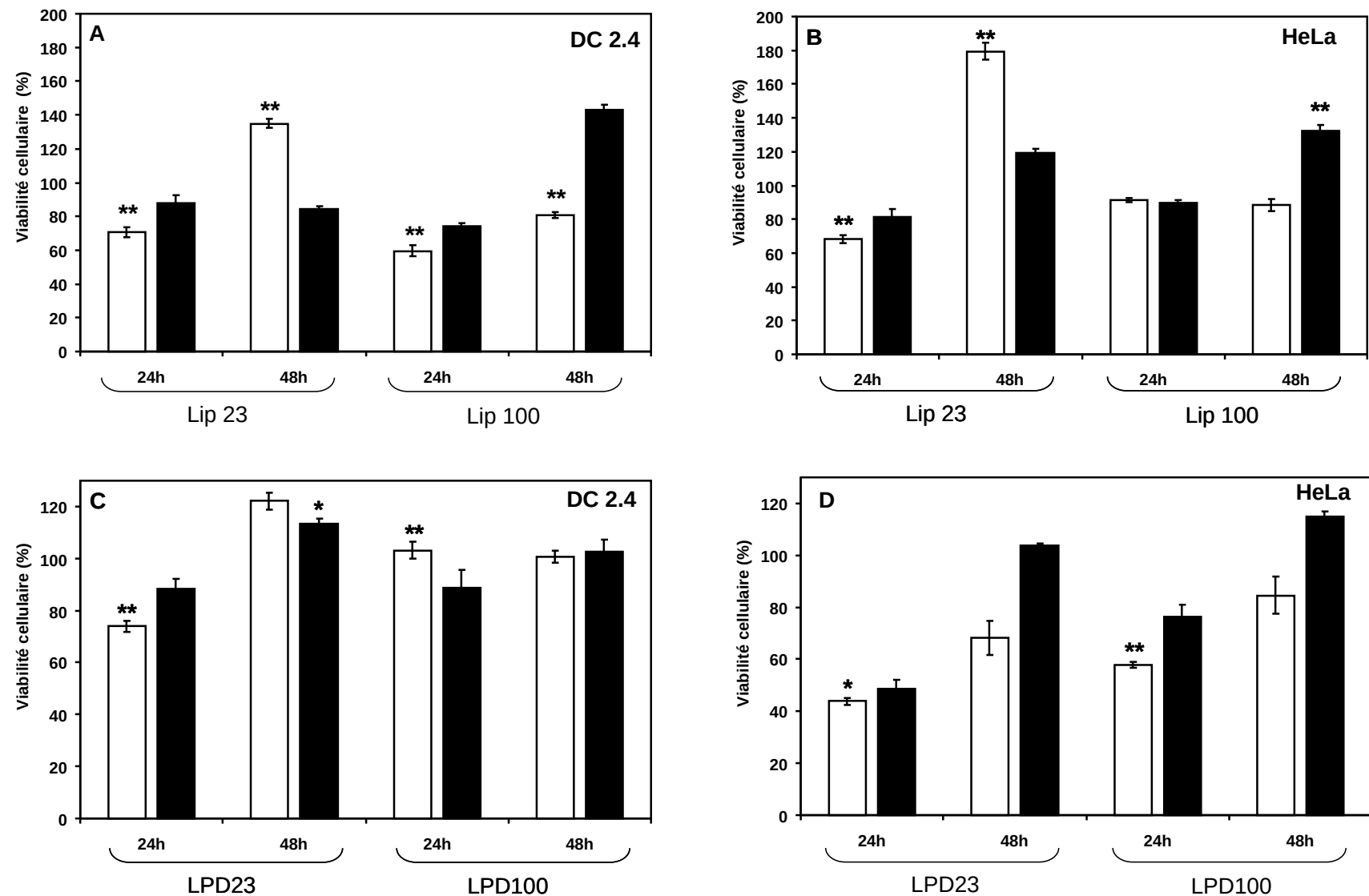


Figure 32: Effet de la dialyse des liposomes sur la viabilité cellulaire. Les cellules DC 2.4 (A et C) et HeLa (B et D) ont été incubées pendant 4h en présence de liposomes non dialysés ou de LPD formés avec des liposomes non dialysés (barres blanches) ou avec des liposomes dialysés ou des LPD formés avec des liposomes dialysés (barres noires). La viabilité cellulaire a été déterminée par test MTT après 24h et 48h de culture ; l'expérience a été faite en triplicat. Analyse statistique : différence statistique dialysés / non dialysés (test de Student); **P< 0,005; *P< 0,01.

La dialyse des liposomes permettrait un équilibre de tampon, un échange ou une élimination des contre-ions ainsi que des lipides non insérés dans des liposomes. Les concentrations en contre-ions ont été mesurées avant et après dialyse des liposomes. L'iodure est le contre-ion des lipophosphoramidates qui constituent les liposomes 100 alors qu'il s'agit de chlorure pour le lipide cationique des liposomes 23. Le nitrate d'argent précipite les halogénures et forme des précipités blanc et jaune respectivement avec les ions chlorures et iodures. Ces précipités noircissent à la lumière. La figure 33 montre que la quantité d'iodure diminue après dialyse des liposomes 100. Aucune différence n'a été détectée pour les liposomes 23 indiquant que la quantité de chlorure est faible dans ces liposomes.

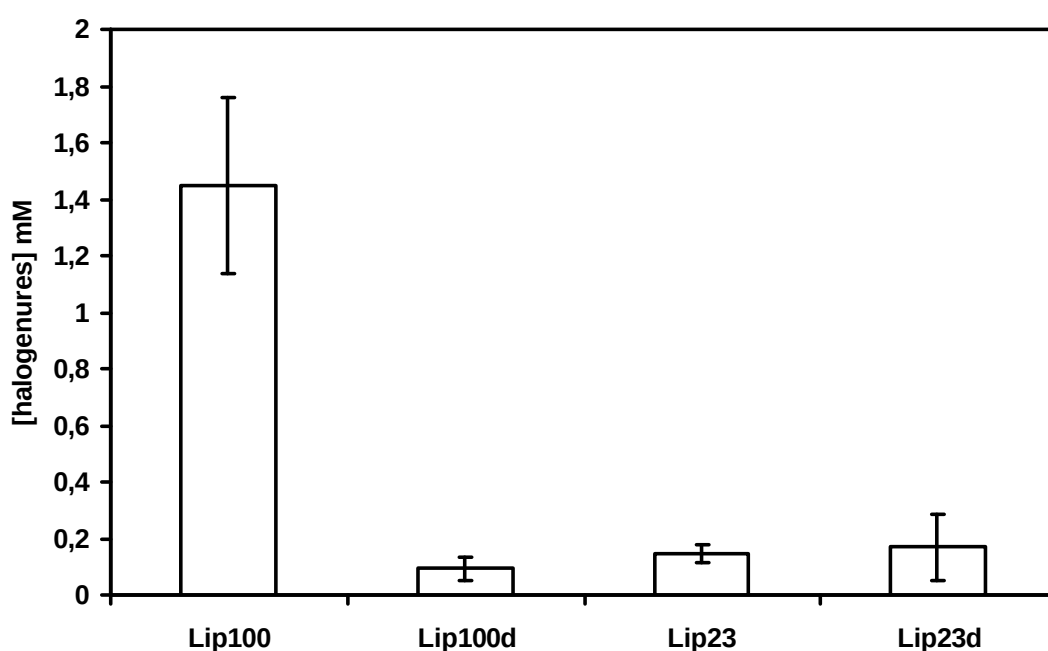


Figure 33: Dosage des halogénures par le nitrate d'argent de liposomes avant et après dialyse. La concentration en halogénures a été mesurée avec le nitrate d'argent et déterminée à l'aide de gammes d'iodure de potassium et de chlorure de potassium. Le dosage a été fait sur des liposomes 100 (Lip100), des liposomes 100 dialysés (Lip100d), des liposomes 23 (Lip23) et des liposomes 23 dialysés (Lip23d). Les valeurs montrées sont représentatives de plusieurs lots de liposomes.

Effets de la dialyse sur les paramètres physicochimiques des liposomes et LPD

La dialyse augmente la taille moyenne des liposomes 100 et 23 respectivement de 63% et 25% (Tableau 11). Les deux types de liposomes ont des tailles proches de 160 nm après dialyse. La charge des liposomes 100 et 23 est diminuée après dialyse. Ceci serait en faveur d'une élimination de lipides cationiques ou de leur redistribution après dialyse. La

dialyse pourrait conduire à une sélection des particules avec fuite des particules de faible taille ce qui conduirait à une augmentation de la taille moyenne des liposomes.

La taille des LPD100 (152 nm) formés avec des liposomes 100 dialysés est 50% plus importante que celle de ceux formés avec des liposomes 100 non dialysés (100 nm). Celle des LPD23 (129 nm) est plus petite qu'avant dialyse (170 nm). Le potentiel ζ des LPD100 est diminué après dialyse (29 mV contre 51 mV) alors qu'il n'y a pas de changement pour les LPD23 (13 mV contre 15 mV).

Tableau 11 : Taille et potentiel zêta des liposomes et lipopolyplexes.

Lip100		
	Taille (nm)	ζ (mV)
Non dialysés	101 ± 3	51 ± 1
Dialysés	163 ± 35	29 ± 7
Lip23		
	Taille (nm)	ζ (mV)
Non dialysés	121 ± 24	21 ± 2
Dialysés	165 ± 21	12 ± 3
LPD100		
	Taille (nm)	ζ (mV)
Non dialysés	103 ± 3	51 ± 1
Dialysés	152 ± 54	36,5 ± 12
LPD23		
	Taille (nm)	ζ (mV)
Non dialysés	170 ± 22	13 ± 2
Dialysés	129 ± 9	15 ± 1,5

Les index de polydispersité des liposomes et LPD étaient compris entre 0,2 et 0,3.

Formation de complexes avec les liposomes dialysés

Nous avons vérifié que les LPD formés avec des liposomes dialysés sont capables de former des complexes avec l'ADN aussi bien que ceux formés avec des liposomes non dialysés (Fig. 34). Les LPD formés avec des liposomes dialysés ou non bien qu'ils aient des tailles ou des potentiels ζ différents sont capables de retarder la migration électrophorétique de la même façon.

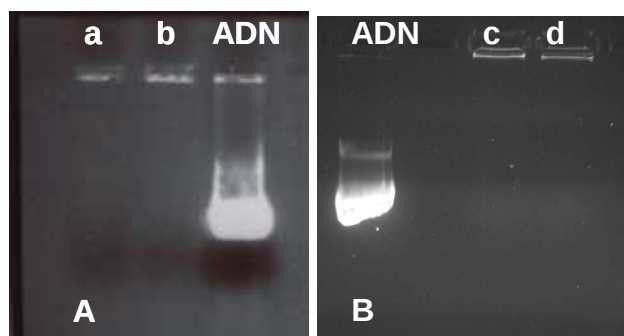


Figure 34: Analyse électrophorétique de migration de l'ADN. Les LPD ont été formés avec des liposomes 23 non dialysés (A a) ou dialysés (A b); avec des liposomes 100 non dialysés (B c) ou dialysés (B d). Les complexes ont été déposés sur gel d'agarose 0,6% puis soumis à électrophorèse. Après 30 min de migration, l'ADN a été révélé sous lumière UV en présence de bromure d'éthidium.

Effet de la dialyse des liposomes sur l'efficacité de transfection

Nous avons ensuite évalué l'effet de la dialyse des liposomes sur l'efficacité de transfection des LPD. Celle-ci a été réalisée en formant des LPD avec de l'ADN codant la luciférase. La dialyse permet d'augmenter l'efficacité de transfection des LPD100 sur les cellules HeLa de plus de 60 fois alors que la différence est moins importante (augmentation de 15 fois) pour les LPD23 (Fig. 35 et Tableau 12). Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans le cas des cellules DC 2.4.

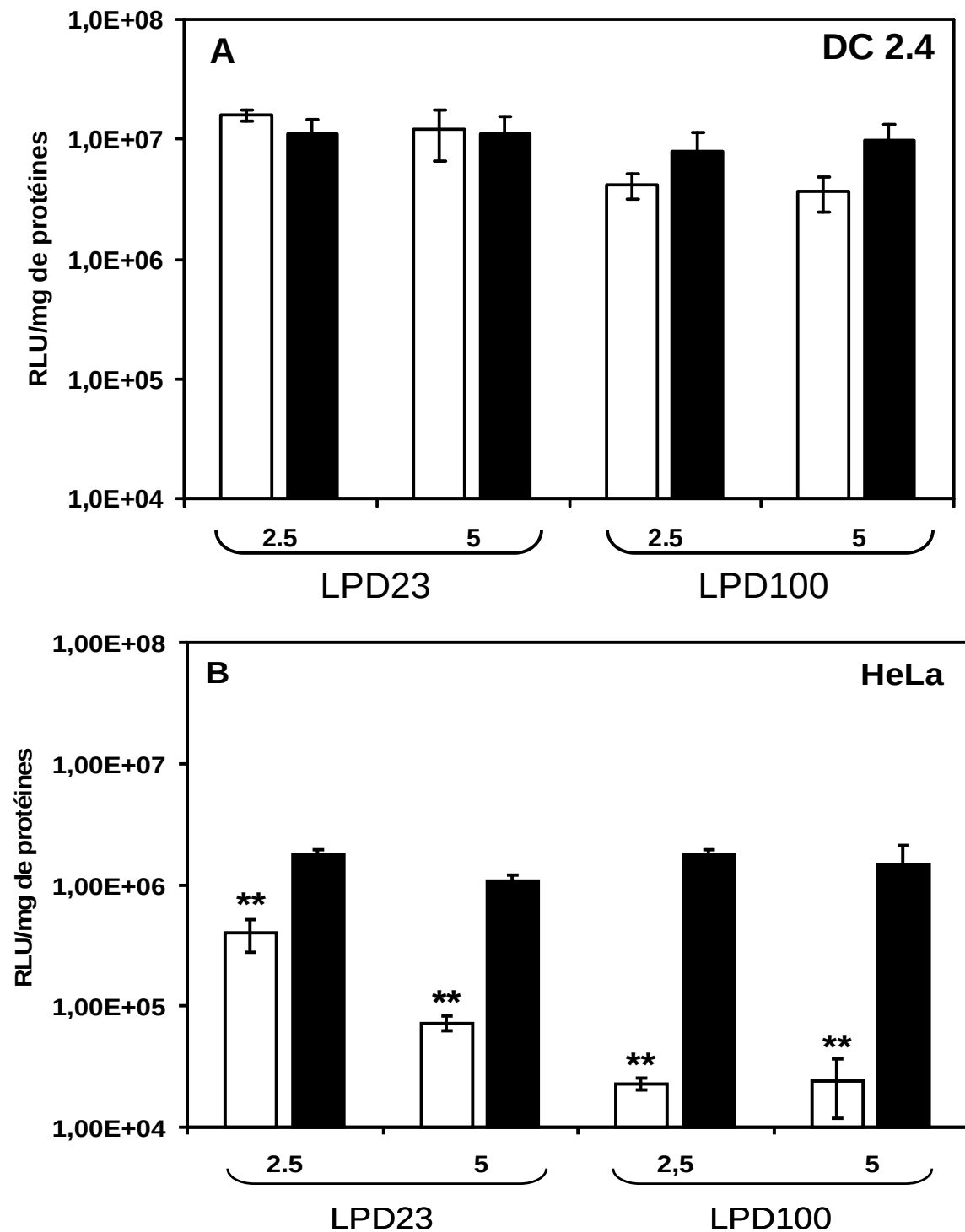


Figure 35: Influence de la dialyse des liposomes sur l'efficacité de transfection des LPD. Les cellules DC 2.4 (A) et HeLa (B) ont été transfectées avec des LPD formés avec des liposomes 23 ou 100 soit non dialysés (barres blanches) soit dialysés (barres noires) avec des LPD contenant soit 2,5µg (2.5) soit 5µg (5) d'ADN pCMV-Luc. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat. Analyse statistique : différence statistique dialysés / non dialysés (test de Student); **P< 0,005.

Tableau 12 : Efficacité de transfection après dialyse.

ADN (µg)	RLU dialysés / RLU non dialysés			
	HeLa		DC 2.4	
	2,5	5	2,5	5
LPD23	4,4 **	14,7 **	0,7	0,9
LPD100	78,5 **	61,6 **	1,9	2,7

Activité luciférase 48h post-transfection de cellules transfectées avec des LPD formés avec des liposomes dialysés ou non. (test de Student); ** p< 0,005.

Conclusion

Nous observons une diminution de la toxicité des liposomes et LPD après dialyse des liposomes. Les résultats observés et les différences entre les cellules HeLa et DC2.4 pourraient s'expliquer par une perturbation de la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que la transfection avec des liposomes cationiques pouvait modifier la densité de charge membranaire et perturber l'activité de protéines associées voire activer des voies de signalisation (Lonez et coll., 2008). Les LPD23 et LPD100 sont formés avec les mêmes acides nucléiques, le même polymère histidylé et des liposomes différents possédant des groupements protonables à pH acide. Il n'est pas exclu que les groupes histidines ou imidazoles jouent un rôle dans ces phénomènes. Nous observons peu de différences entre liposomes 23 ou 100 dialysés ou non alors que les lipides utilisés ont des structures bien distinctes. Trois hypothèses non exclusives sont envisageables : la dialyse permettrait un échange de contre-ions qui modifierait l'activité des liposomes et des LPD, une partie des lipides et liposomes serait adsorbée sur les membranes de dialyse et enfin la purification d'un intermédiaire de synthèse par dialyse. Une étude de filtration des liposomes avec des filtres de porosités connues permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux phénomènes observés.

B. Evaluation de la conservation des lipopolyplexes après déshydratation

Les lipopolyplexes sont des complexes à trois partenaires, ADN ou ARNm, polymère et liposomes qui sont généralement formés extemporanément pour une efficacité maximale ce qui restreint à la fois le personnel capable de les préparer et leur fenêtre de temps d'utilisation. En effet comme le montre la figure 36 les LPD ne se conservent pas à 4°C ou -20°C.

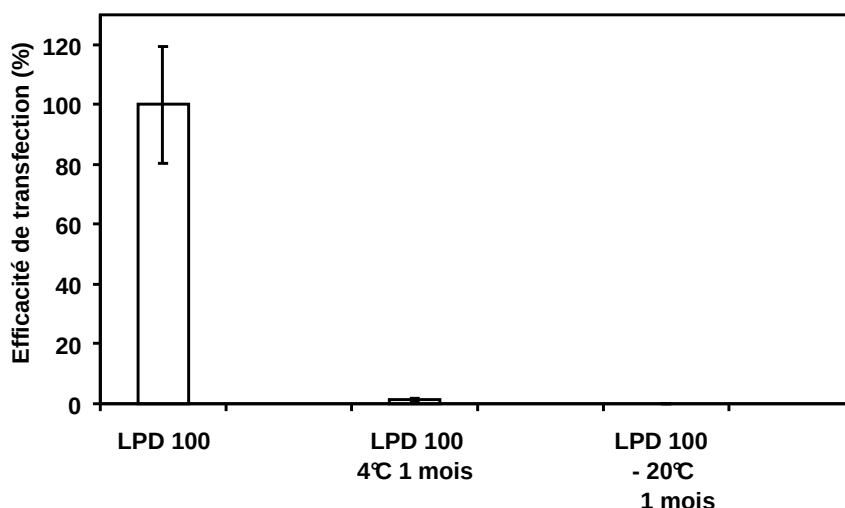


Figure 36 : Efficacité de transfection des LPD après conservation. Activité luciférase de cellules 293 T7 transfectées avec soit des LPD100 préparés extemporanément avec des liposomes 100 soit avec des LPD100 conservés 1 mois à 4°C ou -20°C. L'efficacité de transfection à 48h est exprimée en pourcentage de celle obtenue avec des complexes préparés extemporanément. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat.

Pour dépasser ces instabilités et permettre une conservation durant un temps compatible avec un transport (48h), nous avons envisagé la lyophilisation des LPD. La lyophilisation élimine l'eau d'un système ce qui empêche l'hydrolyse des lipides en produisant une phase solide de faible mobilité moléculaire, supprimant généralement à la fois les instabilités physiques et moléculaires.

La lyophilisation a été utilisée avec des lipoplexes (brevet Leaf, 1996 ; Zhong et coll., 2007 ; Clement et coll., 2005 ; Chen et coll., 2010), polyplexes (Grit et Crommelin, 1993 ; Li et coll., 2000 ; Mao et coll., 2001 ; Sun et coll., 2009 ; Terakita et coll., 2009) et des LPD (Li et coll., 2000 ; Sun et coll., 2009). Nous avons choisi de congeler les complexes lentement avant leur lyophilisation comme (Higgins et coll., 1986 ; Mohammed et coll., 2006).

La lyophilisation se fait en trois étapes : la congélation de la suspension de LPD, le séchage primaire (sublimation de l'eau), le séchage secondaire (élimination de l'eau adsorbée en surface et diminution du contenu en eau pour obtenir une poudre).

De façon générale, les liposomes peuvent être dégradés pendant leur lyophilisation et / ou leur réhydratation si des agents stabilisants ne sont pas utilisés. De telles instabilités entraînent la fusion ou l'agrégation des liposomes en de plus grandes structures. La déshydratation est effectuée avec des tampons à base de Tris, Histidine, HEPES qui ne s'acidifient pas durant la congélation pour limiter la dégradation chimique.

Les disaccharides sont utilisés par de nombreux microorganismes pour résister à la déshydratation et sont utilisés pour la cryopreservation de liposomes (Crowe, 2002). Chez les procaryotes, la protection par les cryoprotectants est expliquée par plusieurs mécanismes dont celui du remplacement de l'eau par ceux-ci entre les molécules, ce qui empêcherait leur agrégation (Potts, 1994 ; Allison et coll., 2000). Plusieurs composés ont été utilisés dont l'inuline (Hinrichs et coll., 2006), le dextran (Hinrichs et coll., 2006), le dextrose, le galactose, le mannose (Li et coll., 2000), le sucrose (Molina et coll., 2001 ; Maitani et coll., 2008), le tréhalose (Anchordoquy et coll., 1997 ; Li et coll., 2000 ; Werth et coll., 2006 ; Mohammed et coll., 2006) et le D- Mannitol (Cortesi et coll., 2000).

a. Lyophilisation des LPD100

La transfection de cellules 293T7 a été utilisée comme test pour évaluer la préservation de l'activité des LPD100 après lyophilisation puis réhydratation après conservation 48h à -20°C. Comme le montre la figure 37, l'efficacité de transfection de LPD100 lyophilisés en absence de NaCl et de cryoprotectant est inférieure de deux ordres de grandeurs à celle de LPD préparés extemporanément. Cette forte diminution d'activité de transfection n'est pas due à une perte de l'ADN lors de la réhydratation des LPD lyophilisés. En effet, les quantités d'ADN après lyophilisation puis réhydratation sont similaires à celles de complexes frais (80-95% du signal de fluorescence au BET). Les mesures d'ADN ont été effectuées à l'aide de bromure d'éthidium après décondensation des complexes par le sulfate de dextran. Comme le montre la figure 38, ce procédé permet d'obtenir avec de l'ADN sous forme de polyplexes ou LPD des signaux d'intensités proches de ceux d'ADN seul.

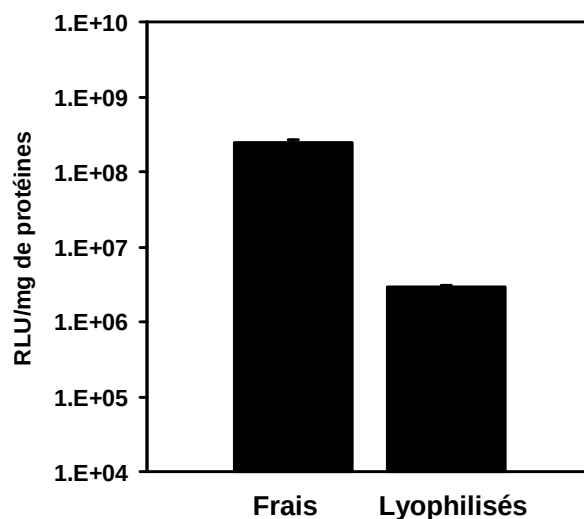


Figure 37 : Effet de la lyophilisation sur l'efficacité de transfection des LPD100 après conservation 48h à -20°C. Les cellules 293T7 ont été transfectées avec soit des LPD100 formés extemporanément (Frais) soit des LPD100 hydratés après lyophilisation (Lyophilisés) préparés avec les liposomes 100 contenant 2,5µg d'ADN. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat.

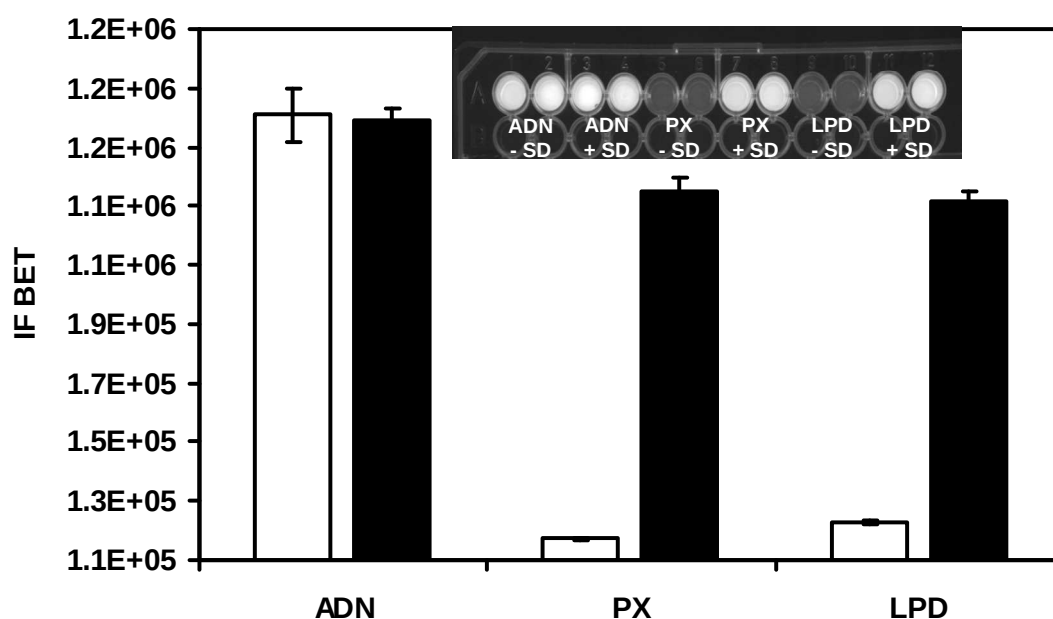


Figure 38 : Evaluation de la quantité d'ADN par fluorescence au BET. La fluorescence de 2,5µg d'ADN sous forme libre ou complexée sous forme de polyplexes (PX) ou de LPD100 (LPD) a été mesurée avant dissociation des complexes (barres blanches) et après leur dissociation par le sulfate de dextran (SD, barres noires). L'encart montre la photographie de la plaque sur laquelle les mesures de fluorescence ont été réalisées après illumination sous UV.

Tableau 13 : Taille et potentiel ζ de LPD100.

Lipopolyplexes frais	Taille (nm)	ζ (mV)
- NaCl	136 $\pm$ 5,4	14,1 $\pm$ 2,5
0,15M NaCl	1141 $\pm$ 179	0,6 $\pm$ 8,2
Lyophilisés	Taille (nm)	ζ (mV)
- NaCl	370 $\pm$ 200	11,5 $\pm$ 2,8
0,15M NaCl	684 $\pm$ 85	-1,9 $\pm$ 2,1
10% saccharose	475 $\pm$ 60	10,1 $\pm$ 2
20% saccharose	702 $\pm$ 490	10,8 $\pm$ 1,5
+ NaCl + Mannitol	3100 $\pm$ 444	168 $\pm$ 30
Evaporés	Taille (nm)	ζ (mV)
0,15M NaCl	785 $\pm$ 140	3,5 $\pm$ 3,7
10% saccharose	283 $\pm$ 5	15,5 $\pm$ 3,8
20% saccharose	180 $\pm$ 31	10,4 $\pm$ 6,2

Les index de polydispersité des liposomes et LPD étaient compris entre 0,2 et 0,3 sauf pour les échantillons avec 0,15 M NaCl pour lesquels ils étaient de 1 montrant une forte polydispersité et une agrégation en présence de sel.

Les LPD100 évaporés ou lyophilisés ont été conservés 48h à -20°C après déshydratation puis réhydratés 1h avant emploi.

Le tableau 13, montre l'impact de la lyophilisation sur la taille des LPD. Les LPD100 frais ont des tailles de 136 $\pm$ 5,4 nm en absence de sel et sont positivement chargés (ζ = 14,1 mV). A une concentration physiologique en sel (0,15M NaCl), ils forment des agrégats de 1,1 μ m. Après lyophilisation en présence de 0,15M NaCl, la taille des LPD100 reconstitués est inférieure de moitié à celles de complexes frais qui forment des agrégats (684 vs 1141 nm). Les sucres et plus particulièrement les disaccharides sont utilisés comme cryoprotectants lors de la déshydratation de liposomes (Allison et coll., 2000). L'ajout de 2mg de D-Mannitol à une solution de LPD100 avant lyophilisation permet d'obtenir 15% de recouvrement de l'efficacité de transfection (Fig. 39). L'utilisation conjointe de NaCl et de D-mannitol est encore plus efficace puisque 20% de recouvrement sont obtenus. Après lyophilisation avec

NaCl et D-Mannitol, la taille des LPD100 augmente cependant fortement (Tableau 13). La lyophilisation ne semble pas être une technique concluante.

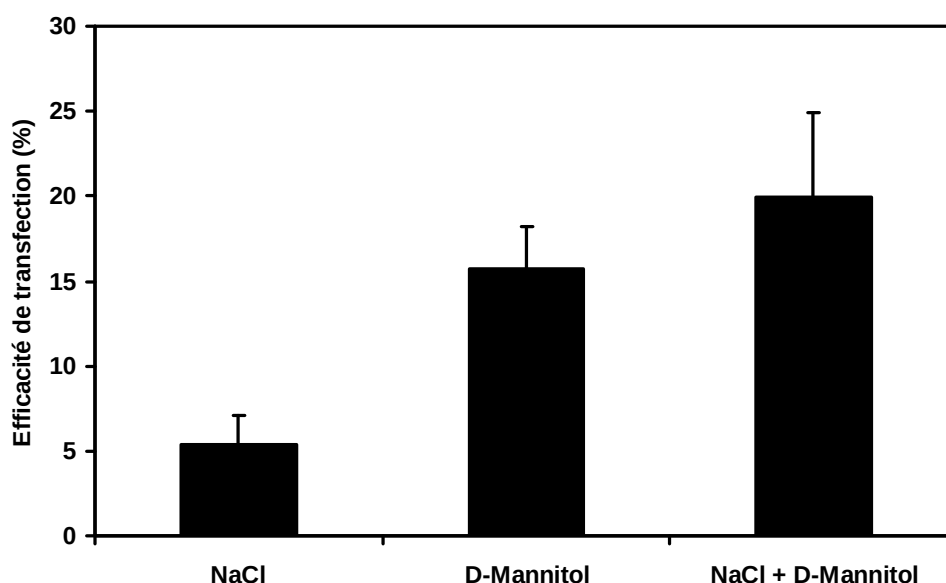


Figure 39 : Effet du NaCl et du D-Mannitol lors de la lyophilisation des LPD100 sur leur efficacité de transfection après conservation 48h à -20°C.

Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des LPD100 contenant 2,5 µg d'ADN soit préparés extemporanément soit lyophilisés avec 0,15M NaCl ; avec 2 mg de D-Mannitol ou avec 0,15M NaCl et 2 mg de D-Mannitol puis conservés 48h à -20°C. Les LPD lyophilisés ont été hydratés pendant 1h avant transfection. L'efficacité de transfection est exprimée en pourcentage de celle obtenue avec des LPD préparés extemporanément. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat. L'efficacité de transfection est exprimée en pourcentage de celle obtenue avec des LPD100 préparés extemporanément.

b. Evaporation des LPD

La congélation des LPD pourrait causer leur agrégation, nous avons alors déshydraté les LPD par évaporation au Speedvac. L'évaporation de LPD100 en présence de 0,15M NaCl permet de retrouver après réhydratation ≈ 50% de l'efficacité de transfection des LPD100 frais (Fig. 40). Le temps optimal d'hydratation est de 1h (Fig. 41). L'évaporation de LPD100 a été réalisée avec 0,15M NaCl, 2 mg de D-Mannitol ou les deux. Comme le montre la figure 40, c'est la condition 0,15M NaCl qui donne les meilleurs résultats.

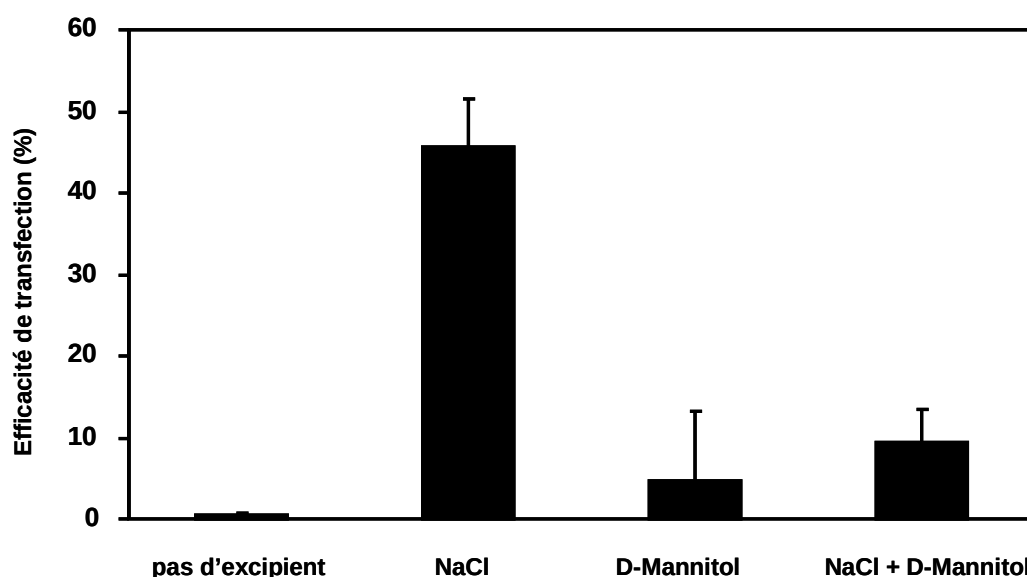


Figure 40 : Effet du NaCl et du D-Mannitol lors de l'évaporation des LPD100 sur l'efficacité de transfection après conservation 48h à -20°C. Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des LPD100 soit préparés extemporanément soit évaporés sans excipient, avec 0,15M NaCl, avec du D-Mannitol ou avec NaCl et D-Mannitol. Les LPD100 ont été hydratés pendant 1h avant leur utilisation. L'efficacité de transfection est exprimée en pourcentage de celle obtenue avec des LPD100 préparés extemporanément. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat.

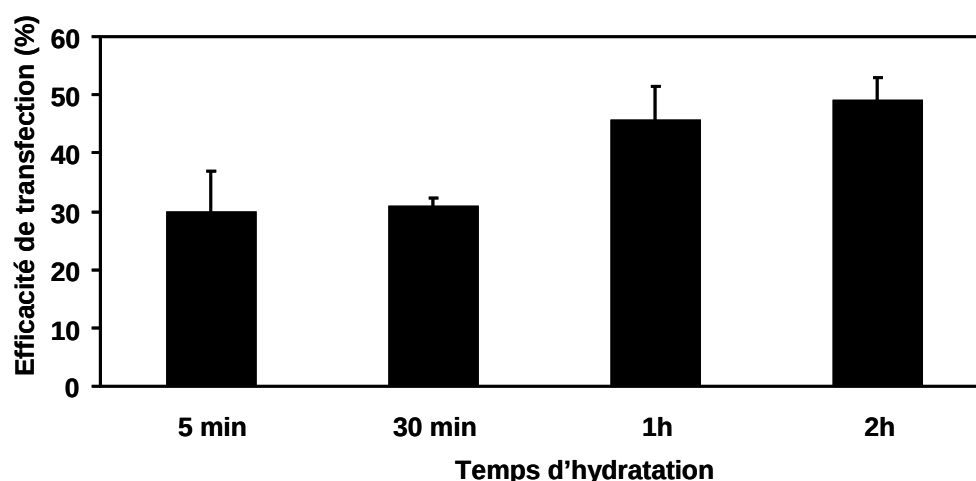


Figure 41 : Influence du temps d'hydratation des LPD évaporés sur l'efficacité de transfection après conservation 48h à -20°C. Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des LPD100 soit préparés extemporanément soit évaporés avec 0,15M NaCl puis hydratés pendant différents temps avant leur utilisation. L'efficacité de transfection est exprimée en pourcentage de celle obtenue avec des LPD100 préparés extemporanément. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat.

Les résultats obtenus avec les LPD100 évaporés sont reproductibles comme le montre la figure 42. Les différences des activités luciférase de cellules transfectées avec trois préparations de LPD100 évaporées différentes entre elles sont non significatives. Cependant, la taille des LPD100 après évaporation en présence de 0,15 M NaCl puis réhydratation est proche du micron (Tableau 13).

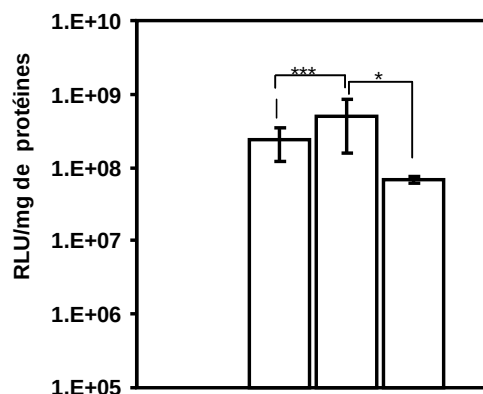


Figure 42 : Reproductibilité des résultats obtenus avec des LPD100 évaporés puis conservés 48h à -20°C. Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des LPD100 évaporés avec 0,15M NaCl. Chaque histogramme montre l'activité luciférase obtenue pour une expérience différente. Un test statistique a été effectué (test de Student): * P = 0,2 ; *** P = 0,4. Les LPD ont été hydratés pendant 1h avant leur utilisation. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection.

La reconstitution de LPD évaporés ou lyophilisés en présence 0,15M NaCl et/ou de D-Mannitol permet un certain recouvrement de l'efficacité de transfection des LPD mais la taille des LPD est énorme. Nous avons donc utilisé un autre cryoprotectant, le saccharose, déjà utilisé par d'autres auteurs pour des LPD ADN / protamine sulfate / liposomes DOTAP-DOPE 1 :1 et des LPD ADN / protamine sulfate / liposomes DOTAP-Cholestérol 1 :1 (Li et coll., 2000 ; Molina et coll., 2001). L'utilisation de ce disaccharide permet la reconstitution de LPD100 avec une taille de 180 nm proche de celles de LPD100 préparés extemporanément (152 nm) après reconstitution de LPD100 évaporés en présence de 20% de saccharose (Tableau 13). Ce qui n'est pas le cas avec lyophilisation des LPD100 en présence de saccharose (700 nm). Par rapport aux LPD frais, ces LPD évaporés ont des potentiels ζ plus faibles de moitié (10 mV et 20 mV, Tableau 13). La capacité de transfection après réhydratation de LPD100 après lyophilisation n'a donc pas été évaluée.

Les résultats de transfection de la figure 43 montrent que les LPD100 évaporés en présence de 10% et 20% de saccharose puis conservés 48h à -20°C et reconstitués pendant 1h sont aussi efficaces voire plus efficaces (4 fois plus avec 20% de saccharose) que les LPD100 préparés extemporanément. Une augmentation de l'efficacité de transfection de LPD après lyophilisation puis réhydratation avait été observée par Li et coll. (Li, 2000). Le saccharose est donc un meilleur cryoprotectant pour nos LPD que le mannitol. De plus, ces LPD100 ont des tailles et potentiels ζ similaires à ceux de LPD100 formés extemporanément (Tableau 13).

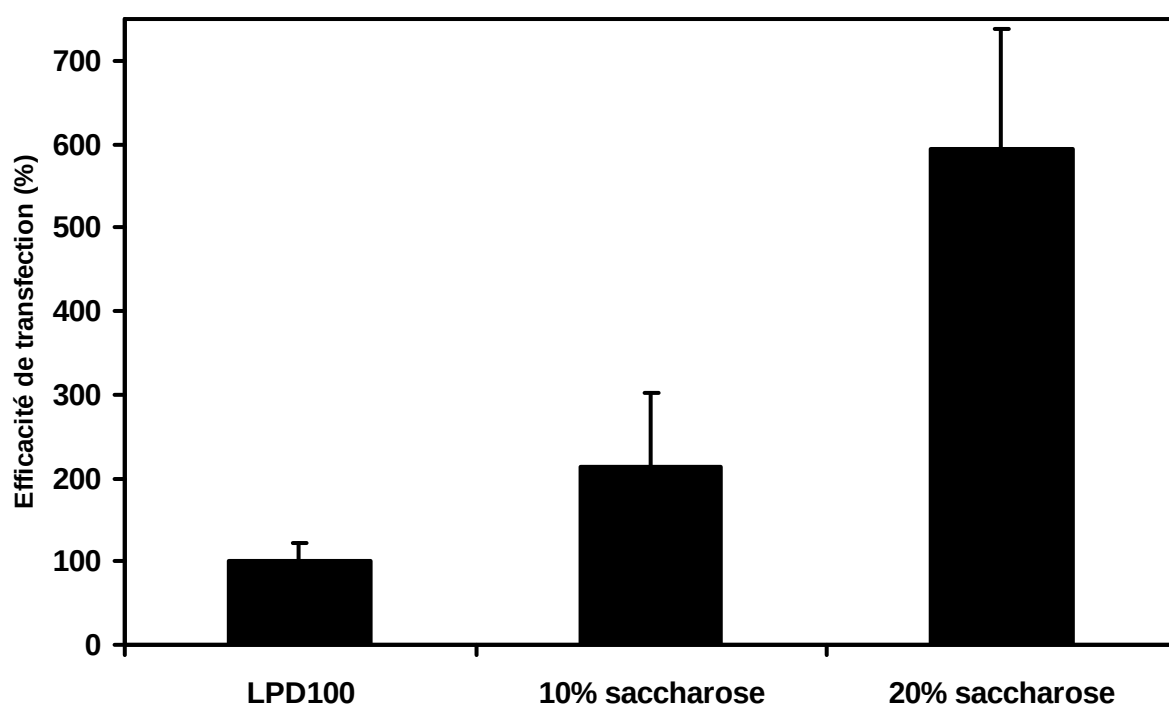


Figure 43 : Recouvrement de l'efficacité de transfection de LPD100 évaporés en présence de saccharose puis conservés soit 48h à -20°C. Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des LPD100 soit préparés extemporanément soit évaporés en présence de 10% ou 20% de saccharose puis conservés soit pendant 48h à -20°C puis reconstitués pendant 1h avant transfection. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et les moyennes montrées sont issues de deux expériences en duplicat différentes.

J'ai également transfecté des cellules 293T7 avec des LPR100 contenant de l'ARNm luciférase évaporés puis conservés pendant un mois à -20°C. Seuls 10% d'efficacité de transfection ont été obtenus. Il est probable que ces LPR soient mieux conservés à -70°C. Cette perte d'efficacité de transfection ne semble pas due à une agrégation des complexes car ceux-ci ont des tailles proches de LPR100 formés extemporanément (Tableau 14). De plus, le

signal BET était augmenté avec des LPR conservés un mois à -20°C ce qui suggère une modification de leur structure notamment une décondensation.

En effet, la structure des complexes semble un paramètre important comme le montre la meilleure efficacité de transfection de polyplexes avec PEI linéaire par rapport à ceux avec le PEI branché après lyophilisation puis réhydratation (Hahn, 2010).

Comme pour les complexes avec l'ADN, bien que les complexes avec l'ARNm aient des tailles et potentiels ζ similaires à ceux de LPR100 formés extemporanément, leur efficacité de transfection est bien plus faible. Les nanoparticules résultant de l'hydratation de LPD100 conservés un mois à 4°C ou -20°C pourraient avoir des morphologies différentes de celles des LPD formés extemporanément, morphologies moins efficaces en transfection. C'est pourquoi, une analyse de microscopie électronique des LPD100 déshydratés puis réhydratés doit être réalisée.

Tableau 14 : Taille de lipopolyplexes 100 évaporés en présence de saccharose conservés pendant un mois à -20°C pour ceux avec ARNm.

	ARNm		
	Taille (nm)	ζ (mV)	BET (%)
Frais	157 ± 8,5	19,4 ± 1,6	100 ± 17
Evaporés 20% saccharose	222 ± 53	17,2 ± 1,2	124 ± 2,6

Les valeurs indiquées sont des moyennes issues de deux expériences différentes avec deux tubes à chaque fois.

c. Lipopolyplexes formés avec des polyplexes déshydratés

Les LPD100 ont été préparés par addition des liposomes 100 à des polyplexes (ADN/polylysine histidylée PEGylée) déshydratés. En effet, plusieurs articles ont montré que la lyophilisation est efficace pour les polyplexes ADN / PEI (Hobel et coll., 2008), ODN / PEI (Brus et coll., 2004) ou siRNA / PEI (Werth et coll., 2006). Nous avons supposé que la perte d'efficacité de transfection des LPD100 après lyophilisation était due à la partie liposome des LPD. L'efficacité de transfection des polyplexes seuls est très bien préservée après évaporation ou lyophilisation puis réhydratation (Fig. 44). De même, les LPD100 préparés avec des polyplexes évaporés se sont révélés des transfectants aussi performants (on peut noter une légère augmentation) que les LPD100 préparés extemporanément (Fig. 45) avec

cependant un doublement (10% de saccharose) de leur taille voire un triplement (20% de saccharose) (Tableau 15). En effet, Molina et coll. ont montré que des quantités plus importantes de sucrose sont nécessaires à la préservation de taille de polyplexes PEI par rapport à des LPD protamine / DOTAP-DOPE (Molina et coll., 2001). Un plus grand pouvoir transfectant de complexes lyophilisés puis reconstitués par rapport aux complexes préparés en solution extemporanément avait déjà été mise en évidence par Huang Leaf avec des lipoplexes ADN / liposomes DC-Chol/DOPE 3 :2 (brevet (Leaf, 1996)).

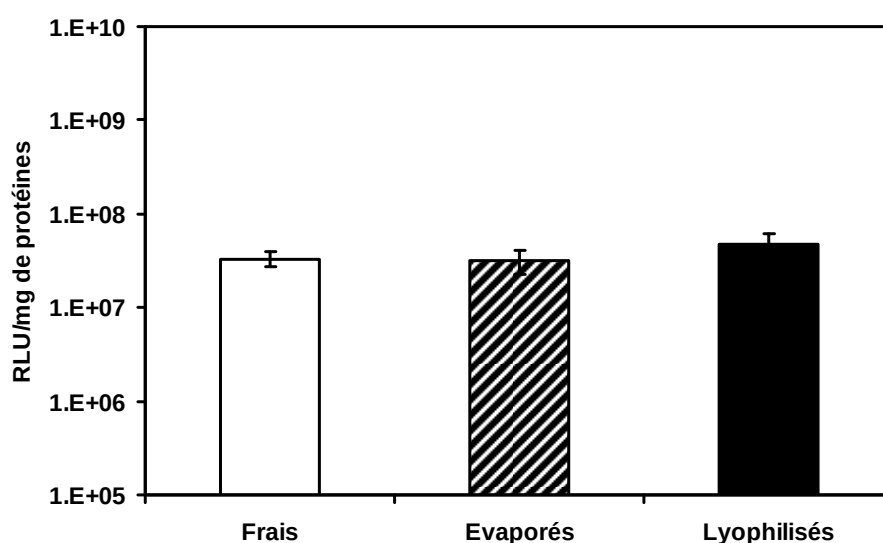


Figure 44 : Influence de la déshydratation sur l'efficacité de transfection des polyplexes ADN / polylysine histidylée PEGylée après conservation 48h à -20°C. Les cellules 293 T7 ont été transfectées avec des polyplexes soit préparés extemporanément (Frais) soit évaporés ou lyophilisés en présence de 0,15M NaCl puis reconstitués pendant 1h avant transfection. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et l'expérience a été faite en triplicat.

Tableau 15 : Taille et potentiel ζ de LPD100 préparés à partir de polyplexes évaporés.

Lipopolyplexes préparés avec des polyplexes évaporés		
	Taille (nm)	ζ (mV)
LPD100 frais	136 $\pm$ 5,4	14,1 $\pm$ 2,5
Polyplexes évaporés 10% saccharose	271 $\pm$ 36	31 $\pm$ 0,2
Polyplexes évaporés 20% saccharose	382 $\pm$ 34,5	27 $\pm$ 0,6
Polyplexes évaporés 0,15 M NaCl	658 $\pm$ 42	

Les polyplexes déshydratés ont été conservés 48h à -20°C puis reconstitués pendant 1h. Les index de polydispersité des liposomes et LPD étaient compris entre 0,2 et 0,3.

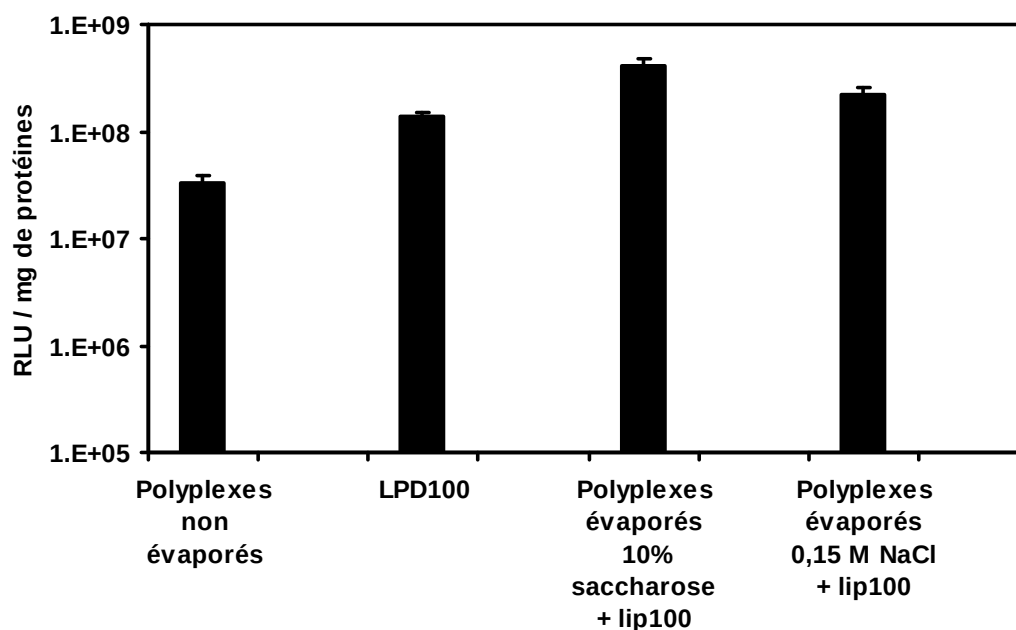


Figure 45 : Formation de LPD100 avec des polyplexes évaporés. Des cellules 293 T7 ont été transfectées avec des polyplexes ou des LPD100 préparés extemporanément, des LPD100 préparés par addition de liposomes 100 (lip100) à des polyplexes évaporés en présence de 10% de saccharose, des LPD100 préparés par addition de liposomes 100 (lip100) à des polyplexes évaporés en présence de 0,15 M NaCl. Les polyplexes déshydratés ont été conservés 48h à -20°C puis reconstitués pendant 1h. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection, l'expérience a été faite en triplicat.

L'activité luciférase est supérieure avec des LPD100 formés par addition de liposomes à des polyplexes évaporés en présence de 10% de saccharose par rapport à ceux évaporés avec 0,15 M NaCl. De plus, ces derniers forment des LPD100 de taille plus importante que ceux évaporés en présence de saccharose (658 nm contre 270 nm avec 10% de saccharose et 380 nm avec 20% de saccharose). Ces résultats confirment que le saccharose est un bon cryoprotectant.

La taille de LPD100 formés avec des polyplexes évaporés en présence de 20% de saccharose (380 nm) est supérieure à celle des LPD100 évaporés en présence de saccharose (180 nm) alors que leurs capacités de transfection sont similaires. L'évaporation des LPD100 est plus intéressante car une seule étape est nécessaire pour les reconstituer et leur taille reste inférieure à 200 nm.

Conclusion

Les LPD sont des complexes ternaires préparés extemporanément et la mise au point d'un procédé permettant leur utilisation après simple reprise dans l'eau permettrait leur utilisation par du personnel peu habitué à la formation de complexes. De plus, la déshydratation des LPD permettrait leur stockage et leur transport.

Bien que dans certains cas, l'efficacité de transfection soit conservée, seule l'évaporation des LPD100 en présence de 20% de saccharose permet à la fois un bon recouvrement de l'efficacité de transfection et d'obtenir après réhydratation des LPD100 ayant une taille proche de LPD100 préparés extemporanément après conservation pendant 48h à -20°C, temps nécessaire à leur transport.

Une alternative serait de lyophiliser les polyplexes et de reconstituer les LPD100 par ajout de liposomes frais. Ces LPD100 sont cependant plus gros (380 nm) et un peu plus positifs que les précédents. Nous avons ici trouvé des conditions de conservation des LPD100 ou des polyplexes contenant de l'ADN. Cependant, il nous reste à adapter ces conditions pour l'ARNm.

C. Ciblage des cellules dendritiques avec des LPD100 mannosylés

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules très importantes du système immunitaire. Celles-ci jouent un rôle de sentinelles et d'activatrices de cellules effectrices comme les lymphocytes T. La capture des antigènes par ces cellules permet le développement d'une réaction immune spécifique dirigée contre ceux-ci

Pour augmenter la capture des ARNm par les DC, un ciblage des LPD a été envisagé. Le ciblage peut être obtenu en couplant aux LPD, des molécules reconnues spécifiquement par des récepteurs présents à la surface des DC et capables d'induire leur endocytose. Les cellules dendritiques présentent à leur surface des récepteurs de type lectine reconnaissant des structures saccharidiques plus ou moins complexes. Aussi, nous avons choisi le récepteur mannose (voir généralités p. 64-69) déjà visé pour cibler des lipoplexes vers les DC chez la souris.

J'ai préparé des liposomes 100 et des LPD100 mannosylés en incorporant un lipide mannosylé dans la formulation liposomique. J'ai ensuite évalué leur sélectivité pour les DC en termes de fixation, d'endocytose et de transfection.

Plusieurs méthodes étaient envisageables pour coupler le mannose aux liposomes :

- Une introduction d'une fonction chimique aux lipides constituant les liposomes pour permettre, après formation des LPD, le couplage de mannose fonctionnalisé à leur surface. Cette approche a été utilisée en faisant réagir un composé lactosylé possédant un groupement azoture avec des lipides de liposomes préformés porteurs d'une fonction réactive triphosphine par réaction de Staudinger (Zhang et coll., 2009).
- Un couplage de mannose fonctionnalisé directement sur une partie des lipides des liposomes. Il peut exister cependant le risque de perturber la formation des LPD et la nécessité de purification supplémentaire.
- Un ajout d'un glycolipide lors de la formation des liposomes 100 et l'utilisation de ces glycoliposomes pour la préparation de LPD mannosylés.

C'est cette dernière stratégie qui a été mise en œuvre en incorporant le lipide *N*- β -D-Mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide (Man-lip) synthétisé par l'équipe du Pr.

Benvegna (Rennes). Le développement des lipopolyplexes mannosylés a d'abord été réalisé pour le transfert de gènes en utilisant de l'ADN plasmidique. Ce travail est présenté dans la publication *Journal of Drug Targeting* qui est résumé ci-dessous.

Au mieux, 11% de glycolipides mannosylés et 6% de glycolipides lactosylés ont pu être incorporés dans les liposomes. Les glycolipides utilisés possèdent des chaînes C11:0 et C14:0 alors que les lipophosphoramidates ont des chaînes oléyl C18:1. Les glycolipides sont donc plus solubles dans l'eau que les lipophosphoramidates. Le lactose est un disaccharide alors que le mannose est un monosaccharide, la partie polaire du lipide lactosylé est donc plus volumineuse. Cette différence de structure pourrait expliquer la plus faible incorporation des glycolipides lactosylés dans les liposomes par rapport aux glycolipides mannosylés.

L'utilisation de liposomes comprenant 11% de ce lipide mannosylé a permis d'obtenir une meilleure internalisation des liposomes et LPD mannosylés par une lignée de DC murines (DC 2.4) et une meilleure efficacité de transfection de ces cellules par rapport aux LPD non mannosylés ou porteurs d'un glycolipide lactosylé ; le lactose qui n'est pas reconnu par les DC est un contrôle négatif. La transfection des DC 2.4 avec les LPD mannosylés est fortement inhibée en présence de mannose libre. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une spécificité des LPD100 mannosylés pour les DC.

A l'aide de DC 2.4 exprimant des protéines chimères spécifiques des endosomes précoces (rab 5) et tardifs (rab 7) fusionnées à la protéine fluorescente EGFP, nous avons montré que l'internalisation des LPD mannosylés et non mannosylés utilise la voie clathrine dépendante. L'endocytose est plus rapide dans le cas des LPD mannosylés. Le gain apporté aux LPD par l'incorporation du glycolipide mannosylé semble donc dû à une interaction *via* le récepteur mannose.

Ces résultats ont permis de montrer que les LPD100 mannosylés (Man₁₁-LPD100) permettent un ciblage sélectif de DC *in vitro* avec une meilleure internalisation et une meilleure transfection. Ces LPD100 mannosylés semblent très utiles pour cibler les DC *in vivo*, ce qui montre l'intérêt de leur utilisation avec l'ARNm MART1 afin d'obtenir une meilleure réponse immune spécifique vis-à-vis du mélanome B16F10.

RESEARCH ARTICLE

Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes

Federico Perche¹, David Gosset¹, Mathieu Mével², Marie-Laure Miramon³, Jean-Jacques Yaouanc², Chantal Pichon¹, Thierry Benvegna³, Paul-Alain Jaffrès², and Patrick Midoux¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, University of Orléans and Inserm, Orléans Cedex 2, France, ²CEMCA, UMR CNRS 6521, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Faculté des Sciences et Techniques, IFR 148 ScInBioS, Brest, France, and ³UMR CNRS 6226, Ecole nationale supérieure de chimie de Rennes, Rennes, France

Abstract

We report for the first time preparation of mannosylated and histidylated lipopolyplexes (Man-LPD100) with uptake and transfection selectivity for dendritic cells (DCs). Man-LPD100 were prepared by addition of mannosylated and histidylated liposomes (Man-Lip100) on preformed PEGylated histidylated polylysine/DNA polyplexes. Man-Lip100 comprised a cationic [O,O-dioleoyl-N-(3N-(N-methylimidazolium iodide)propylene) phosphoramidate] lipid, a neutral [O,O-dioleoyl-N-histamine Phosphoramidate] co-lipid and β -D-mannopyranosyl-N-dodecylhexadecanamide (Man-lipid). At the best, Man-Lip100 containing 11 mol % Man-lipid was obtained. We found that dialysis of liposomes completely abolished cytotoxicity. We showed that the uptake of Man₁₁-LPD100 by the murine DC line (DC2.4 cells) was at least 10-fold higher than that of Lac₆-LPD100. A confocal microscopy study with DC2.4 cells expressing Rab5-EGFP or Rab7-EGFP, revealed that DNA uptake occurred through clathrin-mediated endocytosis. The transfection of DC2.4 cells with Man₁₁-LPD100 containing DNA encoding luciferase gene gave luciferase activity two to three times higher (9×10^5 RLU/mg protein) than with non-mannosylated LPD100. In contrast to the latter, it was inhibited by 90% in the presence of mannose. Overall, the results indicate that mannosylated and histidylated LPD is a promising system for a selective DNA delivery in DCs.

Keywords: Gene delivery vehicles, gene delivery, liposomes, targeting, plasmid

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the most important immunity compartment playing a critical role in antigenic presentation (Banchereau, 1998; Villadangos, 2007a,b). Immunization of patients with genetic material encoding tumor antigen or with genetically modified DCs expressing tumor antigen are emerging vaccine strategies for cancer. The transfer of genetic material—plasmid DNA (pDNA) or *in vitro* transcribed mRNA—encoding tumor antigen into DCs by non-viral systems allowing antigen expression in its native form, raises a great interest to present all epitopes *via* MHC class I pathway and to induce tumor antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes (Tang, 1992; Ribas, 2000a,b; Gilboa, 2004; Fuller, 2006; Kutzler, 2008; Pascolo, 2008; Weide, 2008). For this purpose, electrostatic

complexes between pDNA or mRNA with cationic polymers or cationic lipids are widely proposed as non-viral delivery systems (Mintzer, 2009; Templeton, 2009). Beside, a third class of complexes made of Lipid-Polymer-DNA (termed LPD or lipopolyplexes) is emerging. LPD made with either 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP): cholesterol liposomes plus protamine sulfate or dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE): cholesterol hemisuccinate liposomes plus polylysine were the first LPD developed by Huang et al. (Gao, 1996; Li, 1997). LPD have been used as carriers for protein-based vaccines (Dileo, 2003; Vangasseri, 2005) and mRNA-based vaccines (Hoerr, 2000; Weide, 2008). In this field, we have exploited the combination of pH-sensitive histidylated polymer and histidylated liposomes to design mRNA-based LPD vaccine (Mockey, 2007). Histidine groups

Address for Correspondence: Patrick Midoux, Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, University of Orléans and Inserm, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France. E-mail: Patrick.midoux@cnrs-orleans.fr

(Received 10 February 2010; revised 23 June 2010; accepted 23 June 2010)

of these molecules promote membrane destabilization in acidic medium allowing nucleic acid delivery in the cytosol (Midoux, 1999; Kumar, 2003). First, mRNA was condensed in small particles with PEGylated histidylated polylysine (PEG-HpK) before adding L-histidine-(*N,N*-di-*n*-hexadecylamine)ethylamide: cholesterol liposomes. We reported that MART-1 mRNA LPD is an efficient system for anti-B16F10 melanoma mRNA-based vaccine in mice (Mockey, 2007). Note that mRNA complexed with liposomes or the cationic polymer did not lead to any vaccine effect, demonstrating that LPD is a more efficient formulation than lipoplexes or polyplexes. To increase further vaccine efficiency, we propose to arm LPD with DC recognition molecules for a selective delivery and an increased uptake by DCs, concomitantly with a decrease of the required dose. DCs express several cell surface receptors, especially the mannose receptor (Jiang, 1995; Sallusto, 1995; Avraméas, 1996; Llorca, 2008), which plays a role in the recognition of glycosylated pathogens and allows for antigenic presentation of the internalised cargo (Gazi, 2009; Geijtenbeek, 2009a,b). This receptor is a suitable and widely used target to increase the selectivity of gene delivery toward DCs (Diebold, 2002; Copland, 2003; Hattori, 2006; Wei, 2009; Proudfoot, 2007).

For the first time, we described the preparation of mannosylated and histidylated LPD (Man-LPD100) with DC uptake and transfection selectivity. Imidazole-rich liposomes (termed Lip100) were prepared with the combination of a cationic [*O,O*-dioleoyl-*N*-(3-*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate] lipid 1 and a neutral [*O,O*-dioleoyl-*N*-histamine Phosphoramidate] co-lipid 2 (Mével, 2008a,b) (Scheme 1). Lipophosphoramidates have a chemical structure which is bio-inspired from the natural phospholipids present in

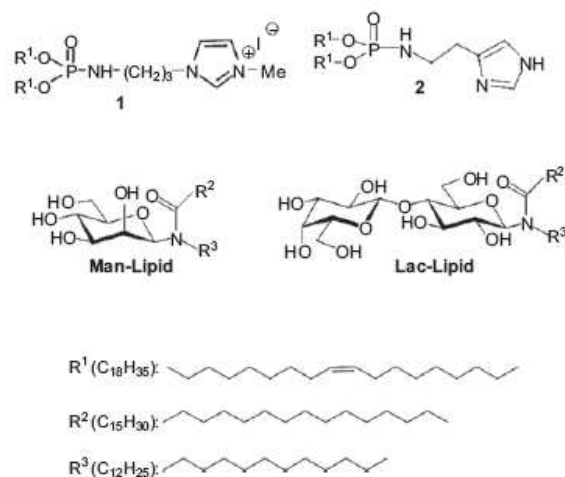
the cell membranes and most of these synthetic vectors proved to exhibit a moderate or low toxicity according to *in vitro* (Lamarche, 2007; Mével, 2007) and *in vivo* (Picquet, 2005; Le Gall, 2010) transfection assays. Lipid 1 possesses an *N*-methylimidazolium polar head conferring a permanent positive charge used for DNA condensation. The imidazole group of co-lipid 2 which is not alkylated on the nitrogen atoms and can acquire a cationic charge when the pH of the medium drops below pH 6, was used to favor endosome destabilisation and nucleic acids delivery in the cytosol (Mével, 2008b). Mannosylated liposomes (Man-Lip100) were obtained by insertion of β -D-mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide (Man-lipid) into the liposome formulation (Scheme 1) (Montier, 2004). LPD were subsequently formed by the addition of the liposomal solution to DNA/PEG-HpK polyplexes as previously described (Mockey 2007). First, we found that dialysis of liposomes completely abolished their cytotoxicity as well as that of LPD. Then, we demonstrated that both Man-Lip100 and Man-LPD100 were selectively taken up by the murine DC line (DC2.4 cells). A confocal microscopy study with DC2.4 cells expressing Rab5-EGFP or Rab7-EGFP revealed that the uptake occurred through clathrin-mediated endocytosis. We showed that the transfection efficiency of DC2.4 cells with Man-LPD100 was higher than that obtained with Lac-LPD100 or LPD100, and was inhibited in the presence of mannose.

Material and methods

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless otherwise stated. PEGylated histidylated poly-L-lysine (polylysine of 190 lysine residues substituted with 90 histidine groups and one PEG molecule of 5 kDa MW, PEG-HpK) was synthesized as previously described (Mockey 2007). *O,O*-dioleoyl-*N*-(3-*N*-methylimidazolium iodide)propylene] Phosphoramidate (lipid 1) and *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine Phosphoramidate (lipid 2) were synthesized as described (Mével 2008a,b). *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (NBD-PE) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). β -D-Mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide (Man-lipid) and β -D-Galactopyranosyl-(1,4)-*N*- β -D-glucopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide (Lac-lipid) were synthesized as described (Montier 2004).

Liposomes and glycoliposomes

Liposomes 100 (lip100) were prepared by mixing 1 mL of 5.4 mM lipid 1 in ethanol and 1 mL of 5.4 mM lipid 2 in ethanol. When indicated, glycolipids and/or 0.5% mol of NBD-PE were added. Ethanol solution was then evaporated until formation of a film. The film was hydrated for 12 h at 4°C in 1 mL of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, vortexed and then the suspension was sonicated for 15 min at 37 kHz using a Bioblock ultrasonic bath (Bioblock



Scheme 1. Lipid structures. 1: *O,O*-dioleoyl-*N*-(3-*N*-methylimidazolium iodide) propylene] Phosphoramidate; 2: *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine Phosphoramidate; Man-lipid: β -D-Mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide; Lac-lipid: β -D-Galactopyranosyl-(1,4)-*N*- β -D-glucopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide.

Scientific, Illkirch, France). Liposomes and glycoliposomes (500 μ L) were dialysed (Dialysis Tubing Cellulose membrane; MWCO: 12.4 kDa; size: 33 $\times$ 21 mm, Sigma) at 4°C for 6 h and then overnight against 500 mL 10 mM HEPES buffer, pH 7.4. After dialysis, lipid, sugar, and histidine concentrations in liposomes and glycoliposomes were determined.

Lipid quantitation

The lipid concentration was determined with Nile Red. Liposomes or glycoliposomes (10 μ L in 70 μ L of 10 mM HEPES, pH 7.4) were mixed with 20 μ L of a Nile Red solution (1 μ M in methanol) in 96 well plates. The mixture was agitated for 5 min at room temperature on an agitating plate. The fluorescence intensity was measured at 620/10 nm upon excitation at 531/25 nm with Victor I spectrofluorophotometer (1420 Multilabel Counter Victor, Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

Sugar quantitation

The amount of glycolipids incorporated in liposomes was determined using the colorimetric resorcinol/sulfuric acid assay according to (Monsigny 1988). Standard curves with mannose and lactose were used to determine the amounts of incorporated glycolipids.

Imidazole and histidine quantitation

The amount of imidazole or histidine in liposomes or glycoliposomes was determined by the Pauly colorimetric assay according to (Sluyterman 1960). Briefly, 20 μ L of liposomes were diluted to 100 μ L with 10 mM HEPES buffer, pH 7.4 and mixed in 96 well plates with 100 μ L of a w/w solution of (5% sodium nitrite in water/0.5% sulfanilic acid in 5% HCl) and 100 μ L of 10% sodium carbonate in water. The reaction was performed during 30 min at room temperature protected from light on an agitating plate. Then, the absorbance was measured at 490/10 nm with Victor I spectrophotometer.

pDNA

pTG11033 (9514 bp; kindly given by Trangène S.A., Strasbourg, France) and p3NFCMV-Luc were pDNA encoding the luciferase gene of *Photinus pyralis* firefly luciferase (*Luc*) under the cytomegalovirus (CMV) promoter. In p3NF-Luc-3NF luciferase expression was under the control of TATA-like weak promoter region (*PTAL*) from herpes simplex virus thymidine kinase. p3NF-Luc-3NF and p3NFCMV-Luc contain 3NF sequence that enhances pDNA nuclear import and gene expression (Breuzard 2008; Gonçalves 2009). In p3NFCMV-Luc, one 3NF sequence was put upstream the CMV promoter. pRab5-EGFP- and pRab7-EGFP were pDNA (kindly given by Dr A. Galmiche, University of Würzburg, Würzburg, Germany) allowing the expression of Rab5 and Rab7 proteins fused to the N-terminal of enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the CMV promoter, respectively. pEGFP was a pDNA encoding the green fluorescent protein from jellyfish *Aequorea victoria* under the control of

the CMV promoter. Supercoiled DNA was isolated from *E. Coli* DH5 α supercompetent bacteria (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) by alkali lysis and purification with QIAGEN EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Lipopolyplexes

LPD were prepared in polypropylene tubes as previously described (Mockey 2007). Briefly, polyplexes were prepared at a DNA/polymer weight ratio of 1:3 (μ g: μ g) by adding PEG-HpK (15 μ g in 10 μ L 10 mM HEPES buffer, pH 7.4) to DNA (5 μ g in 25 μ L 10 mM HEPES buffer, pH 7.4). After 4 sec mixing by vortex, the solution was kept for 30 min at 20°C. Then, LPD were formed at a DNA/polymer/lipids weight ratio of 1/3/2 (μ g: μ g: μ g) by adding liposomes (2 μ L at 5.4 mM; 10 μ g) to polyplexes with gentle mixing. The solution was kept for 15 min at 20°C before used. For transfection assays, the solution was adjusted to 1 mL with serum-free medium and made 0.15 M NaCl with a 5 M NaCl solution.

Size and ζ potential measurements

The size and ζ potential of liposomes and lipopolyplexes were measured in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4 by dynamic light scattering and electrophoretic mobility with ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France), respectively (Mlédoux 1999).

Cells and cell culture

The murine DC line (DC2.4 cells) was kindly given by Dr P. Jeannin and Dr Yves Delneste (INSERM UMR 892 Nantes-Angers, France) (Shen 1997). HeLa cells (ATCC CCL-2) were purchased from ATCC (Rockville, MD). The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 100 Units/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin (Fischer Bioblock, Illkirch, France). DC2.4 cells stably expressing Rab7-EGFP were prepared by transfection of DC2.4 cells in petri dishes with 20 μ g of pRab7-EGFP. After 48 h, G418 (400 μ g/mL) was added to the medium to allow for selection and cells were grown until formation of clones. Clones were collected, amplified and those expressing the fluorescent protein were selected by flow cytometry analysis (FACSsort, Becton Dickinson; λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530/30 nm). Positive clones were subcloned with a cell sorter (FACSVantage; λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530/30 nm). DC2.4 cells expressing Rab5-EGFP were obtained by transient transfection with pRab5-EGFP. Cells were mycoplasma-free as evidenced by bisbenzimidazole (Hoechst 33258, Molecular Probes) (Chen 1977).

Transfections

Two days before transfection, cells were seeded in 24 well culture plates at density of 1.10⁵ cells/cm². At the time of transfection, cells were 80% confluent. The culture medium was discarded, cells were washed with serum-free

medium and then incubated for 4 h at 37°C with 0.5 mL (5 µg pDNA) LPD solution. Then, the transfection medium was removed, replaced by fresh complete culture medium and cells were cultured for 44 h before measurement of the luciferase activity. When transfection was performed with 3NF plasmids, cells were pre-incubated with 25 ng/mL tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum-free medium and the transfection carried out in the presence of 25 ng/mL TNF- α . For mannose inhibition experiments, cells were pre-incubated for 30 min at room temperature with RPMI 1640 containing 12.5 mM mannose before incubation with LPD in the presence of 12.5 mM mannose.

Luciferase activity

Luciferase activity was measured using a Lumat LB9507 luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Wildbach, Germany) according to (Midoux 1993). The amount of proteins was determined by modified bicinchoninic assay and the luciferase activity (relative light units, RLU) was normalized to RLU per milligram extracted protein.

Liposomes and LPD uptake

Cells were prepared as for transfection experiments and incubated at 37°C with fluorescent liposomes or lipopolyplexes in the absence of serum. Cells were collected with trypsin, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and the cell-associated fluorescence intensity was measured before and after treatment with trypan blue (10 µL of 0.4% trypan blue in 400 µL of cell suspension for 10 min at 4°C) with a flow cytometer (FACSort, Becton Dickinson; λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530/30 nm). Trypan blue is known to quench the green emission of some fluorophores (Mosliman 1997; Nuutila 2005). The fluorescence intensity is expressed as the mean value of the fluorescence intensity (MFI) of 10,000 events.

Cytotoxicity measurement

The cell viability was determined with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Mosmann 1983). Forty hours after transfection, MTT (20 µL of a 5 mg/mL solution in PBS) was added to the cells in 100 µL culture medium and cells were incubated for 4 h at 37°C. Cells were then washed with PBS and the MTT converted in formazan was solubilised with acidic isopropanol (99.5%) and the absorbance was measured at 570 nm with Victor I spectrophotometer (560/10). The cell viability was expressed as a percentage of absorbance of untransfected cells cultured in the same conditions.

CD206 antibody staining

DC2.4 cells (10^5 cells) were pre-incubated for 30 min at room temperature in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (PBS-BSA) before incubation for 1 h at room temperature in PBS-BSA containing Alexa Fluor® 647 labeled-rat anti-mouse CD206 (AbD serotec, Kidlington, UK) at a 1/10 dilution. After washing in PBS-BSA, the

cell-associated fluorescence intensity was measured by flow cytometry (λ_{exc} = 633 nm; λ_{em} = 660/13 nm).

Confocal microscopy

Two days prior to the experiments, 5×10^3 Rab5-EGFP-DC2.4 and Rab7-EGFP-DC2.4 cells were seeded in a 4-well Lab-Tek chambered coverglass (Nunc, Dutscher S.A., Brumath, France). These cells were incubated with LPD containing Cy3-labeled pDNA and were observed in real-time over a 2 h and 30 min period under confocal microscopy. pDNA (pTG110033) was labeled with Cy3 by using the Mirus labelIT Kit as described (Breuzard 2008). Confocal microscopy was performed using a Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope coupled with a Zeiss LSM 510 scanning device (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany) equipped with a temperature and atmosphere controlled incubator. EGFP and Cy3 were excited with Ar and He/Ne laser lines at 488 and 543 nm, respectively.

Results

Glycoliposomes

Man-Lip100 and Lac-Lip100 were prepared using the film hydration method by mixing lipid 1, lipid 2 and different percentages of Man-lipid and Lac-lipid, respectively. The resulting glycoliposomes were dialyzed to remove any lipids that have not been incorporated in liposomes. Table 1 reports the percentage of glycolipids inserted in the liposome bilayer as a function of the percentage of glycolipids introduced in the lipid mixture. First, it appeared that Man-lipid was inserted more efficiently than Lac-lipid. In average, 4 and 11 mol % of Man-lipid (Man₄-Lip100 and Man₁₁-Lip100, respectively) were inserted in liposomes when 11 and 15 mol % of Man-lipid were added to the lipid mixture, respectively. Comparatively, 2 and 6 mol % of Lac-lipid (Lac₂-Lip100 and Lac₆-Lip100, respectively) were inserted in liposomes when 11 and 15 mol % of Lac-lipid were added to the lipid mixture, respectively. At the best, glycoliposomes containing 11 mol % Man-lipid and 6 % Lac-lipid were obtained. The glycolipid insertion was reproducible. For instance, from (i) three different preparations with 11 mol % Man-lipid lead to Man-Lip100 containing 4 mol % $\pm$ 1 Man-lipid in average and (ii) four different preparations with 11 mol % Lac-lipid lead to Lac-Lip100 containing 2 mol % $\pm$ 0.5 Lac-lipid in average. Liposomes were dialysed in order to eliminate any cytotoxicity. As shown in Figure 1A, Lip100 had no effect on the cell viability whereas glycoliposomes induced 30–40% cytotoxicity when they were

Table 1. Glycolipid incorporation in liposomes.

Added glycolipid (mol %)	Incorporated glycolipid (mol %)	
	Mannose	Lactose
1%	0.9 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0.1
5%	2.5 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.9
11%	3.4 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 1.1
15%	11 $\pm$ 2	6.2 $\pm$ 0.8

not dialysed. In contrast, Lip100 and the glycoliposomes were devoid of any cytotoxicity upon dialysis. The size of Lip100 increased by 63% and the ζ potential decreased by 43% upon dialysis (Table 2). Depending on the mol % of glycolipid, the size of Man-Lip100 and Lac-Lip100 increased also by 12–44%. Only for Man₁₁-Lip100, the size of liposomes decreased by 25%. Overall, dialysis reduced the ζ potential of glycoliposomes (Table 2). Compared to Lip100, the presence of glycolipid molecules in liposomes did not strongly affect their size which remained comprised between 125 and 200 nm.

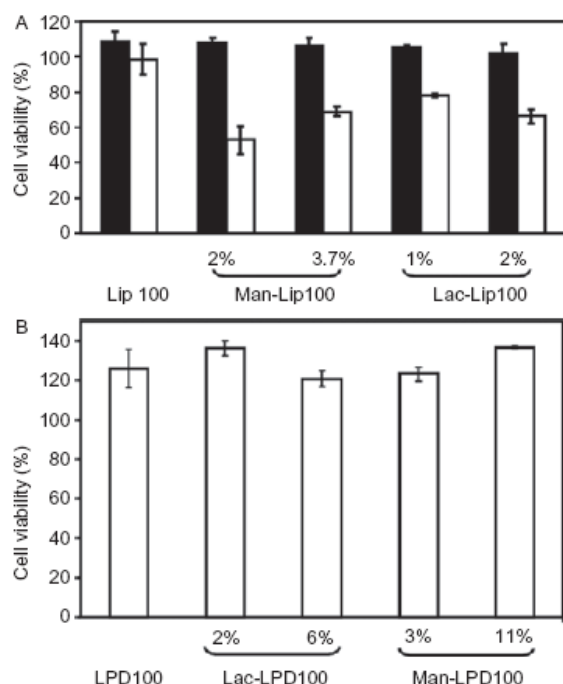


Figure 1. Liposomes and LPD cytotoxicity. (A) DC2.4 cells were incubated either with undialysed (white bar) or dialysed (black bar) 27 μ M Lip100, Man-Lip100, or Lac-Lip100. (B) DC2.4 cells were incubated either with LPD100, Man-LPD100, or Lac-LPD100 (2.5 μ g pDNA; 27 μ M lipid) made with dialysed liposomes or glycoliposomes. The cell viability was measured 48h post-incubation by using the MTT assay. The values shown are averages of three independent experiments.

Table 2. Size and ζ potential of liposomes.

Sugar (mol %)	Undialysed		Dialysed	
	Size (nm)	ζ (mV)	Size (nm)	ζ (mV)
Lip100				
0	103 $\pm$ 3	51 $\pm$ 1	163 $\pm$ 35	29 $\pm$ 7
Man-Lip100				
0.9	143 $\pm$ 8	49 $\pm$ 6	169 $\pm$ 35	33 $\pm$ 4
3.7	134 $\pm$ 23	53 $\pm$ 10	194 $\pm$ 20	30 $\pm$ 4
11	165 $\pm$ 5	55 $\pm$ 8	124 $\pm$ 5	32 $\pm$ 5
Lac-Lip100				
1.6	133 $\pm$ 43	56 $\pm$ 3	177 $\pm$ 38	39 $\pm$ 1
2.2	138 $\pm$ 28	40 $\pm$ 10	167 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4
6.2	125 $\pm$ 7	50 $\pm$ 14	140 $\pm$ 50	21 $\pm$ 4

Lipopolyplexes

LPD100, Man-LPD100, and Lac-LPD100 were prepared by encapsulation of pDNA/PEG-HpK polyplexes into dialysed Lip100, Man-Lip100, and Lac-Lip100, respectively. LPD prepared with dialysed liposomes were not toxic. The viability of cells incubated with LPD100, Man-LPD100, and Lac-LPD100 was close to 90% (Figure 1B). As shown in Figure 2, no pDNA migrated under agarose gel electrophoresis for any LPD, meaning that LPD formed with glycoliposomes was as efficient as unglycosylated ones to form LPD. Moreover, dialysis of liposomes did not affect LPD formation (Figure 2). The size and the ζ potential of LPD are listed in Table 3. The size of LPD100 was close to that of Lip100 but the ζ potential was more positive (36.5 mV versus 29 mV). Depending on the sugar content, the size of Man-LPD100 was 10–27% in average smaller than that of LPD100 (152 nm). For Lac₂-LPD100 and Lac₆-LPD100, the size was equal to that of LPD100. In contrast to glycoliposomes, the global charge of glyco-

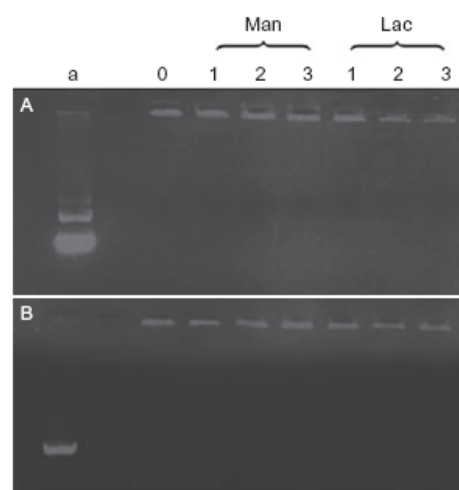


Figure 2. Electrophoretic mobility shift assay. LPD100, Man-LPD100, and Lac-LPD100 were formed with (A) undialysed or (B) dialysed liposomes or glycoliposomes. LPD (2 μ g DNA equivalent) were loaded in a 0.6% agarose gel and electrophoresis and run for 1h at 90V in TAE. Lane a: pDNA alone; lane 0: LPD formed with liposomes; lanes 1, 2, and 3 LPD formed with glycoliposomes prepared with 0.5, 5, and 11 mol % of glycolipids in the lipid mixture, respectively.

Table 3. Size and ζ potential of LPD.

Sugar (mol %)	Size (nm)	ζ (mV)
	LPD100	
0	152±54	36.5±12
	Man-LPD100	
0.9	138±14	21±2
3.7	121±18	18.5±1
11	137±48	17±3
	Lac-LPD100	
1.6	120±10	20±2
2.2	156±2	14±1
6.2	164±25	15±5

LPD containing more than 2 mol % glycolipid was ~50% less positive in average than LPD100.

Uptake of glycoliposomes

The selectivity of Man-Lip100 for dendritic cells was assessed by incubating DC2.4 cells with fluorescent liposomes containing different percents of Man-lipid. First, a flow cytometry analysis of DC2.4 cells incubated with antibodies against CD206, evidenced the presence of the mannose receptor on the surface of DC2.4 cells (Figure 3). As shown in Figure 4, the cell-associated fluorescence intensity (MFI) was the highest when DC2.4 cells were incubated with Man₁₁-Lip100. It was low with each Lac-Lip100. It is noticed that MFI of DC2.4 cells incubated with Lip100 was higher than that with Lac-Lip100 and equal to that with Man₃-Lip100. Even if there was no drastic difference in the ζ potential of glycoliposomes compared to that of Lip100, the presence of sugar residues on the liposome surface reduced the non-specific interaction of glycoliposomes with the DC2.4 plasma membrane. Compared to Lac₆-Lip100, the 2- and 3-fold higher MFI observed with Man₃-Lip100 and Man₁₁-Lip100 were indicative of a mannose selectivity. The MFI values upon treatment with trypan blue had a very interesting out-

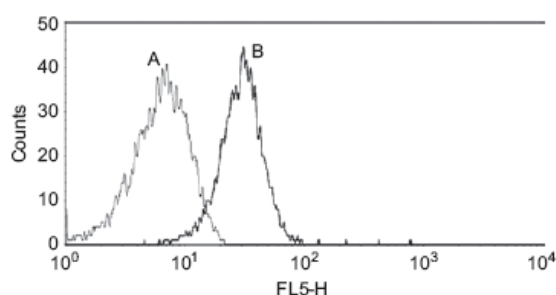


Figure 3. Mannose receptor expression on DC2.4 cells. Flow cytometry analysis of DC2.4 cells incubated in the absence (A) or in the presence (B) of anti-CD206 antibody.

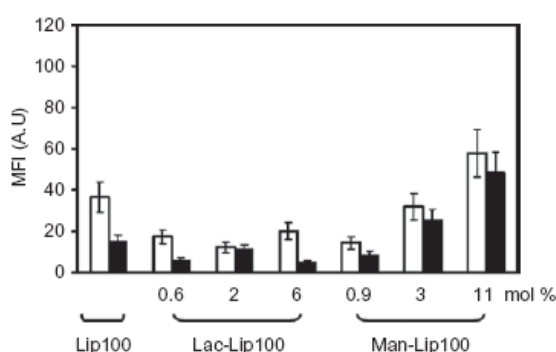


Figure 4. Glycoliposomes uptake. DC 2.4 cells were incubated at 37°C for 2h either with 54 μ M non-glycosylated, mannosylated, or lactosylated fluorescent Lip100 liposomes. The cell-associated fluorescence intensity (MFI) was measured in the absence (white bars) and in the presence of trypan blue (black bars).

come. This chromophore quenches the fluorescence of fluorescent liposomes bound on the cell surface. Thus, MFI measured after trypan blue treatment corresponding to the fluorescence of liposomes inside the cells, was indicative of the uptake of liposomes. MFI of DC2.4 cells incubated with Man₃-Lip100 and Man₁₁-Lip100 was 90% of that of non-treated cells meaning that 90% of the liposomes were internalized by the cells (Figure 4). Comparatively, more than 50% of MFI disappeared upon trypan blue treatment of cells incubated with Lip100 or Lac-Lip100 meaning that endocytosis of these liposomes was lower than that of Man-Lip100 (Figure 4). The uptake of Man-Lip100 by DC2.4 cells was 5- and 8-fold higher than that of Lip100 and Lac-Lip100, respectively. These data were indicative of a mannose-dependent uptake of Man-lip100 by DC2.4 cells.

Uptake of Glyco-LPD

Similar experiments were conducted with fluorescent LPD. As shown in Figure 5, MFI was low when DC2.4 cells were incubated with any Lac-LPD100. As with liposomes, MFI of Man-LPD100 was higher than with Lac-LPD100 when Man-LPD100 contained more than 3% Man-lipid. With Lac₆-LPD100, it was 2- and 5-fold lower than with Man₃-LPD100 and Man₁₁-LPD100, respectively. MFI with Man₁₁-LPD100 was twice that measured with LPD100. Here, the ζ potential of LPD100 (36.5 mV) was higher than that of any glyco-LPD (14–18.5 mV) and certainly increased the electrostatic interaction with the cell membrane. Upon trypan blue treatment, MFI of DC2.4 cells incubated with Man₃-LPD100 and Man₁₁-LPD100 was 67 and 73% of that of non-treated cells meaning that these mannosylated LPD were well taken up by the cells (Figure 5). Comparatively, 62 and 50% of MFI disappeared upon trypan blue treatment of cells incubated with LPD100 and Lac-LPD100, respectively meaning that endocytosis of these LPD was lower than that of Man-LPD100 (Figure 5). The uptake of Man₁₁-LPD100 was 5-fold and at least 10-fold higher than that of

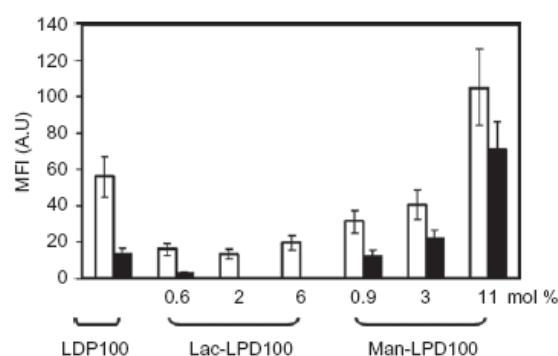


Figure 5. Glyco-LPD uptake. DC2.4 cells were incubated at 37°C for 2h either with LPD100, Man-LPD100, and Lac-LPD100 (54 μ M; 5 μ g DNA). The cell-associated fluorescence intensity (MFI) was measured in the absence (white bars) and in the presence of trypan blue (black bars).

LPD100 and Lac₆-LPD100, respectively. These data were strongly indicative of a mannose-dependent uptake of Man-LPD100 by DC2.4 cells.

Intracellular localisation of Man-LPD100.

In order to determine the uptake pathway of Man-LPD100 in DC2.4 cells, we used cells expressing fluorescent early (Rab5-EGFP positive vesicles) and late (Rab7-EGFP positive vesicles) endosomes. These intracellular compartments are characteristic of the clathrin-mediated endocytosis pathway. The cells were incubated with Man₁₁-LPD100 or LPD100 containing Cy3-labeled pDNA and the fluorescence was analysed under confocal microscopy. As shown in Figure 6A, Cy3-labeled pDNA colocalized with Rab5 vesicles (yellow spots) when the cells were incubated for 60 min with Man-LPD100 or LPD100. With the former, Cy3-labeled pDNA was visible in Rab7-EGFP positive vesicles after 90 min incubation (Figure 6B). In contrast, pDNA did not yet colocalize after 90 min with Rab7-EGFP positive compartments in cells incubated with LPD100. pDNA formed aggregates close to the plasma membrane. Rare pDNA/Rab7-EGFP colocalizations were nevertheless observed after 2 h incubation (data not shown).

Transfection efficiency of Man-LPD100.

DC2.4 cells were transfected either with Man₁₁-LPD100, LPD100, or Lac₆-LPD100 containing 5 µg pDNA encoding luciferase gene. The cells were incubated for 1, 2, or 4 h and the luciferase activity was measured 48 h later (Figure 7). The transfection selectivity was low when

the cells were incubated for 1 h with any LPD but the luciferase activity upon 2 h transfection with Man₁₁-LPD100 was two to three times higher than with LPD100 and Lac₆-LPD100. In contrast, the mannose selectivity was less significant when the incubation period was 4 h. The absence of selectivity in the latter was due to an increase of the non-specific binding and uptake of LPD100 and Lac₆-LPD100. Compared to the luciferase activity with Lac₆-LPD100 exhibiting a similar ζ potential, the luciferase expression upon 2 h transfection

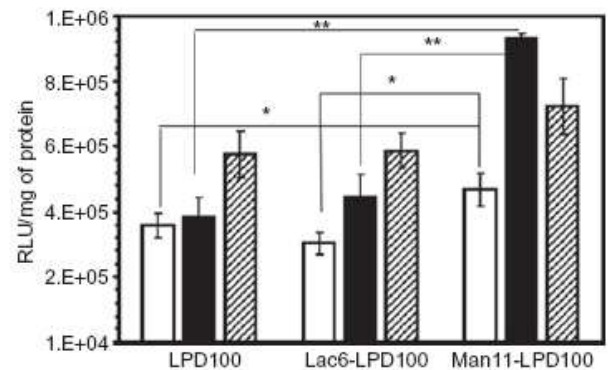


Figure 7. Transfection efficiency of LPD100 and Glyco-LPD100. DC2.4 cells were transfected for 1 h (white bars), 2 h (black bars), and 4 h (hatched bars) either with LPD100, Man₁₁-LPD, or Lac₆-LPD containing 5 µg pCMV-Luc. The luciferase activity expressed as relative light units (RLU) per mg protein was measured after 48 h of culture. The values shown are averages of three independent experiments. Statistical analysis was performed (Student's *t*-test) **P* < 0.1; ***P* < 0.01.

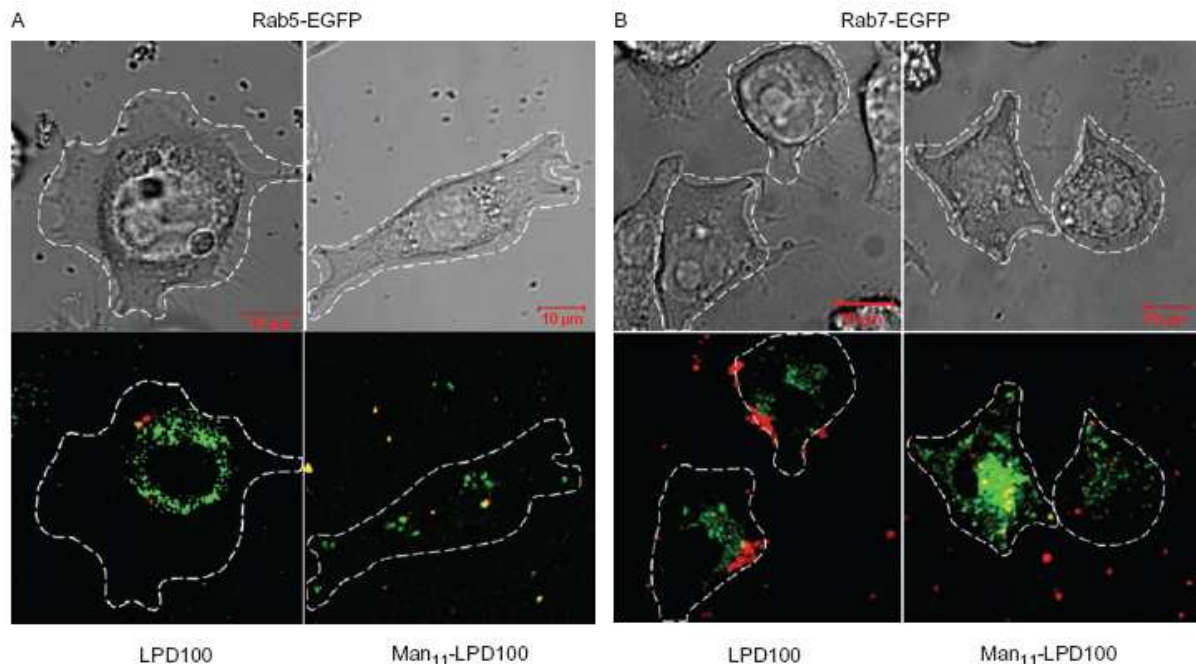


Figure 6. Intracellular location of DNA delivered by Man-LPD. (A) Rab5-EGFP and (B) Rab7-EGFP DC 2.4 cells were incubated either with LPD100 or Man₁₁-LPD100 containing Cy3-pDNA and observed in real-time over a 2 h 30 period under confocal microscopy. Images shown correspond to observation after 60 min (A) and 90 min (B). Scale bar: 10 µm.

with Man₁₁-LPD100 was 40% higher. The selectivity of the transfection with Man₁₁-LPD100 was evidenced by the 90% inhibition of the luciferase activity in the presence of 12.5 mM mannose (Figure 8A). Comparatively, the luciferase activity with Lac-LPD100 and LPD100 was inhibited by 30% in the presence of 12.5 mM mannose. Note that with HeLa cells which do not express the mannose receptor, no transfection inhibition was observed in the presence of mannose (Figure 8B). When DC2.4 cells were transfected with Man₁₁-LPD100 containing a plasmid encoding EGFP, 21% of the cells expressed EGFP 24 h or 48 h after transfection (data not shown).

Transfection with 3NF plasmids

We have recently reported that transfection efficiency can be improved by the use of 3NF plasmids allowing NFκB-mediated nuclear delivery of plasmids (Breuzard 2008; Gonçalves 2009). When DC2.4 cells were transfected with Man₁₁-LPD100 containing p3NFCMV-Luc, the luciferase activity was 7-fold higher than in cells transfected with 3NF-free plasmid (pCMV-Luc) (Figure 9). Despite the weakness of the TATA-like weak promoter region from

Herpes simplex virus thymidine kinase, the transfection with p3NF-Luc-3NF was improved by 1.5 compared to transfection with pCMV-Luc (Figure 9). With p3NF-Luc-3NF, the enhancement was further increased when NFκB was stimulated in the presence of TNF-α (Figure 9).

Discussion

LPD are ternary complexes formed between DNA, cationic polymer and liposomes that are promising systems for non-viral nucleic acid delivery. Here, LPD100 were obtained by the addition of an imidazole-rich liposomal formulation on a preformed DNA/PEGylated histidylated polylysine polyplexes. Liposomes were made with an equal amount of *O,O*-dioleoyl-*N*-[3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate 1 and *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine phosphoramidate 2 (scheme 1). To confer selectivity of LPD100 toward DCs, mannosylated liposomes were prepared to increase their recognition and uptake *via* DC mannose receptors by addition of dodecylhexadecanamide with a mannose polar head group (Man-lipid). As control, lactosylated liposomes were prepared by the replacement of the mannose polar head with a lactose moiety (Lac-lipid). We found that the insertion yield of Man-lipid was relatively high compared to that of Lac-lipid (73% versus 47%). The lower insertion yield of Lac-lipid could be due to the bigger size of its polar head compared to that of the monosaccharide. This difference could perturb the packing of the liposomes because the cationic lipid 1 and the neutral lipid 2 have roughly a polar head size close to that of mannose. Furthermore, the solubility of disaccharide-lipid conjugate in water is usually higher when compared to their monosaccharide analogues as revealed by the value of the CMC (Pestman 1999; Perouzel 2003). Here, glycolipids

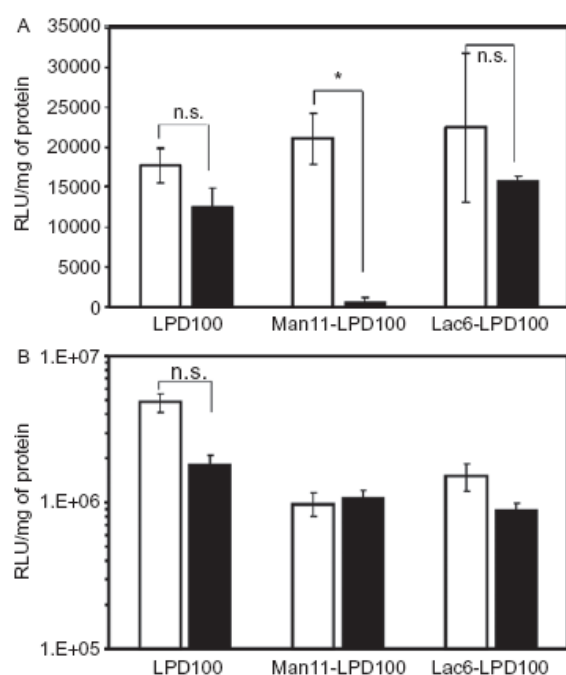


Figure 8. Transfection inhibition by mannose. (A) DC2.4 and (B) HeLa cells were transfected for 1 h either with LPD100, Man₁₁-LPD100, or Lac₆-LPD100 containing 2.5 µg pCMV-Luc in the absence (white bars) or in the presence of 12.5 mM mannose. When the cells were transfected in the presence of mannose, they were pre-incubated for 30 min in the presence of 12.5 mM mannose before transfection. The luciferase activity expressed as relative light units (RLU) per mg protein was measured after 48 h of culture. The values shown are averages of three independent experiments. Statistical analysis was performed (Student's *t*-test) ***P* < 0.01. n.s., not significant.

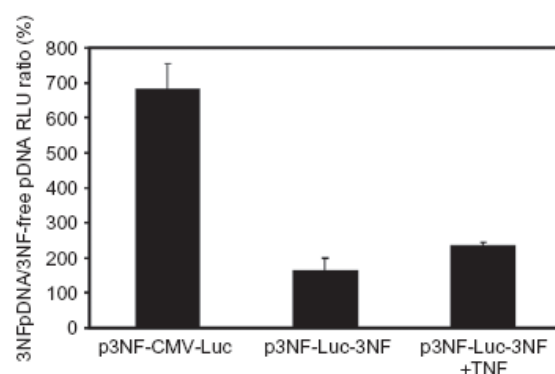


Figure 9. Transfection efficiency of Man-LPD100 containing 3NF plasmid. DC2.4 cells were transfected for 4 h with Man₁₁-LPD100 containing 5 µg of either pCMV-Luc, p3NFCMV-Luc, or p3NF-Luc-3NF plasmid. When indicated, the transfection was carried out in the presence of 25 ng/mL TNF-α. The luciferase activity expressed as relative light units (RLU) per mg protein was measured after 48 h of culture. The transfection efficiency is expressed as percent of that obtained with pCMV-Luc. The values shown are average of three independent experiments.

comprise one C11:0 and one C14:0 chains whereas the lipophosphoramidates have two identical C18:1 chains (oleyl chains). Consequently the glycolipids possess a higher solubility in water than the lipophosphoramidates. This structural difference could also explain why Lac-lip was incorporated in liposomes with a rather low yield. Moreover, investigations of the lyotropic liquid crystalline properties of these glycolipids by thermal polarized light microscopy revealed different lyotropic behaviours (unpublished data). The Lac-lipid exhibited a lamellar mesophase at room temperature and no change in the phase texture was observed upon heating up to 80°C. Conversely, Man-lipid having a smaller polar head which decreased their hydrophilic volume induced a conical molecular geometry, favouring the formation of an inverted hexagonal phase H_{II} at room temperature. Overall, these behaviours could explain the better incorporation of Man-lip in liposomes.

A very important point concerns the dramatic decrease of the cytotoxicity upon dialysis of glycoliposomes. Dialysis probably removed non-inserted glycolipids forming cytotoxic micelles. It could also equilibrate liposomes in the buffer.

The selectivity of Man-Lip and Man-LPD100 was assessed with DC2.4 cells that express the mannose receptor. The uptake of Man_{II} -LPD100 was 5-fold and at least 10-fold higher than that of LPD100 and Lac_6 -LPD100, respectively. Comparatively, the uptake by DC2.4 cells of LPD-DOTAP:cholesterol (1:1 molar ratio)/protamine/DNA-coated with mannan was reported to be 2-fold higher than that of LPD without mannan (Cui 2004). Compared to lipoplexes, the cell association of Man-C4-cholesterol: cholesterol: DOTMA lipoplexes and Man-His-C4-cholesterol lipoplexes with macrophages was 1.2-fold and 2.5-fold higher than that of non-mannosylated lipoplexes, respectively (Hattori 2006; Nakamura 2009).

Fluorescence confocal microscopy is a powerful technique to assess the intracellular location of fluorescein-labeled pDNA after LPD internalization. Here, the use of DC2.4 cells expressing Rab5-EGFP labeled early endosomes and Rab7-EGFP labeled late endosomes, facilitated determination of the intracellular location of Cy3-pDNA after internalisation of Man-LPD100 and LPD100 and the uptake process. The clathrin-dependent pathway is characterized by successive routing of the cargo through early endosomes, late endosomes and lysosomes. Confocal microscopy reveals that Man-LPD100 and LPD100 were taken up in Rab5 positive vesicles. With Man_{II} -LPD100, pDNA was then more rapidly (within 60 min) colocalized with EGFP-Rab7 positive vesicles than with LPD100. The latter was also colocalized with EGFP-Rab7 positive vesicles but after 90 min incubation. This means that both Man_{II} -LPD100 and LPD100 were delivered into late endosomes after early endosomes. The faster delivery of Man_{II} -LPD100 in late endosomes is due to their internalization *via* the mannose receptor. Indeed, receptor-mediated endocytosis delivers more rapidly their cargo to lysosomes than uptake by non-receptor-

mediated endocytosis. The presence of Man-LPD100 and LPD100 in acidic vesicles indicates that the imidazole group of the neutral co-lipid 2 can promote membrane destabilisation of Rab5 and Rab7 acid vesicles upon its protonation and favour pDNA delivery in the cytosol.

Man_{II} -LPD100 exhibited selective transfection of DC2.4 cells. Based on the uptake data, it is noticeable that the transfection efficiency with Man_{II} -LPD100 was not as better as expected, compared to Lac_6 -LPD100. We have already pointed out in the past that for Man-polyplexes and Lac-polyplexes, there was no direct correlation between the amount of polyplexes uptaken by the cells and the transfection efficiency (Fajac 1999). The selective transfection efficiency with Man-LPD100 decreased when the incubation period increased. Indeed, when the incubation was as long as 4 h, there was no significant difference between Man_{II} -LPD100, Lac_6 -LPD100 and LPD100. The increase of the incubation time favours non-specific interactions of all LPD with the cell surface, at the expense of the Man-LPD recognition by the mannose receptor. Conversely, the reduction of the incubation period to 2 h enhances the selectivity by decreasing the non-specific interaction. We can suppose that after intravenous injection, the contact time between LPD and DCs will be short and thus Man_{II} -LPD100 could be much specifically recognized than Lac-LPD100 or LPD100. The transfection of DC2.4 cells with Man_{II} -LPD100 was strongly inhibited (90%) in the presence of mannose while no inhibition was observed in HeLa which are devoid of mannose receptor. These results strengthen the uptake of Man_{II} -LPD100 *via* the mannose receptor of DC2.4 cells. In the absence of other mannosylated LPD reported in the literature, the level of the transfection efficiency (9×10^5 RLU/mg protein) can be compared with data obtained with mannosylated lipoplexes. The luciferase activity in macrophages transfected with Man-C4-cholesterol: cholesterol: DOTMA lipoplexes was 2.5 times higher (1×10^6 RLU) than with lipoplexes without mannose-cholesterol and was inhibited by 97% in the presence of mannan (Hattori 2006). With Man-C4-cholesterol: DOPE lipoplexes, the luciferase activity in macrophages (4×10^4 RLU/mg protein) was inhibited by more than 77% in the presence of mannose (Kawakami 2000). With Man-His-C4-cholesterol lipoplexes, the luciferase activity in mouse macrophages was 10-fold higher than with lipoplexes without mannose (Nakamura 2009). Several reports indicate that the selectivity of the gene expression with Man-lipoplexes was also observed *in vivo*. Gene expression in macrophages and DCs upon ip injection of Man-C4-cholesterol:cholesterol:DOTMA lipoplexes in mice, was 3.5- and 12.5-fold higher than upon injection of non-mannosylated lipoplexes, respectively (Hattori 2006). In spleen and liver, the transfection efficiency upon intraportal injection of Man-C4-cholesterol:DOPE lipoplexes was 20-fold and more than 1000-fold higher than with non-mannosylated lipoplexes, respectively (Kawakami 2000). The liver distribution upon i.v. injection of these mannosylated lipo-

plexes was 16-fold higher in Kupffer cells and only three times higher in non-kupffer cells (Kawakami 2000). The expression of IL-2 and Interferon- γ upon iv injection of Man-C4-cholesterol:DC-cholesterol:DOPE lipoplexes containing CpGDNA was 4-fold higher than upon injection of non-mannosylated lipoplexes (Kuramoto 2009).

Because flow cytometry analysis indicated that most of the cells have taken up fluorescent Man₁₁-LPD100 and that only 21% of the cells expressed EGFP upon transfection with a plasmid encoding EGFP, some intracellular steps required for gene expression are not optimized. Among them is the nuclear import of the plasmid. We have recently reported that the transfection efficiency can be improved by the use of 3NF plasmids allowing their NF κ B-mediated nuclear import (Breuzard 2008; Gonçalves 2009). As expected, the use of 3NF plasmids increased the luciferase activity in DC2.4 cells transfected with Man₁₁-LPD100.

Conclusion

We demonstrate for the first time an uptake and transfection selectivity of mannosylated LPD toward a murine DCs line. The selectivity factor of Man₁₁-LPD is in line with those reported in the literature for mannosylated lipoplexes. Therefore, mannosylated and histidylated LPD are promising carriers to increase efficiency of mRNA- and DNA-based cancer vaccines.

Declaration of interest

This work was supported by grants from Ligue contre le Cancer (Région Centre), Canceropole Grand Ouest, Association Française contre les Myopathies (AFM). Federico Perche was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer.

References

- ▶ Avraméas A, McIlroy D, Hosmalin A, Autran B, Debré P, Monsigny M, Roche AC, Midoux P. (1996). Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 26, 394–400.
- ▶ Banchereau J, Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245–252.
- ▶ Breuzard G, Tertilt M, Gonçalves C, Cheradame H, Géguan P, Pichon C, Midoux P. (2008). Nuclear delivery of NF κ B-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res*, 36, e71.
- ▶ Chen TR. (1977). In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*, 104, 255–262.
- ▶ Copland MJ, Baird MA, Rades T, McKenzie JL, Becker B, Reck E, Tyler PC, Davies NM. (2003). Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine*, 21, 883–890.
- ▶ Cui Z, Han SJ, Huang L. (2004). Coating of mannan on LPD particles containing HPV E7 peptide significantly enhances immunity against HPV-positive tumor. *Pharm Res*, 21, 1018–1025.
- ▶ Diebold SS, Plank C, Cotten M, Wagner E, Zenke M. (2002). Mannose receptor-mediated gene delivery into antigen presenting dendritic cells. *Somat Cell Mol Genet*, 27, 65–74.
- ▶ Dileo J, Banerjee R, Whitmore M, Nayak JV, Falo LD Jr, Huang L. (2003). Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery to antigen-presenting cells results in enhanced anti-tumor immune responses. *Mol Ther*, 7, 640–648.
- ▶ Fajac I, Briand P, Monsigny M, Midoux P. (1999). Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*, 10, 395–406.
- ▶ Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C. (2006). Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*, 40, 86–97.
- ▶ Gao X, Huang L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 35, 1027–1036.
- ▶ Gazi U, Martinez-Pomares L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 214, 554–561.
- ▶ Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9, 465–479.
- ▶ Geijtenbeek TB, den Dunnen J, Gringhuis SI. (2009). Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol*, 4, 879–890.
- ▶ Gilboa E, Vieweg J. (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev*, 199, 251–263.
- ▶ Gonçalves C, Ardourel MY, Decoville M, Breuzard G, Midoux P, Hartmann B, Pichon C. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med*, 11, 401–411.
- ▶ Hattori Y, Kawakami S, Nakamura K, Yamashita E, Hashida M. (2006). Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 828–834.
- ▶ Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. (2000). *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol*, 30, 1–7.
- ▶ Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375, 151–155.
- ▶ Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita E, Hashida M. (2000). Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther*, 7, 292–299.
- ▶ Kumar VV, Pichon C, Refregiers M, Guerin B, Midoux P, Chaudhuri A. (2003). Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. *Gene Ther*, 10, 1206–1215.
- ▶ Kuramoto Y, Kawakami S, Zhou S, Fukuda K, Yamashita E, Hashida M. (2009). Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice. *J Pharm Sci*, 98, 1193–1197.
- ▶ Kutzler MA, Weiner DB. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*, 9, 776–788.
- ▶ Lamarche E, Mével M, Montier T, Burel-Deschamps L, Giamarchi P, Tripiet R, Delépine P, Le Gall T, Cartier D, Lehn P, Jaffrès PA, Clément JC. (2007). Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjug Chem*, 18, 1575–1582.
- ▶ Le Gall T, Loizeau D, Picquet E, Carmoy N, Yaouanc JJ, Burel-Deschamps L, Delépine P, Giamarchi P, Jaffrès PA, Lehn P, Montier T. (2010). A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *J Med Chem*, 53, 1496–1508.
- ▶ Li S, Huang L. (1997). *In vivo* gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*, 4, 891–900.
- ▶ Llorca O. (2008). Extended and bent conformations of the mannose receptor family. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1302–1310.
- ▶ Mével M, Montier T, Lamarche E, Delépine P, Le Gall T, Yaouanc JJ, Jaffrès PA, Cartier D, Lehn P, Clément JC. (2007). Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjug Chem*, 18, 1604–1611.

- ▶ Mével M, Neveu C, Gonçalves C, Yaouanc JJ, Pichon C, Jaffrès PA, Midoux P. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem Commun (Camb)*, 27, 3124–3126.
- ▶ Mével M, Breuzard G, Yaouanc JJ, Clément JC, Lehn P, Pichon C, Jaffrès PA, Midoux P. (2008). Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *ChemBiochem*, 9, 1462–1471.
- ▶ Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC. (1993). Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res*, 21, 871–878.
- ▶ Midoux P, Monsigny M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconj Chem*, 10, 406–411.
- ▶ Mintzer MA, Simanek EE. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*, 109, 259–302.
- ▶ Mockey M, Bourseau E, Chandrashekar V, Chaudhuri A, Lafosse S, Le Cam E, Quesniaux VF, Ryffel B, Pichon C, Midoux P. (2007). mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther*, 14, 802–814.
- ▶ Monsigny M, Petit C, Roche AC. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal Biochem*, 175, 525–530.
- ▶ Montier T, Delépine P, Benvegna T, Ferrières V, Miramon ML, Dagorn S, Guillaume C, Plusquellec D, Férec C. (2004). Efficient gene transfer into human epithelial cell lines using glycosylated cationic carriers and neutral glycosylated co-lipids. *Blood Cells Mol Dis*, 32, 271–282.
- ▶ Mosiman VL, Patterson BK, Canterero L, Goolsby CL. (1997). Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. *Cytometry*, 30, 151–156.
- ▶ Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55–63.
- ▶ Nakamura K, Kuramoto Y, Mukai H, Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M. (2009). Enhanced gene transfection in macrophages by histidine-conjugated mannosylated cationic liposomes. *Biol Pharm Bull*, 32, 1628–1631.
- ▶ Nuutila J, Lilius EM. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65, 93–102.
- ▶ Pascolo S. (2008). Vaccination with messenger RNA (mRNA). *Handb Exp Pharmacol*, 183, 221–235.
- ▶ Perouzel E, Jorgensen MR, Keller M, Miller AD. (2003). Synthesis and formulation of neoglycolipids for the functionalization of liposomes and lipopolyplexes. *Bioconj Chem*, 14, 884–898.
- ▶ Pestman JM, Kevelam J, Blandamer MJ, van DSoren HA, Kellog RM, Engberts JBFN. (1999). Thermodynamics of micellization of non-ionic saccharide-based N-Acyl-N-alkylaldosylamine and N-acyl-N-alkylamino-1-desoxyalditol surfactants. *Langmuir*, 15, 2009–2014.
- ▶ Picquet E, Le Ny K, Delépine P, Montier T, Yaouanc JJ, Cartier D, des Abbayes H, Férec C, Clément JC. (2005). Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for *in vivo* DNA delivery. *Bioconj Chem*, 16, 1051–1053.
- ▶ Proudfoot O, Apostolopoulos V, Pietersz GA. (2007). Receptor-mediated delivery of antigens to dendritic cells: anticancer applications. *Mol Pharm*, 4, 58–72.
- ▶ Ribas A, Butterfield LH, Hu B, Disette VB, Chen AY, Koh A, Amarnani SN, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. (2000). Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *J Immunother*, 23, 59–66.
- ▶ Ribas A, Butterfield LH, Economou JS. (2000). Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist*, 5, 87–98.
- ▶ Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 182, 389–400.
- ▶ Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*, 158, 2723–2730.
- ▶ Sluyterman LAA. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* 38, 218.
- ▶ Tang DC, DeVit M, Johnston SA. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 356, 152–154.
- ▶ Templeton NS. (2009). Nonviral delivery for genomic therapy of cancer. *World J Surg*, 33, 685–697.
- ▶ Vangasseri DP, Han SJ, Huang L. (2005). Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery. *Curr Drug Deliv*, 2, 401–406.
- ▶ Villadangos JA, Schnorrer P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*, 7, 543–555.
- ▶ Villadangos JA, Heath WR, Carbone FR. (2007). Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol*, 28, 45–47.
- ▶ Wei H, Wang S, Zhang D, Hou S, Qian W, Li B, Guo H, Kou G, He J, Wang H, Guo Y. (2009). Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clin Cancer Res*, 15, 4612–4621.
- ▶ Weide B, Garbe C, Rammensee HG, Pascolo S. (2008). Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunol Lett*, 115, 33–42.

Des expériences supplémentaires d'internalisation ont été réalisées. Nous avons étudié la contribution de la voie cavéole dans l'endocytose de lipopolyplexes par les cellules DC2.4. A ces fins, nous avons analysé l'internalisation de LPD100 et Man₁₁-LPD100 formés avec des liposomes contenant 0,5% de NBD-PE avec de l'ADN couplé à la cyanine 5 par des cellules exprimant une protéine de fusion cavéoline-mRFP par microscopie confocale (Fig. 46).

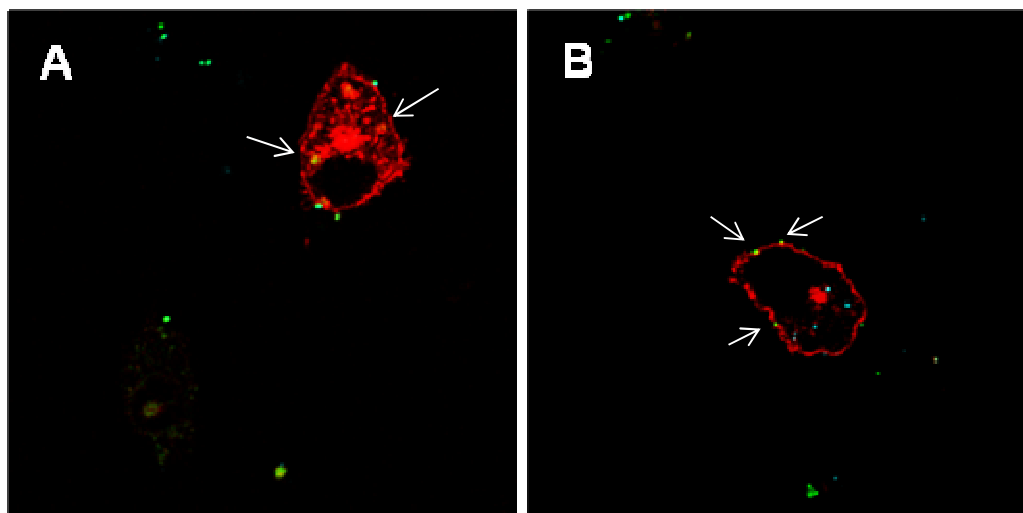


Figure 46 : Observation de cellules DC2.4 exprimant la protéine de fusion cavéoline-mRFP après 1 h d'internalisation de LPD100 et Man₁₁-LPD100. Des cellules DC2.4 exprimant la protéine de fusion cavéoline-mRFP ont été incubées 1h à 37°C avec des LPD100 et Man₁₁-LPD100 formés avec des liposomes incorporant 0,5% de lipide fluorescent NBD-PE et de l'ADN pTG11 couplé au fluorophore Cy5. Les cellules ont ensuite été fixées par le paraformaldéhyde puis observées par microscopie confocale. **A** : cellules transfectées avec des LPD100, **B** : cellules transfectées avec des Man₁₁-LPD100.

Nous remarquons une colocalisation de l'ADN administré sous forme de LPD100 et Man₁₁-LP100 avec les cavéoles. Cette colocalisation est visible sous la forme de vésicules jaunes (flèches blanches). Une colocalisation avec rab7 avait été observée. Ces LPD semblent donc entrer dans les cellules DC 2.4 à la fois par voie clathrine-dépendante et cavéoline-dépendante. De plus, dans le cas des Man₁₁-LPD100, de l'ADN est visible dans les cellules sans être associé aux liposomes ce qui montre la décomplexation des LPD dans la cellule dès 1h.

Les LPD100 et Man₁₁-LP100 pourraient également être internalisés par d'autres voies et notamment des voies indépendantes des vésicules de clathrine et des cavéoles.

Chapitre III : LPR100 et transfert d'ARNm : effet vaccinal des LPR100 mannosylés

A. Ciblage des cellules dendritiques *in vivo* avec des LPR100 mannosylés et effet vaccinal contre le mélanome B16F10

Dans le chapitre précédent, j'ai montré que les LPD100 mannosylés (Man_{11%}-LPD100) permettent le ciblage *in vitro* de cellules dendritiques murines. Dans cette partie, nous montrons que ces LPR100 mannosylés permettent également une transfection sélective *in vitro* des DC 2.4 avec de l'ARNm. Les résultats obtenus montrent également une meilleure expression du gène rapporteur après transfection d'une lignée de DC *in vitro* avec l'ARNm qu'avec l'ADN. Cependant, l'étude de la transfection d'une lignée cellulaire ne permet pas d'affirmer que ce ciblage des DC sera efficace *in vivo* dans le but d'induire une réponse immune spécifique par transfert de l'ARNm d'un antigène tumoral.

Nous avons montré par analyse de la biodistribution des LPD100 et Man_{11%}-LPD100 formés avec un ADN radio-marqué, une accumulation principalement dans le foie et la rate. Le ciblage a été évalué chez la souris en administrant des lipopolyplexes et des lipopolyplexes mannosylés contenant de l'ADN ou de l'ARNm codant le gène rapporteur EGFP. La rate est un organe lymphoïde enrichi en cellules dendritiques. Une mesure du nombre de DC exprimant l'EGFP dans la rate des souris a été réalisée. Nos résultats révèlent une meilleure transfection des DC par l'ARNm que par l'ADN *in vivo*. Une meilleure efficacité (4 fois plus) de transfection des DC spléniques a été obtenue avec les LPR mannosylés par rapport aux non mannosylés.

En effet, si les Man_{11%}-LPR100 contenant de l'ARNm codant l'EGFP sont capables de transfecter les DC spléniques après administration intraveineuse chez la Souris, nous avons vu que ce n'est pas le cas des LPD contenant l'ADN codant l'EGFP.

Enfin, l'utilisation des Man_{11%}-LPR100 contenant un ARNm codant l'antigène de mélanome MART1 permet un retard de croissance de tumeurs primaires B16F10 et une augmentation de la survie des animaux vaccinés plus importante qu'avec les LPR100 non mannosylés.

L'ensemble de ces résultats est présenté ci-après sous la forme d'un manuscript qui est soumis pour publication.

Enhancement of Dendritic cells transfection *in vivo* and of vaccination against B16F10 melanoma with Mannosylated Histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen mRNA.

Federico Perche, Mc^a, Thierry Benvegna, PhD^c, Mathieu Berchel, PhD^b, Loic Lebegue, BSc^a, Chantal Pichon, PhD^a, Paul-Alain Jaffrès, PhD^b and Patrick Midoux, PhD^{a*}.

^a Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, University of Orléans and Inserm, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France, ^b CEMCA, UMR CNRS 6521, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Faculté des Sciences et Techniques, IFR 148 ScInBioS, IBiSA SynNanoVect platform, 6 avenue Le Gorgeu, 29238 Brest, France. ^c UMRCNRS 6226, Université Européenne de Bretagne, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, IBiSA SynNanoVect platform Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes, cedex 7, France.

Short title: Mannosylated LPR for mRNA-based vaccine

*Corresponding author: Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France, Phone : +33 (0)2 38 25 55 65 ; FAX : +33 (0)2 38 63 15 17 ; E-mail address: patrick.midoux@cnrs-orleans.fr (P. Midoux)

The authors state that there is no competing interest or disclosure. This work was supported by Ligue contre le Cancer (Région Centre) and Canceropole Grand Ouest. F.P. was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer.

Complete manuscript word count: 4698; number of references: 50; number of figures/tables: 6

Abstract

We report the preparation of mannosylated nanoparticles loaded with mRNA that enhance the transfection of DCs *in vivo* and the anti-B16F10 melanoma vaccination in mice. Mannosylated and histidylated lipopolyplexes (Man₁₁-LPR100) were obtained by adding mannosylated and histidylated liposomes to mRNA/PEGylated histidylated polylysine polyplexes. Upon intravenous injection, ~ 9% of the radioactivity of ^{99m}Tc-labeled lipopolyplexes measured in the liver, spleen, lungs and kidneys was found in the spleen. We demonstrate that spleen from mice injected with EGFP mRNA loaded Man₁₁-LPR100 contained 4-fold DCs expressing EGFP than that from mice injected with sugar-free LPR100. This better transfection of DCs is correlated with a better inhibition of B16F10 melanoma growth and an increased survival time when mice were immunized with MART-1 mRNA loaded Man₁₁-LPR100. These results indicate that mannosylated and histidylated LPR is an efficient system for the delivery of tumour antigen mRNA in splenic DCs aiming to induce an anti-cancer immune response.

Key words: mRNA transfection; nanoparticles; non viral vectors; tumour vaccine.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the most important immunity compartment playing a critical role in antigenic presentation.^[1-3] Immunization of patients with genetic material encoding tumour antigen or with genetically modified DCs expressing tumour antigen are interesting vaccine strategies for cancer. The expression of exogenous genetic material encoding tumour antigen upon DCs transfection with plasmid DNA (pDNA) or mRNA allows the antigen expression in its native form and presentation of all epitopes *via* MHC class I pathway leading to the induction of tumour antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.^[4-10] Initially developed by Huang et coll., Lipid-Polymer-DNA complexes (termed LPD or lipopolyplexes) are emerging non viral vectors for DNA, antisense oligonucleotides and siRNA delivery.^[11-14] Lipopolyplexes have also been used as carriers for mRNA-based vaccines.^[10, 15, 16] We have reported that MART-1 mRNA lipopolyplexes are an efficient system for anti-B16F10 melanoma mRNA-based vaccine in mice.^[16] The mRNA encoding MART-1 melanoma antigen was formulated with histidylated liposomes and a histidylated polymer. Those pH-sensitive vectors promote membrane destabilization in acidic medium upon the protonation of their histidine groups, allowing nucleic acid delivery in the cytosol.^[17] First, mRNA was condensed in small particles of ~50 nm with PEGylated histidylated polylysine (PEG-HpK) before adding liposomes made of L-histidine-(*N,N*-di-*n*-hexadecylamine)ethylamide and cholesterol. The absence of any vaccine effect when the mRNA was complexed with liposomes alone or with the cationic polymer alone demonstrated that lipopolyplexes are a more efficient formulation than lipoplexes or polyplexes.^[16] Recently, we have designed new imidazole/imidazolium binary liposomes (termed Lip100) made with a cationic [*O,O*-dioleyl-*N*-(3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene) phosphoramidate)] lipid **1** and a neutral [*O,O*-dioleyl-*N*-histamine phosphoramidate] co-lipid **2** in a molar ratio of 1:1 (Supplement Fig 1).^[18, 19] Lipid **1** possesses an *N*-methylimidazolium polar head conferring a permanent positive charge used for nucleic acid DNA condensation. The imidazole group of co-lipid **2** is not alkylated on the nitrogen atoms and can acquire a cationic charge when the pH of the medium drops below pH 6 favouring the endosome destabilisation and nucleic acids delivery in the cytosol. To favour DCs targeting, we have designed mannosylated LPD (Man₁₁-LPD100) and showed that they exhibited selectivity for uptake and DNA transfection of DCs.^[20] Mannosylated liposomes (Man₁₁-Lip100) were obtained by insertion of 11mol% β-D-mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide (Man-lipid) into the liposome formulation (Supplement Fig 1). LPD were subsequently formed by the addition of the liposomal solution

to DNA/PEG-HpK polyplexes as previously described.^[16] We have demonstrated that the transfection efficiency of DC2.4 cells with Man₁₁-LPD100 was 5-fold higher than that obtained with LPD100, and was 90% inhibited in the presence of mannose.^[20]

Here, we report the preparation of mRNA lipopolyplexes (termed LPR, Lipid-Polymer-RNA to differentiate from LPD standing for lipopolyplexes made with DNA) with these mannosylated liposomes (Man₁₁-Lip100). We showed that spleen of mice that have been intravenously injected with EGFP mRNA loaded Man₁₁-LPR100 (EGFP Man₁₁-LPR100) had more DCs expressing EGFP than spleen of mice that have been injected with non mannosylated LPR100. We report also mice immunization with these lipopolyplexes loaded with MART-1 mRNA. Data show that a greater inhibition of B16F10 melanoma growth was obtained when mice were immunized with MART-1 Man₁₁-LPR100 than with MART-1 LPR100. These results indicate that tumour antigen mRNA loaded Man₁₁-LPR100 is an efficient system to induce an anti-cancer immune response.

Methods

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise. PEGylated histidylated poly-L-Lysine (PEG-HpK) was synthesized as described.^[16, 21] O,O-dioleoyl-N-[3N-(N-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate (lipid 1) and O,O-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate (lipid 2) were synthesized as described.^[18, 19] β-D-mannopyranosyl-N-dodecylhexadecanamide (Man-lipid) was synthesized as described.^[22]

Plasmids

pTG11033 (pCMV-Luc; 9514 bp, kindly given by Transgène S.A., Strasbourg, France) and pCMV-EGFP (5310 bp) were pDNA encoding the luciferase gene of *Photinus pyralis* (Firefly luciferase, FLuc) and the enhanced green fluorescent protein under control of a CMV promoter, respectively. pGEM4Z-EGFP-A64 (kindly given by Dr. P. Ponsaerts, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium) was pDNA encoding the enhanced green fluorescent protein under control of the T7 RNA polymerase promoter.^[23] pGEM-4Z-MART-1-A64 and pGEM-4Z-MART-1_LAMP-1-A64 (kindly given by Dr A Bonehill and Dr K Thielemans, Medical School of the Vrije Universiteit Brussels, Brussels, Belgium) were pDNA encoding the human MelanA/MART-1 melanoma antigen under the T7 promoter.^[24] pGEM-4Z/MART-1_LAMP-1/A64 encoded MART-1 protein carrying the peptide signal and lysosomal sorting

signal of human LAMP-1 protein. Supercoiled pDNA was isolated from *E. Coli* DH5 α TM supercompetent bacteria (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) by alkali lysis and purification with QIAGEN EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

In vitro transcribed mRNA

pGEM4Z-EGFP-A64, pGEM-4Z-MART-1-A64 and pGEM-4Z-MART-1_LAMP-1-A64 plasmids were linearised with *SpeI*. Linearised plasmids were used as template for *in vitro* transcription using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Oxfordshire, UK) to produce ARCA/A100 mRNAs as previously described.^[25] The mRNA (EGFP: 915 nt; MART-1: 925 nt; MART-1_LAMP-1: 910 nt) obtained by this means had an ARCA modified cap and a 100 adenosines PolyA tail. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, RNA had 260/280 ratios ≥ 2 and was stored at -80°C in small aliquots.

Liposomes

Liposomes 100 (Lip100) were prepared by mixing at an equimolar ratio, 1 mL of 5.4 mM lipid **1** in ethanol and 1 mL of 5.4 mM lipid **2** in ethanol. Man₁₁-Lip100 containing 11 mol % Man-lipid was obtained by addition of 15% Man-lip.^[20] Ethanol solution was then evaporated until formation of a film. The film was hydrated for 12 h at 4°C in 1 mL of 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, vortexed and then the suspension was sonicated for 15 min at 20°C at 37 kHz using a ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Liposomes (500 μ L) were dialysed (Dialysis Tubing Cellulose membrane size: 33 mm x 21 mm, MWCO 12.4 kDa, Sigma Aldrich) at 4°C for 6 h and then overnight against 500 mL of 10 mM Hepes buffer, pH 7.4. After dialysis, lipid and sugar concentrations in liposomes were determined as described.^[20]

Lipopolyplexes

Lipopolyplexes were prepared in polypropylene tubes as previously described.^[16, 20] Polyplexes were prepared by adding 15 μ g PEG-HpK (in 10 μ L 10 mM Hepes buffer, pH 7.4) to 5 μ g mRNA or 5 μ g pDNA (in 25 μ L 10 mM Hepes buffer, pH 7.4). After 4 s mixing by vortex, the solution was kept for 30 min at 20°C. Then, lipopolyplexes were formed by adding 10 μ g liposomes (5 μ L at 5.4 mM in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4) to polyplexes by up-down pipetting. The solution was kept for 15 min at 20°C before use. The charge ratios of polymer/pDNA and polymer/mRNA were 2.8, and that of lipid/pDNA and lipid/mRNA were 0.9. For *in vitro* transfection assays, the solution was adjusted to 1 mL with serum-free

medium. For *in vivo* transfection, the solution was adjusted to 5% sucrose with a 50% sucrose solution.

Size and ζ potential measurements

The size and ζ potential of lipopolyplexes were measured in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4 by dynamic light scattering and electrophoretic mobility with ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France), respectively. ^[21] Twenty μ L of lipopolyplexes containing 5 μ g mRNA or pDNA were diluted into 1.2 mL of 10 mM HEPES buffer pH 7.4.

Animals

Specific pathogen-free male C57BL/6J (8-11 weeks) mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France) and kept in isolated ventilated cages. All animal studies were carried out according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law 87848, C. Pichon accreditation). They were done in an agreed animal facility (agreement B 45-234-12, Délégation des Services vétérinaires du Loiret).

Cell lines

The mouse dendritic cell line DC2.4 was kindly given by Dr P. Jeannin and Dr Yves Delneste (INSERM UMR 892 Nantes-Angers, France). ^[26] B16F10 cells (ATCC, American Type Culture Collection CRL-6475) were purchased from ATCC. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in medium supplemented with 10% heat inactivated FCS (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 100 Units/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin (Fischer Bioblock, Illkirch, France). Cells were mycoplasma-free as evidenced by MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Levallois Perret, France).

Transfections

Two days before transfection, cells were seeded in 24 well culture plates (1 x 10⁵ cells/cm²). At the time of transfection, cells were 80% confluent. The culture medium was removed; cells were washed with serum-free medium and then incubated for 2 h at 37°C with 0.5 mL of lipopolyplexes solution (containing 2.5 μ g DNA or mRNA). Then, the transfection medium was removed, replaced by fresh culture medium and cells were further cultured for 22 h. Cells were harvested with trypsin, washed with PBS and the cell associated EGFP fluorescence intensity was measured with a flow cytometer (FACSort, Becton Dickinson; λ_{ex} = 488 nm; λ_{em}

= 530 ± 30 nm). The fluorescence intensity was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of 10 000 events.

Biodistribution

Biodistribution studies of LPD were performed at Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA TAAM UPS44, CNRS Orléans). ^[27] pDNA was labelled with ^{99m}Tc pertechnetate (^{99m}TcO₄⁻) ion. Briefly, pDNA (500 µg) in 0.5 mL distilled water was mixed with 100 µg SnF₂ and 500 µg ascorbic acid in a glass vial under vacuum. After 10 min at 25°C, ^{99m}Tc (175 MBq, Covidien) was added and the volume was completed to 1 mL with distilled water. ^{99m}Tc-DNA loaded LPD were formed as followed. ^{99m}Tc-DNA (100 µg/200 µL) was mixed with PEG-HpK (300 µg in 100 µL 10 mM Hepes buffer, pH 7.4). After 4 s mixing by vortex, the solution was kept for 30 min at 20°C. Then, LPD were formed by adding liposomes (100 µL at 5.4 mM; 200 µg) to polyplexes with gentle mixing. The solution was kept for 15 min at 20°C before used. Before injection, the solution was completed successively with 400 µL water, 100 µL of 50% sucrose aqueous solution and 100 µL of 100 mM Hepes buffer, pH 7.4. ^{99m}Tc-DNA loaded LPD (25 µg DNA/200 µL) were injected in mice *via* the tail vein. Static images were acquired using a high-resolution planar gamma camera combining a 4-mm NaI thick crystal with a 5-inch diameter position sensitive Hamamatsu R3292 photomultiplier (Gamma imager, Biospace Mesures, France). Acquisitions were obtained using a 35-mm parallel-hole collimator with 1.3-mm diameter holes. Data were acquired using a 20% window centred on the 140keV photopeak of ^{99m}Tc in a 128x128 matrix, and recorded on a dedicated computer system for digital display and analysis (Gamma Acquisition and Gamma Vision+, Biospace Mesures). After 5h, mice were sacrificed and autopsied immediately after the last imaging. The spleen, kidneys, lungs and liver were removed and weighed. The radioactivity in these organs was then counted on the gamma imager. The counts obtained were corrected for radioactive decay of ^{99m}Tc and then expressed as a percent of the total radioactivity found in these organs.

Determination of the transfection efficiency into splenic DCs

Mice were intravenously injected with 220 µL of 25 µg EGFP LPD or 25 µg EGFP LPR in water plus 5% sucrose. Spleens were harvested 24 h after injection and DCs were enriched by using magnetic anti-mouse CD11c antibodies (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) and MACS MS columns (Miltenyi Biotec SAS) according to manufacturer's protocol. Then, the cells were stained with APC-labelled anti-mouse CD11c antibodies (Miltenyi Biotec SAS)

and at least 40 000 cells were analysed with a flow cytometer (BDLSR, Becton Dickinson with $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$ for EGFP fluorescence and $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 660 \pm 13 \text{ nm}$ for APC fluorescence).

Vaccination and primary tumour challenge

Mice were intravenously injected either with 12.5 μg MART1 LPR100 plus 12.5 μg MART1_LAMP1 LPR100 or 12.5 μg MART1 Man₁₁-LPR100 plus 12.5 μg MART1_LAMP1 Man₁₁-LPR100 in 220 μL of 5% sucrose endonuclease free water on day 0 and day 7. On day 14, mice were challenged by intradermal injection of 10^5 B16F10 cells in 100 μL of phosphate buffered saline and the tumour volume was measured three times a week. Tumor volume (V) was expressed as the half of the square of the smallest diameter (l) multiplied by its largest diameter (L) : $V = (L \times l)^2 / 2$.^[28] Animals that developed tumours with L of 410 mm were euthanized for ethical reasons. Survival time was calculated with XLSTAT 7.52.

Results

***In vitro* transfection of DCs with mRNA LPR100**

mRNA and pDNA encoding EGFP were formulated as lipopolyplexes. Nucleic acids (5 μg) were first condensed with the PEGylated histidylated polylysine (15 μg) before adding 10 μg of either Lip100 or Man₁₁-Lip100. The electrophoretic mobility shift assays showed that mRNA and pDNA did not migrate in the agarose gel, indicating that they were complexed with LPR100, LPD100, Man₁₁-LPR100 and Man₁₁-LPD100 at the ratio used (supplementary Fig 2 and Fig 3). The nucleic acid condensation was confirmed by fluorescence dye exclusion assay using ethidium bromide (supplementary Fig 4). The fluorescence of the dye was reduced by 58% and 59% in LPR100 and Man₁₁-LPR100, respectively. It was reduced by 65% and 77% in LPD100 and Man₁₁-LPD100, respectively. The size and the global charge (ζ potential) of the resulting nanoparticles were reported in Table 1. Both EGFP LPR100 and EGFP Man₁₁-LPR100 exhibit a size around 160 nm and a ζ potential of 25 mV. Comparatively, the size of EGFP LPD100 and EGFP Man₁₁-LPD100 was slightly smaller than lipopolyplexes made with EGFP mRNA. The charge of EGFP Man₁₁-LPD100 was less positive than those of LPR100 and Man₁₁-LPR100 while EGFP LPD100 was more positive. The *in vitro* transfection efficiency of DCs with EGFP LPR100 and EGFP Man₁₁-LPR100 was evaluated by using mouse DC2.4 cells that express the mannose receptor. Flow cytometry

measurements showed that Man₁₁-LPR100 were able to transfect 60% of DC2.4 cells with EGFP mRNA whilst LPR100 transfected 40% of cells (Fig 1). Of note, the number of EGFP positive cells was much lower in the case of pDNA transfection. Indeed, 40% and 21% of DC2.4 expressed EGFP upon transfection with EGFP Man₁₁-LPD100 and EGFP LPD100, respectively. Interestingly, both LPR100 and Man₁₁-LPR100 did not induce any cytotoxicity according to the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Indeed, the cell viability was above 90% upon 24 h transfection (supplementary Fig 5).

Biodistribution

The localisation of lipopolyplexes was monitored by 2D scintigraphy after intravenous administration of ^{99m}Tc-labeled DNA loaded lipopolyplexes. [27] Of note, the ^{99m}Tc-DNA loaded LPD100 solutions were clear and not cloudy indicating the absence of aggregates. The biodistribution of labelled pDNA was monitored from 30 min to 5 h post-administration. Gamma Acquisitions showed that the majority of LPD100 and Man₁₁-LPD100 were accumulated in the area comprising liver and spleen (supplementary Fig 6). This was completely different to the biodistribution of free ^{99m}Tc-labeled pDNA which was mainly found in the bladder 30 min after injection (supplementary Fig 7). After 5 h, animals were sacrificed and the radioactivity was measured in the lungs, spleen, kidneys and liver. The LPD accumulation was high in the liver compared to the other organs (Fig 2). Note that there was no significant difference between LPD100 and Man₁₁-LPD100 in terms of pDNA accumulation whatever the organs. The radioactivity found in the spleen corresponded to about 9% of the total radioactivity found in these organs and less than 5 % was present in the lungs.

Man₁₁-LPR100 enhances the number of mRNA transfected DCs in spleen

Next, we evaluated transfection efficiency of DCs in the spleen, a representative lymphoid organ. Mice were intravenously injected with 25 µg EGFP LPR100 or 25 µg EGFP Man₁₁-LPR100. Upon 24h, spleens were collected and CD11c⁺ cells enriched. The analysis of their fluorescence intensity by flow cytometry clearly shows that 12 % of splenic DCs expressed EGFP in mice that received Man₁₁-LPR100, whereas only 3 % of splenic DCs were EGFP positive in mice injected with LPR100 (Fig 3). The absence of significant difference between the accumulation of Man₁₁-LPD100 and LPD100 in the spleen shown by the radioactivity measurement (Fig 2), suggests that the higher transfection efficiency of DCs was owing to the better capture and uptake of Man₁₁-LPR100. When Man₁₁-LPD100 containing pDNA

encoding luciferase gene were injected intravenously 15 min prior intravenous injection of EGFP Man₁₁-LPR100, the number of EGFP positive CD11c⁺ cells in the spleen drastically dropped to 2% corresponding to 84% reduction of the EGFP positive cells (Fig 4). It is worth to note that we did not find any splenic DCs expressing EGFP upon intravenous injection of EGFP pDNA loaded Man₁₁-LPD100, demonstrating the superiority of mRNA transfection over DNA one (supplementary Fig 8).

B16F10 melanoma growth inhibition upon MART-1 mRNA vaccination

Mice were immunized with mRNA encoding the human melanoma MART-1 (MelanA) antigen sharing a 68.6% amino-acid sequence identity with its mouse counterpart. As we have previously described, the antitumor response was significantly higher when mice have been immunized both with MART-1 mRNA and MART-1_LAMP-1 mRNA instead of MART-1 mRNA alone.^[16] Thus, mice were immunized by injection of vaccine comprising 12.5 µg MART-1 lipopolyplexes plus 12.5 µg MART1_LAMP1 lipopolyplexes (termed MART-1 LPR for convenience). The physicochemical parameters (size and ζ potential) of MART-1 Man₁₁-LPR100 and MART-1_LAMP-1 Man₁₁-LPR100 were close to those made with EGFP mRNA (Table 1). Those with LPR100 were smaller and less positive.

Mice were immunized by intravenous injection of indicated formulations at day 0 and day 7, and they were challenged with B16F10 cells at day 14 as described.^[16] In control mice injected with a sterile saline solution, the tumour volume increased with time with a value of 1600 mm³ at day 21 and a final volume before sacrifice of 2000 mm³ (day 23) (Fig 5). A nice inhibition of the tumour growth occurred in mice receiving MART-1 Man₁₁-LPR100. Indeed, the mean the tumour volume at day 21 was less than 200 mm³. An inhibition was also observed in mice receiving MART-1 LPR100 but the effect was lower than with MART-1 Man₁₁-LPR100. The mean of tumour volume at day 21 was close to 500 mm³ with MART-1 LPR100. Consequently, the survival of mice was significantly prolonged for mice immunized with MART-1 Man₁₁-LPR100 (Fig 5). While in the control group 60% of mice died at day 18 and no mice survived after day 23, 50 % of mice survived at day 30 in the group immunized with MART-1 Man₁₁-LPR100. In the group immunized with MART-1 LPR100, 50% of mice survived at day 23 but no mice survived at day 30. These results were correlated with the higher number of EGFP transfected DCs in the spleen of mice injected with EGFP Man₁₁-LPR100 compared to EGFP LPR100 (Fig 3).

Discussion

In the present study, we have incorporated mannose motifs into liposomes to increase the delivery and the transfection efficiency of mRNA lipopolyplexes into DCs. From an experimental point of view, EGFP or MART-1 mRNA (~900 nucleotides) was first condensed with a PEGylated histidylated polylysine. Next, a liposomal formulation comprising three lipids (a mannosylated lipid, an imidazole lipophosphoramidate and an imidazolium lipophosphoramidate), was added. Lipophosphoramidates have a chemical structure which is bio-inspired from the natural phospholipids present in the cell membranes and most of these synthetic vectors proved to exhibit a moderate or low toxicity according to *in vitro* [29, 30] and *in vivo* [31, 32] transfection assays. At the best, 11 mol % Man-lipid have been inserted in those liposomes to prepare Man₁₁-LPR100. [20] The size of LPR100 and Man₁₁-LPR100 was close to 160 nm and exhibited a ζ potential of 25 mV. We showed that EGFP Man₁₁-LPR100 allowed higher *in vitro* mRNA transfection of a DC cell line than the non mannosylated formulation. Despite high accumulation in the liver over the 5 h period upon intravenous injection, biodistribution studies showed that a significant amount of Man₁₁-LPD100 and LPD100 (~ 9 % of the total radioactivity found in the other organs *i.e.* liver, spleen, lungs and kidneys) has been accumulated in the spleen, a representative lymphoid tissue. Of note, a very low level of radioactivity was observed in the lung indicating that no aggregation of those formulations occurred in the blood leading to lung deposit as it is usually observed upon systemic administration of cationic polyplexes or lipoplexes. The high capture of lipopolyplexes by the liver is likely due to their cationic nature favouring interactions with serum proteins and erythrocytes, and capture by the liver reticulo-endothelium system. The use of a glycolipid containing a PEG spacer between the mannose residue and the lipid moiety could decrease the global charge of the lipopolyplexes and could also increase the mannose recognition with the mannose receptor.

The number of splenic DCs (CD11c⁺ cells) expressing EGFP was 4-fold higher when mice received EGFP Man₁₁-LPR100 than with EGFP LPR100. This number was drastically reduced by 84% when mice received a pre-injection of a same amount of Man₁₁-LPD100. So, even though the global quantity of LPR100 and Man₁₁-LPR100 accumulated in the spleen was similar, those bearing mannose residues led to a higher number of transfected DCs probably through a better mRNA internalization by those cells *via* the mannose receptor as demonstrated with pDNA loaded Man₁₁-LPD. [20] These results can be compared to those reported in the literature with mannosylated lipoplexes. Several reports indicate that DNA

transfection was enhanced in spleen upon injection of Man-lipoplexes; the enhancement being dependent of the administration route. ^[33-35] In spleen, the transfection efficiency upon intraportal injection of 50 µg pDNA encoding luciferase loaded in Man-C4-cholesterol:DOPE (L- α -di-oleoyl phosphatidylethanolamine) lipoplexes was 5-fold more than with non mannosylated lipoplexes. ^[33] The ovalbumin mRNA copy number in splenic DCs upon intravenous injection in mice of 50 µg pDNA encoding ovalbumin loaded in the same mannosylated lipoplexes, was about 2-fold higher than with non mannosylated lipoplexes. ^[34] In another case, when 100 µg pDNA encoding luciferase gene complexed with Man-C4-cholesterol: cholesterol: DOTMA liposomes have been intraperitoneally injected, the number of luciferase mRNA copies in splenic DCs was about 7-fold higher than that obtained with non mannosylated liposomes. ^[35] Here, the detection of the EGFP protein expression in splenic DCs suggests that Man₁₁-LPR100 is a better delivery system. Finally, when mice received a pre-injection of a same amount of Man₁₁-LPD100 15 min before the injection of Man₁₁-LPR100, the number of EGFP positive splenic DC was highly reduced. This result indicates that this dose likely induces a saturation of the mannose receptors of splenic DCs which in turn can no longer bind Man₁₁-LPR100 after the second injection.

Several authors have reported the superiority of mRNA over DNA to transfect DCs *ex vivo* by electroporation. ^[36-41] Their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes upon injection of DCs transfected with tumour antigen mRNA have been demonstrated in mice and humans. Here, we showed that the transfection efficiency of DC2.4 cells was higher with EGFP Man₁₁-LPR100 than with EGFP Man₁₁-LPD100 (Fig 1). With the same carriers, no EGFP positive splenic DCs were detected when EGFP pDNA was used as nucleic acid for *in vivo* assays. Our results demonstrate the superiority of mRNA over pDNA for *in vivo* transfection of splenic DCs. The better expression of EGFP upon mRNA transfection was due to the translation of mRNA that occurs in the cytosol in the absence of the nuclear machinery. Indeed, gene expression requires an efficient nuclear import of pDNA in the absence of cell division. Despite the development of various strategies, this is still a limiting step for DNA transfection with polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes. ^[42-45] Increasing mRNA stability/translational activity would improve the transgene expression efficiency in DCs transfected with mRNA. Although, the length of the Poly(A) of at least 100 adenosines has been reported to increase the transgene expression, a better accessibility of the translation machinery by facilitating the release of mRNA from the carrier would also improved the mRNA translation. ^[16, 25, 46]

The growth of the B16F10 tumour was more delayed in mice immunized with MART-1 Man₁₁-LPR100 compared to those immunized with MART-1 LPR100. The slow development of the tumour in mice immunized with MART-1 Man₁₁-LPR100 is correlated with a prolonged mice survival time. Altogether, our data suggest that these lipopolyplexes likely induce tumour specific cytotoxic T lymphocytes upon tumour antigen presentation by splenic DCs as previously described.^[16] However, one cannot exclude that a non specific effect could be also induced by long mRNA causing activation of the interferon pathway.^[10] Although the antitumor protection was not complete, this result demonstrates that Man₁₁-LPR100 formulation is more efficient than that the sugar free LPR100 one. Here, the tumour growth inhibition is likely correlated with the number of transfected splenic DCs suggesting a direct relationship between the number of DCs presenting antigen and the level of the immune response against tumour cells. Thus more than two injections would be performed to increase the number of transfected DCs and the vaccine effect.^[47] The tumour growth inhibition we have obtained is comparable to those obtained upon intraperitoneal injection of Man-C4-chol/chol/DOPTMA liposomes complexed with 50 µg pDNA encoding a polyvalent melanoma gene.^[48] In that case, mice have been challenged with B16BL6 melanoma cells after three injections of Man-lipoplexes with pDNA encoding a polyvalent melanoma gene expressing the ubiquitinylated gp100 and ubiquitinylated tyrosinase melanoma antigens. The ubiquitinylation has been performed to target proteasome and to enhance the MHC class I antigen presentation upon DCs transfection.^[49, 50] This might suggest that MART-1 Man₁₁-LPR100 is more efficient than mannosylated lipoplexes containing polyvalent melanoma pDNA. Thus, our vaccine effect could be further improved by using Man₁₁-LPR100 loaded with a cocktail of mRNA containing MART-1, gp100 and tyrosinase. This might increase the chance to prevent cancer cells to escape from the immune response. Further works are in progress to evaluate the therapeutic effect of MART-1 Man₁₁-LPR100.

Acknowledgements

We thank A. Lepape, S. Lerondel (CNRS TAAM, UPS44 Orléans) for their help in the biodistribution studies.

Appendix A. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

References

1. Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
2. Villadangos J A, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7:543-555
3. Villadangos J A, Heath W R, Carbone F R. Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol* 2007;28:45-47
4. Tang D C, DeVit M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154
5. Kutzler M A, Weiner D B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008;9:776-788
6. Ribas A, Butterfield L H, Economou J S. Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* 2000;5:87-98
7. Ribas A, Butterfield L H, Hu B, Disette V B, Chen A Y, Koh A, Amarnani S N, Glaspy J A, McBride W H, Economou J S. Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *J Immunother* 2000;23:59-66
8. Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004;199:251-263
9. Pascolo S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). *Handb Exp Pharmacol* 2008;221-235
10. Weide B, Garbe C, Rammensee H G, Pascolo S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunol Lett* 2008;115:33-42
11. Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 1996;35:1027-1036

12. Whitmore M M, Li S, Falo L, Jr., Huang L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:503-514
13. Li S D, Huang L. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells. *Mol Pharm* 2006;3:579-588
14. Li S D, Huang L. Surface-modified LPD nanoparticles for tumor targeting. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1082:1-8
15. Hoerr I, Obst R, Rammensee H G, Jung G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* 2000;30:1-7
16. Mockey M, Bourseau E, Chandrashekhar V, Chaudhuri A, Lafosse S, Le Cam E, Quesniaux V F, Ryffel B, Pichon C, Midoux P. mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther* 2007;14:802-814
17. Midoux P, Pichon C, Yaouanc J J, Jaffres P A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* 2009;157:166-178
18. Mevel M, Neveu C, Goncalves C, Yaouanc J J, Pichon C, Jaffres P A, Midoux P. Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem Commun (Camb)* 2008;3124-3126
19. Mevel M, Breuzard G, Yaouanc J J, Clement J C, Lehn P, Pichon C, Jaffres P A, Midoux P. Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *Chembiochem* 2008;9:1462-1471
20. Perche F, Gosset D, Mével M, Miramon M-L, Yaouanc J, Pichon C, Benvegna T, Jaffrès P-A, Midoux P. Selective gene delivery in dendritic cells with Mannosylated and Histidylated Lipopolyplexes. *J. Drug Target* 2010;
21. Midoux P, Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconj Chem* 1999;10:406-411

22. Montier T, Delepine P, Benvegna T, Ferrieres V, Miramon M L, Dagorn S, Guillaume C, Plusquellec D, Ferec C. Efficient gene transfer into human epithelial cell lines using glycosylated cationic carriers and neutral glycosylated co-lipids. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:271-282
23. Heiser A, Dahm P, Yancey D R, Maurice M A, Boczkowski D, Nair S K, Gilboa E, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol* 2000;164:5508-5514
24. Tuyaerts S, Michiels A, Corthals J, Bonehill A, Heirman C, de Greef C, Noppe S M, Thielemans K. Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 2003;10:696-706
25. Mockey M, Goncalves C, Dupuy F P, Lemoine F M, Pichon C, Midoux P. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1062-1068
26. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock K L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997;158:2723-2730
27. Delepine P, Guillaume C, Montier T, Clement J C, Yaouanc J J, Des Abbayes H, Berthou F, Le Pape A, Ferec C. Biodistribution study of phosphonolipids: a class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer. *J Gene Med* 2003;5:600-608
28. Tomayko M M, Reynolds C P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24:148-154.
29. Mevel M, Montier T, Lamarche F, Delepine P, Le Gall T, Yaouanc J J, Jaffres P A, Cartier D, Lehn P, Clement J C. Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjug Chem* 2007;18:1604-1611

30. Lamarche F, Mevel M, Montier T, Burel-Deschamps L, Giamarchi P, Tripier R, Delepine P, Le Gall T, Cartier D, Lehn P, Jaffres P A, Clement J C. Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjug Chem* 2007;18:1575-1582
31. Le Gall T, Loizeau D, Picquet E, Carmoy N, Yaouanc J J, Deschamps L, Delépine P, Giamarchi P, Jaffrès P A, Lehn P, T M. A novel cationic lipophosphoramidate with di-unsaturated lipid chains : synthesis, physico-chemical and transfection activities. *J. Med. Chem.* 2010; 53: 1496-1508
32. 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. *Bioconjug Chem* 2005;16:1051-1053
33. Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther* 2000;7:292-299
34. Hattori Y, Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M. Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:992-999
35. Hattori Y, Kawakami S, Nakamura K, Yamashita F, Hashida M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:828-834
36. Landi A, Babiuk L A, van Drunen Littel-van den Hurk S. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. *J Leukoc Biol* 2007;82:849-860
37. Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* 2000;7:2028-2035

38. Ceppi M, Schmidt E, Pierre P. Genetic modification of murine dendritic cells by RNA transfection. *Methods Mol Biol* 2009;531:145-156
39. Boczkowski D, Nair S K, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996;184:465-472
40. Schuurhuis D H, Verdijk P, Schreiber G, Aarntzen E H, Scharenborg N, de Boer A, van de Rakt M W, Kerkhoff M, Gerritsen M J, Eijkelers F, Bonenkamp J J, Blokx W, van Krieken J H, Boerman O C, Oyen W J, Punt C J, Figdor C G, Adema G J, de Vries I J. In situ expression of tumor antigens by messenger RNA-electroporated dendritic cells in lymph nodes of melanoma patients. *Cancer Res* 2009;69:2927-2934
41. Kyte J A, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, Gullestad H P, Ryder T, Lislérud K, Hammerstad H, Gaudernack G. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther* 2006;13:905-918
42. Wagstaff K M, Jans D A. Nucleocytoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene transfer. *Biochem J* 2007;406:185-202
43. Mesika A, Kiss V, Brumfeld V, Ghosh G, Reich Z. Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum Gene Ther* 2005;16:200-208
44. Breuzard G, Tertilt M, Goncalves C, Cheradame H, Geguan P, Pichon C, Midoux P. Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e71
45. Goncalves C, Ardourel M Y, Decoville M, Breuzard G, Midoux P, Hartmann B, Pichon C. An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med* 2009;11:401-411
46. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Tureci O, Sahin U. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 2006;108:4009-4017

47. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials* 2010;31:7813-7826
48. Lu Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes. *Biomaterials* 2007;28:3255-3262
49. Tanaka M, Kaneda Y, Fujii S, Yamano T, Hashimoto K, Huang S K, Hoon D S. Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Mol Ther* 2002;5:291-299
50. Rodriguez F, An L L, Harkins S, Zhang J, Yokoyama M, Widera G, Fuller J T, Kincaid C, Campbell I L, Whitton J L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol* 1998;72:5174-5181

Table 1: Size and ζ potential of lipopolyplexes.

	LPR100						LPD100	
	mRNA						pDNA	
	EGFP		MART-1		MART-1_LAMP-1		pCMV-EGFP	
	Size (nm)	ζ (mV)	Size (nm)	ζ (mV)	Size (nm)	ζ (mV)	Size (nm)	ζ (mV)
sugar free	169 $\pm$ 7	25.5 $\pm$ 3.1	94 $\pm$ 9	13.8 $\pm$ 2.8	106 $\pm$ 1	12.8 $\pm$ 1.7	152 $\pm$ 54	36.5 $\pm$ 12
Man ₁₁	154 $\pm$ 4	24.6 $\pm$ 3.8	162 $\pm$ 8	18.3 $\pm$ 1.7	142 $\pm$ 3	16.9 $\pm$ 1.6	137 $\pm$ 48	17 $\pm$ 3

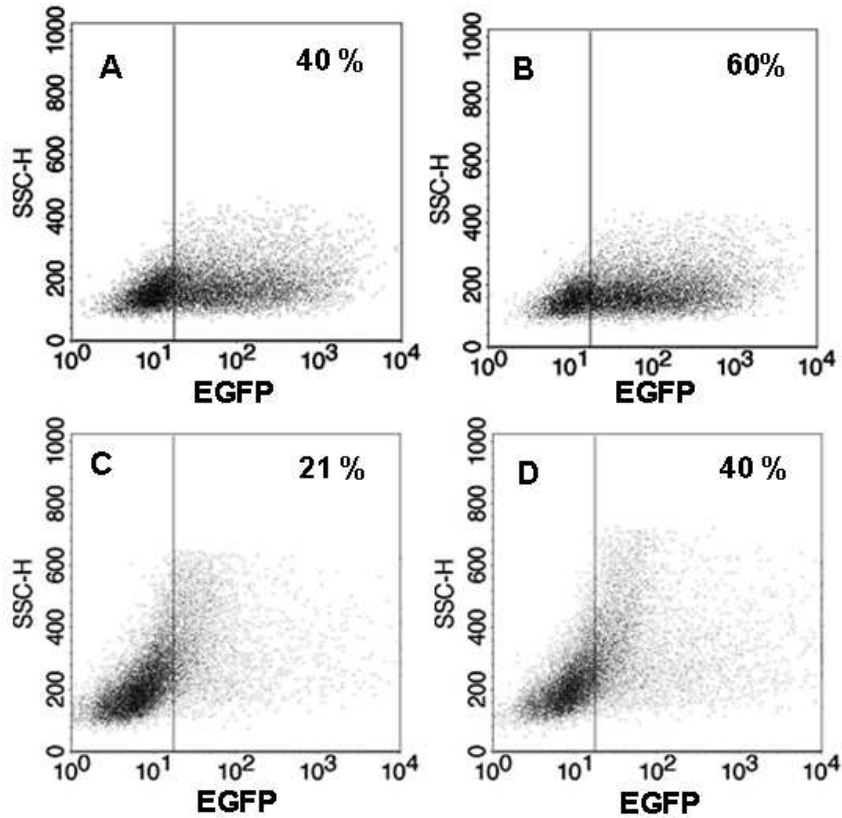


Figure 1: *In vitro* mRNA and DNA transfection efficiency. DC2.4 cells were transfected with (A) EGFP LPR100, (B) EGFP Man₁₁-LPR100, (C) EGFP LPD100, (D) EGFP Man₁₁-LPD100. The cell fluorescence intensity was measured by flow cytometry. On the left side of the bar is the fluorescence intensity of non transfected cells - cells transfected with a plasmid encoding the luciferase gene - and on the right side, the fluorescence intensity of EGFP transfected cells.

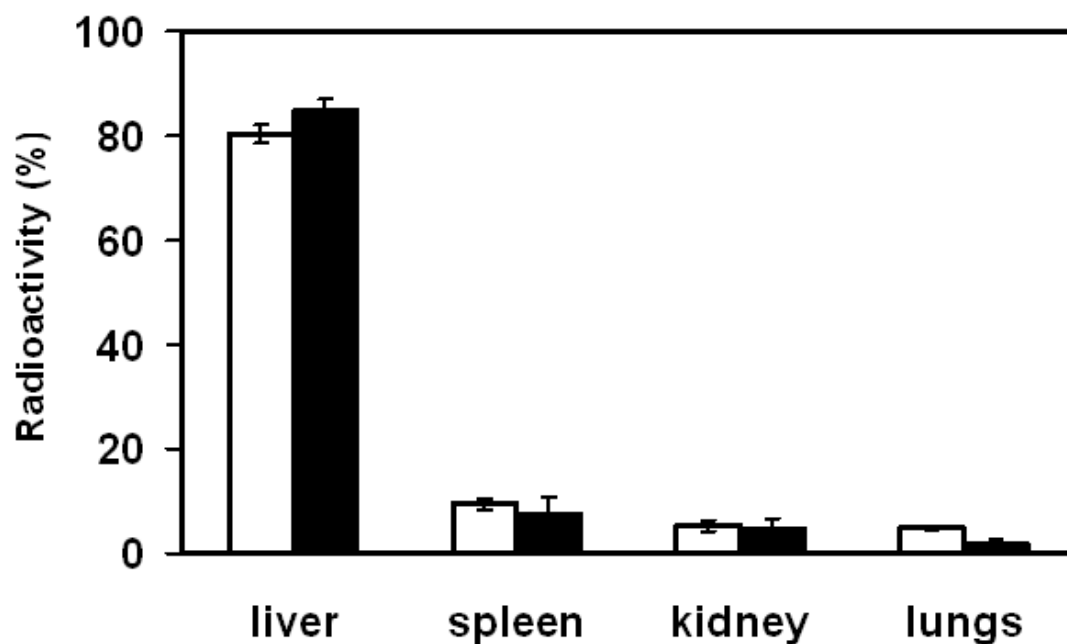


Figure 2: Biodistribution of LPD100 or Man₁₁-LPD100. Mice (n=3) received intravenous injection of 25 µg of ^{99m}Tc-DNA loaded LPD100 (white bars) or 25 µg of ^{99m}Tc-DNA loaded Man₁₁-LPD100 (black bars). Five hours after administration, animals were sacrificed and the radioactivity was measured in the lungs, spleen, kidneys and liver. Radioactivity (%) corresponds to the percent of the total radioactivity found in these organs.

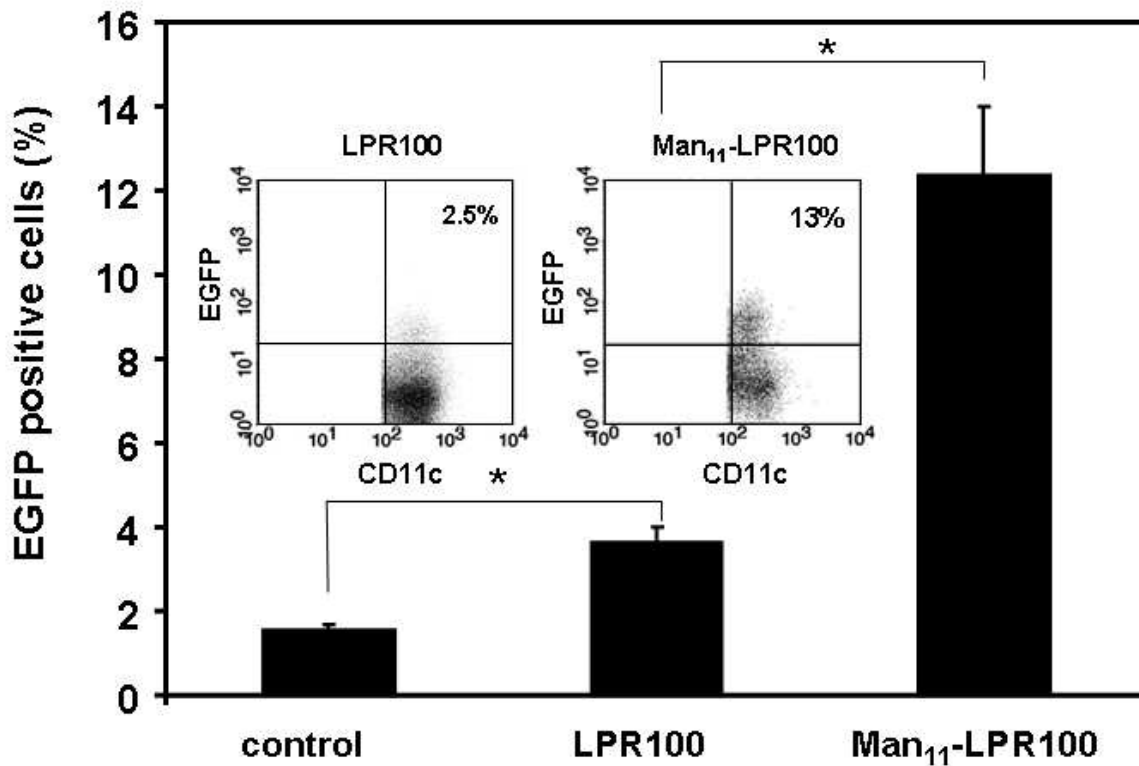


Figure 3: *In vivo* transection efficiency of splenic DCs by Man₁₁-LPR100. Mice (n=3) received intravenous injection of 25 μ g of EGFP LPR100 or 25 μ g of EGFP Man₁₁-LPR100. After 24h, DCs from spleen were magnetically enriched with anti-CD11c antibody and the number of EGFP positive CD11c cells was measured by flow cytometry. In control, mice received MART1 LPR100. Statistical analysis was performed (Student's t-test) * $p < 0.01$. Insert: representative flow cytometry plots of enriched DC from spleens of mice injected with EGFP LPR100 or EGFP Man₁₁-LPR100. Plots show cells after gating on CD11c positive cells.

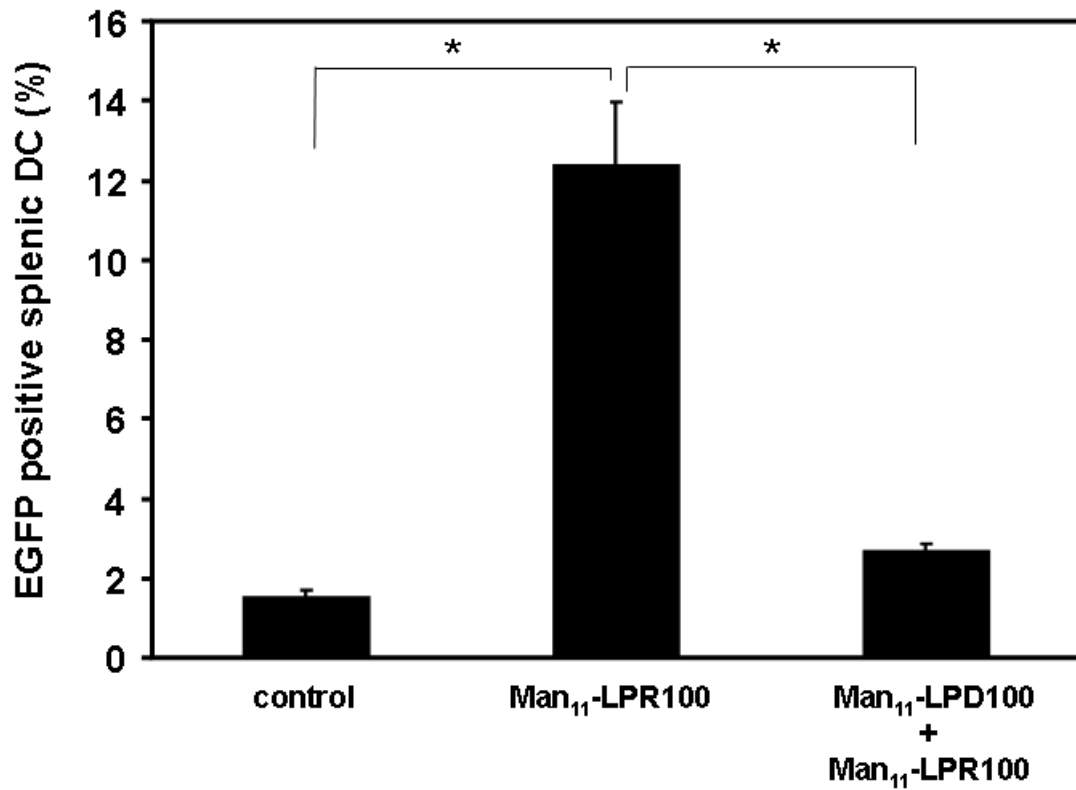


Figure 4: Effect of preinjection of Man₁₁-LPD100 on the transfection efficiency of splenic DCs by mRNA loaded Man₁₁-LPR100. Mice (n=3) received intravenous injection of 25 µg of Luc DNA Man₁₁-LPD100 or 0.15 M NaCl. After 15 min, mice received intravenous injection of 25 µg of EGFP mRNA Man₁₁-LPR100. After 24 h, DCs from spleen were magnetically enriched with anti-CD11c antibody and the number of EGFP positive CD11c cells was measured by flow cytometry. In control, mice received MART1 mRNA LPR100. Statistical analysis was performed (Student's t-test) * p < 0.01; pre Man₁₁-LPD100 were statistically different p = 0.01.

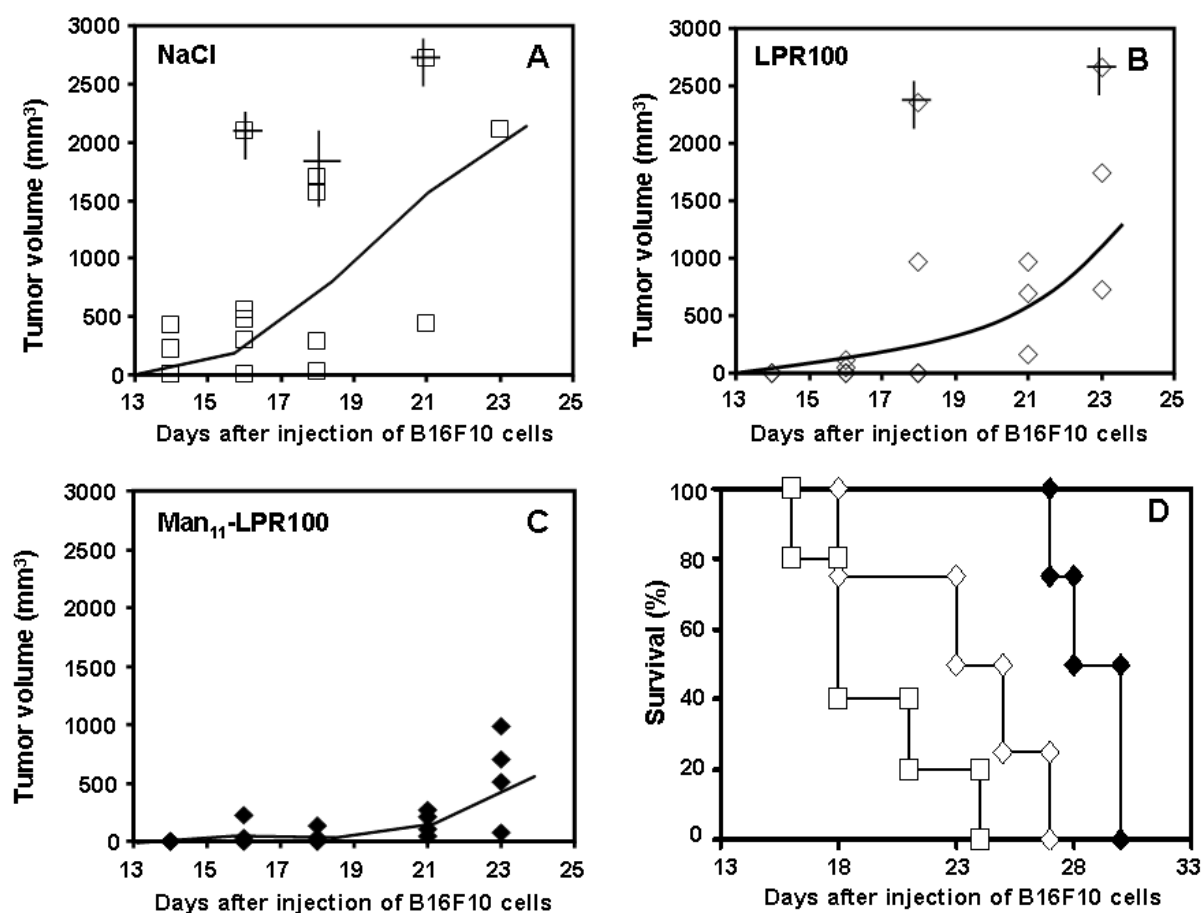
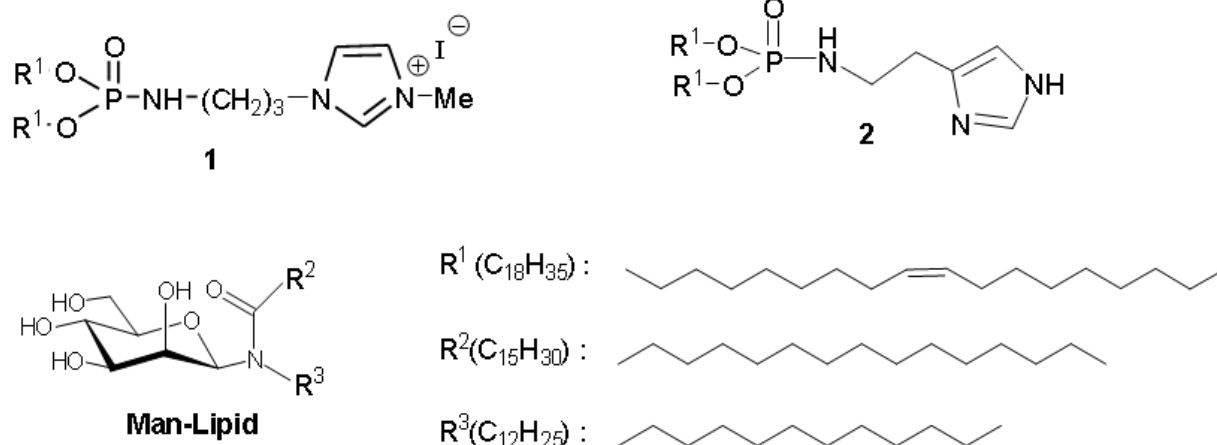
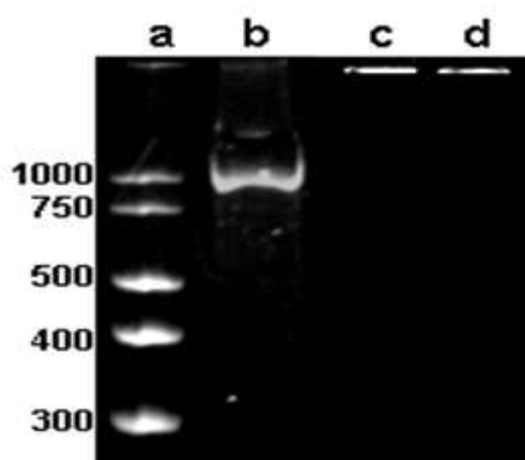


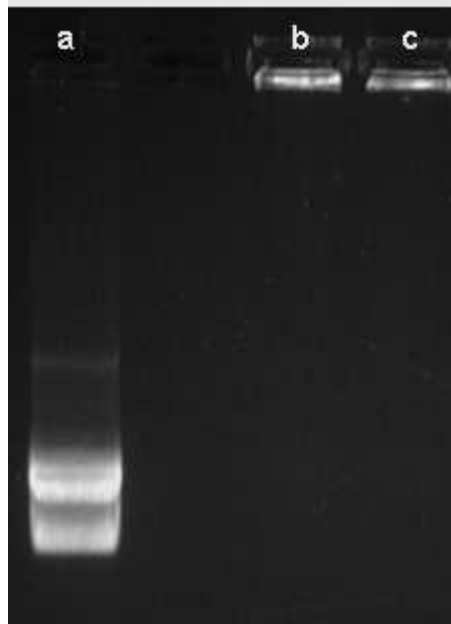
Figure 5: Antitumor efficiency of MART-1 Man₁₁-LPR100. Mice (n=4) were immunized on days 0 and 7 by intravenous injection of 12.5µg MART-1 LPR100 plus 12.5 µg MART-1_LAMP-1 LPR100 (white diamonds, **B**) or 12.5µg MART-1 Man₁₁-LPR100 plus 12.5 µg MART-1_LAMP-1 Man₁₁-LPR100 (black diamonds, **C**). In control, mice (n=5) received a sterile 0.15 M NaCl solution (white squares, **A**). On day 14, 10⁵ B16F10 melanoma cells were injected intradermally, and the tumour volume was measured every 2 days. † Mouse died at the indicated time point. (**D**) The survival time was evaluated by Kaplan-Meier's test. Man₁₁-LPR100 group was statistically different by Kruskal-Wallis test, p=0.014.



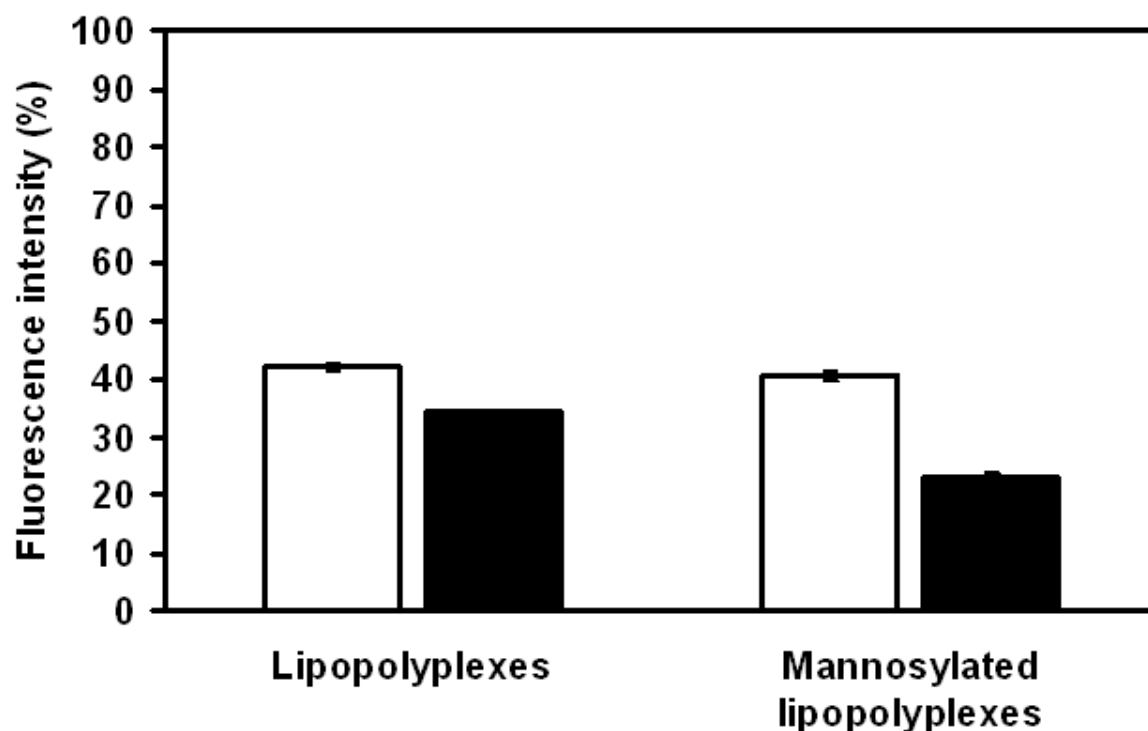
Supplementary Fig 1: Lipid structures. **1:** *O,O*-dioleoyl-*N*-[3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate; **2:** *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine phosphoramidate; **Man-lipid:** β -D-mannopyranosyl-*N*-dodecylhexadecanamide.



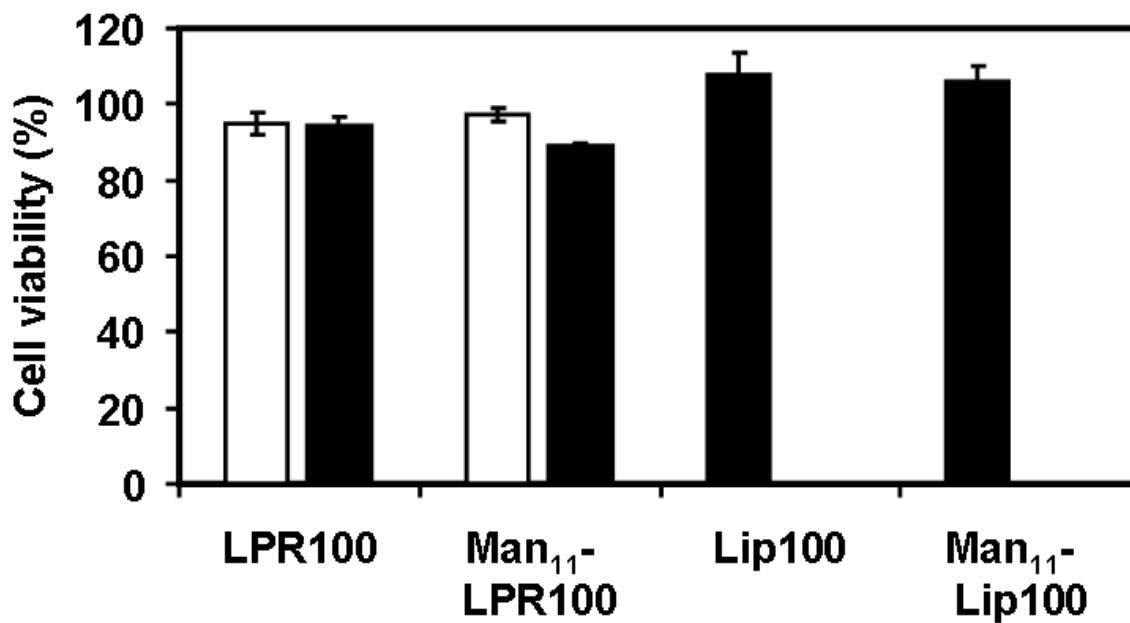
Supplementary Fig 2: Electrophoretic mobility shift assay of LPR. LPR100 and Man₁₁-LPR100 were formed with EGFP mRNA. LPR (1 μ g mRNA) were loaded loaded in a 1% agarose-formaldehyde gel and electrophoresis was run for 1h at 90V in MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid). Lane a: RNA CenturyTM Marker-Plus (Ambion, Oxfordshire, UK); lane b: EGFP mRNA (915 nt); lane c: LPR100; lane d: Man₁₁ LPR100. RNA was revealed by éthidium bromide (Promega, Charbonnières, France).



Supplementary Fig 3: Electrophoretic mobility shift assay of LPD. LPD100 and Man₁₁-LPD100 were formed with EGFP pDNA. LPD (1μg pDNA) were loaded in a 0.6% agarose gel and electrophoresis was run for 1h at 90V in TAE. Lane a: EGFP pDNA (5310 bp); lane b: LPD100; lane c: Man₁₁ LPD100. pDNA was revealed by éthidium bromide (Promega, Charbonnieres, France).

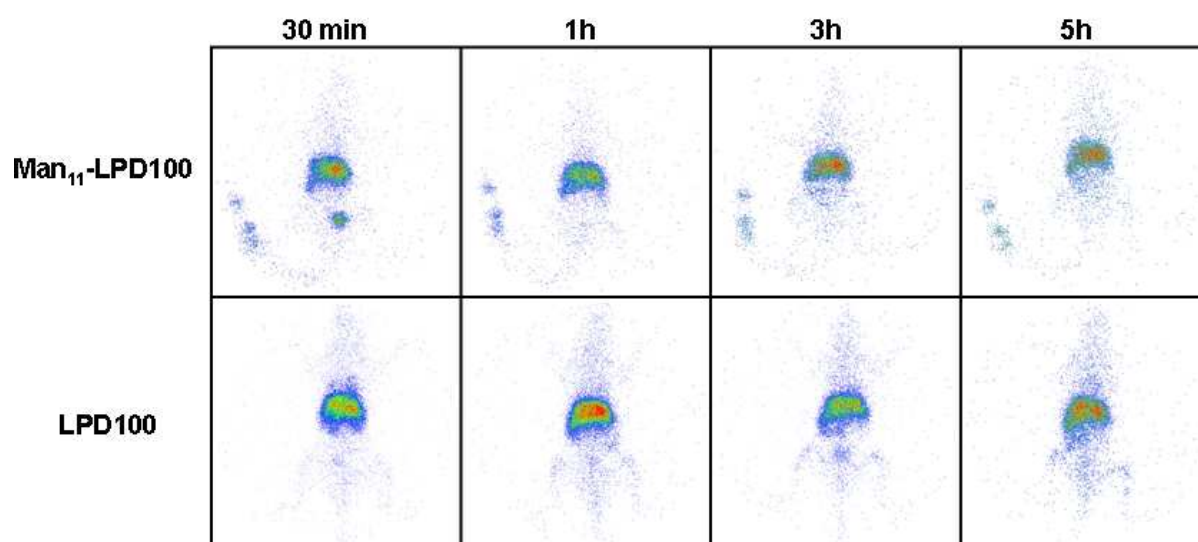


Supplementary Fig 4: Fluorescence spectroscopy assessment of mRNA and pDNA complexation in LPR100 and LPD100, respectively. The fluorescence intensity (white bar) of 5 μ g EGFP mRNA, LPR100 or Man₁₁-LPR100 was measured in the presence of 3 ng/ μ L ethidium bromide. The fluorescence intensity (black bar) of 5 μ g EGFP pDNA, LPD100 or Man₁₁-LPD100 was measured in the presence of 3 ng/ μ L ethidium bromide. The fluorescence intensity was measured with a Shimadzu RF-5000 spectrophotofluorimeter (Shimadzu, Champs sur Marne, France) at 620 nm under excitation at 530 nm. The fluorescence intensity of mRNA and pDNA lipopolyplexes is expressed as the percentage of the fluorescence intensity of free mRNA or free pDNA, respectively.

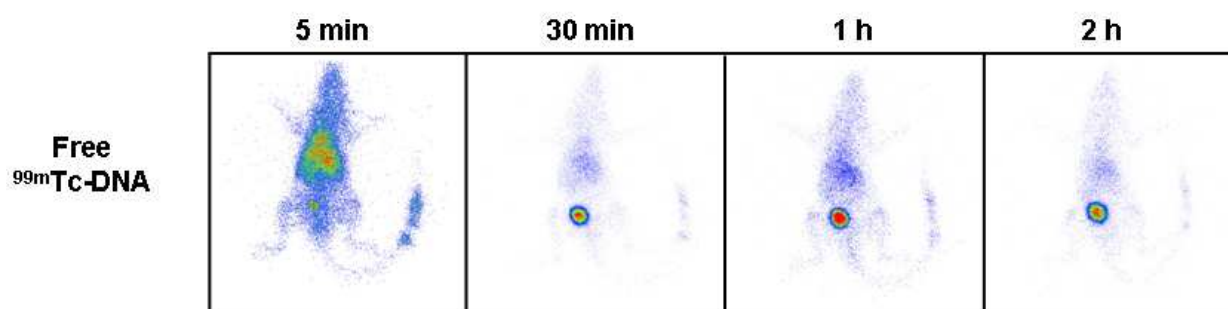


Supplementary Fig 5: mRNA LPR cytotoxicity. DC2.4 cells were incubated either with 10.8µM liposomes 100 (Lip100) or Man₁₁-Liposomes100 (Man₁₁-Lip100) or with LPD100 or Man₁₁-LPD100 lipopolyplexes (white bars: 1.25 µg EGFP mRNA; black bars: 2.5 µg EGFP mRNA). The cell viability was measured 24h post-incubation by using the MTT assay. The values shown are averages of three independent experiments.

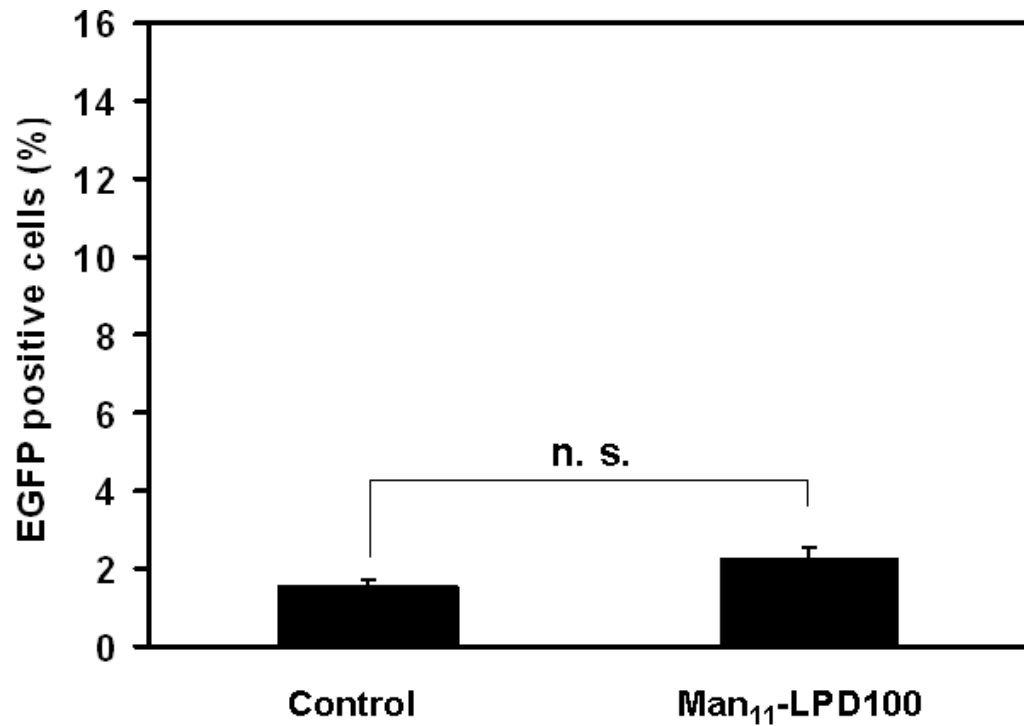
The cell viability was determined with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Mossmann 1983). Forty six hours after transfection, MTT (20 µL of a 5 mg/mL solution in PBS) was added to the cells in 100 µL culture medium and cells were incubated for 4 h at 37°C. Cells were then washed with PBS and the MTT converted in formazan was solubilised with acidic isopropanol (99.5 %) and the absorbance was measured at 570 nm with Victor I spectrophotometer (560 ± 10). The cell viability was expressed as a percentage of absorbance of non transfected cells cultured in the same conditions. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.



Supplementary Fig 6: Representative 2D scintigraphies of mice upon intravenous injection of 25 μ g of ^{99m}Tc -DNA loaded Man₁₁-LPD100 or 25 μ g of ^{99m}Tc -DNA loaded LPD100.



Supplementary Fig 7: Representative 2D scintigraphies of a control mouse upon intravenous injection of 25 μ g of free ^{99m}Tc -DNA.



Supplementary Fig 8: *In vivo* transfection efficiency of splenic DCs by Man₁₁-LPD100. Mice (n=3) received intravenous injection of 25 µg of EGFP Man₁₁-LPD100. After 24h, DCs from spleen were magnetically enriched with anti-CD11c antibody and the number of EGFP positive CD11c cells was measured by flow cytometry. In control, mice received MART1 LPR100. Statistical analysis was performed (Student's t-test), n.s.: not significant.

Le retard de croissance tumorale est plus important lorsque les souris sont vaccinées simultanément avec les ARNm MART1 et MART1-LAMP1 comme montré précédemment par Mockey et coll. (Mockey et coll., 2007). Ce résultat est remarquable car pris séparément ces ARNm induisent des protections beaucoup plus faibles voire nulle dans le cas de l'ARNm MART1-LAMP1. Afin de préciser si cet effet est dû à une réelle synergie pour stimuler la réponse immunitaire spécifique, les souris ont été immunisées avec le mélange ARNm MART1 plus ARNm codant la luciférase (Luc) *a priori* non antigénique pour les cellules B16F10. En effet, la synergie observée pourrait être due à une stimulation immunitaire spécifique ou non induite par l'ARNm MART1-LAMP1. Un effet de ce type a été rapporté par la société CUREVAC GMBH (GMBH, 2010) qui utilise des ARNm nus comme adjuvants. Dans ce brevet ils détaillent l'utilisation comme adjuvants d'ARNm codant des antigènes de tumeurs et/ou associés à la progression tumorale. La présence de l'ARNm MART1-LAMP1 pourrait servir également de leurre et augmenter la stabilité de l'ARNm MART1 vis-à-vis des RNAses et donc son efficacité de transfection ce qui est observé *in vitro* lors de la cotransfection avec des séquences polyA (Mockey et coll., 2006).

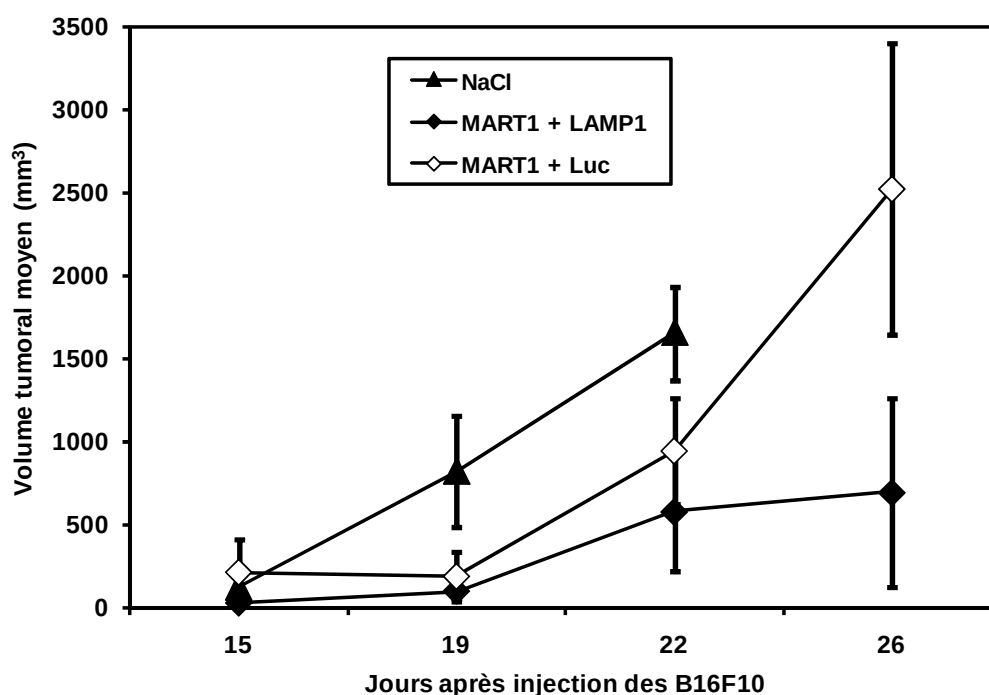


Figure 47: Effet synergiques des ARNm MART1 et MART1-LAMP1. Les souris ont reçu, par intraveineuse, aux jours -14 et -7 (◆) des Man₁₁%-LPR100 avec 12,5µg d'ARNm ARCA-MART1-A100 plus des Man₁₁%-LPR100 avec 12,5µg d'ARNm ARCA-MART1_LAMP1-A100 ; (◇) des Man₁₁%-LPR100 avec 12,5µg d'ARNm ARCA-MART1-A100 plus des Man₁₁%-LPR100 avec 12,5µg d'ARNm ARCA-Luc-A100 ; (▲) une solution de NaCl 0,15 M en contrôle. Des cellules B16F10 ont été greffées à J0. Les courbes représentent l'évolution des volumes tumoraux moyens pour chaque groupe.

Comme le montrent les résultats de la figure 47, les souris immunisées avec ARNm MART1 plus ARNm MART1-LAMP1 sont mieux protégées que celles ayant reçu le mélange ARNm MART1 plus ARNm Luc. Ceci suggère que la protéine MART1-LAMP1 joue un rôle dans la réponse immune induite, rôle qui vient s'ajouter à celui de MART1. Cette action pourrait être expliquée par une présentation des antigènes simultanément sur les complexes CMH-I et CMH-II ce qui permettrait une réponse immune plus efficace.

Chapitre IV : Structure des LPR

Les LPD100 et LPR100 sont des complexes ternaires formés d'un acide nucléique, de liposomes et d'un polymère cationique. La structure résultante de ces complexes supramoléculaires est inconnue. Les études de microscopie électronique à transmission (TEM) réalisées par Mockey et coll., montrent que les nanoparticules de LPR23 résulteraient de l'encapsulation de polyplexes d'ARNm (denses aux électrons) dans les vésicules lipidiques (Fig. 24 p. 61 ; Mockey et coll., 2007).

Pour les LPR100, nous avons conduit une étude par cryomicroscopie électronique (cryoTEM). La cryoTEM a été réalisée avec le Dr. Olivier Lambert à Bordeaux. Cette étude bien qu'incomplète donne déjà des informations sur ce que pourraient être les LPR du point de vue structural.

La cryomicroscopie préserve l'hydratation des échantillons et permet d'étudier la structure native des objets dans leur tampon. Cette technique permet de s'affranchir de la présence de colorant ou de fixateur chimique, respectant ainsi mieux la structure de l'objet. De plus, pour la microscopie électronique négative, l'échantillon est préparé dans des solutions ioniques qui pourraient modifier la complexation de l'ADN par les vecteurs.

Elle consiste à congeler très rapidement de minces échantillons hydratés et déposés sur une grille en cuivre recouverte d'une fine couche de carbone trouée dans de l'éthane liquide, de façon à les figer dans un état proche de leurs conditions physiologiques.

Nous avons étudié la structure des liposomes 100, des liposomes 100 mannosylés, des polyplexes d'ARNm ainsi que des LPR100 et LPR100 mannosylés.

Liposomes 100

Comme le montrent les images de cryoTEM des figures 48 et 49, les liposomes 100 et les liposomes 100 mannosylés forment à la fois des petites vésicules avec une bicouche lipidique (flèches noires) et des structures multilamellaires plus grosses (flèches blanches). Ces dernières ont une organisation concentrique. Pris séparément, le lipide 1 forme des vésicules à bicouche classique (Fig. 50). Le colipide 2 seul ne présente aucune organisation claire mais pourrait s'organiser selon une structure hexagonale ou selon un mélange structure hexagonale / structure lamellaire (Fig. 51). Le mélange équimolaire conduit à la formation de vésicules hétérogènes. On peut penser que cette hétérogénéité est due à l'association des deux lipides et les groupements imidazoles pourraient en être responsables. Il semblerait que l'association entre un lipide chargé et un lipide non chargé porteurs de groupements imidazoles ne soit pas en faveur d'une organisation en vésicules avec bicouches lipidiques.

Les vésicules à bicouche sont semblables à celle observées par Gustafsson et coll. (Gustafsson et coll., 1995) avec des liposomes DOTAP, par (Smisterova et coll., 2001) avec des liposomes SAINT-2/DOPE et par (Simberg et coll., 2001) avec des liposomes DOSPA/DOPE. Pour les liposomes 100, on peut mesurer des tailles de 40 à 50 nm pour les vésicules à bicouche et 60 à 75 nm pour les vésicules multilamellaires. Les liposomes mannosylés sont plus gros. Les vésicules à bicouches lipidiques ont des tailles de 70 à 100 nm et les vésicules multilamellaires de 75 à 100 nm. Ces valeurs sont inférieures à celles déterminées par granulométrie laser (100-160 nm). Cependant, la granulométrie mesure des tailles en solution en assimilant les particules à des sphères et donne une taille moyenne alors que, par cryomicroscopie, la taille est mesurée sur des projections des objets dans une couche hydratée de 100 nm sans cette première approximation.

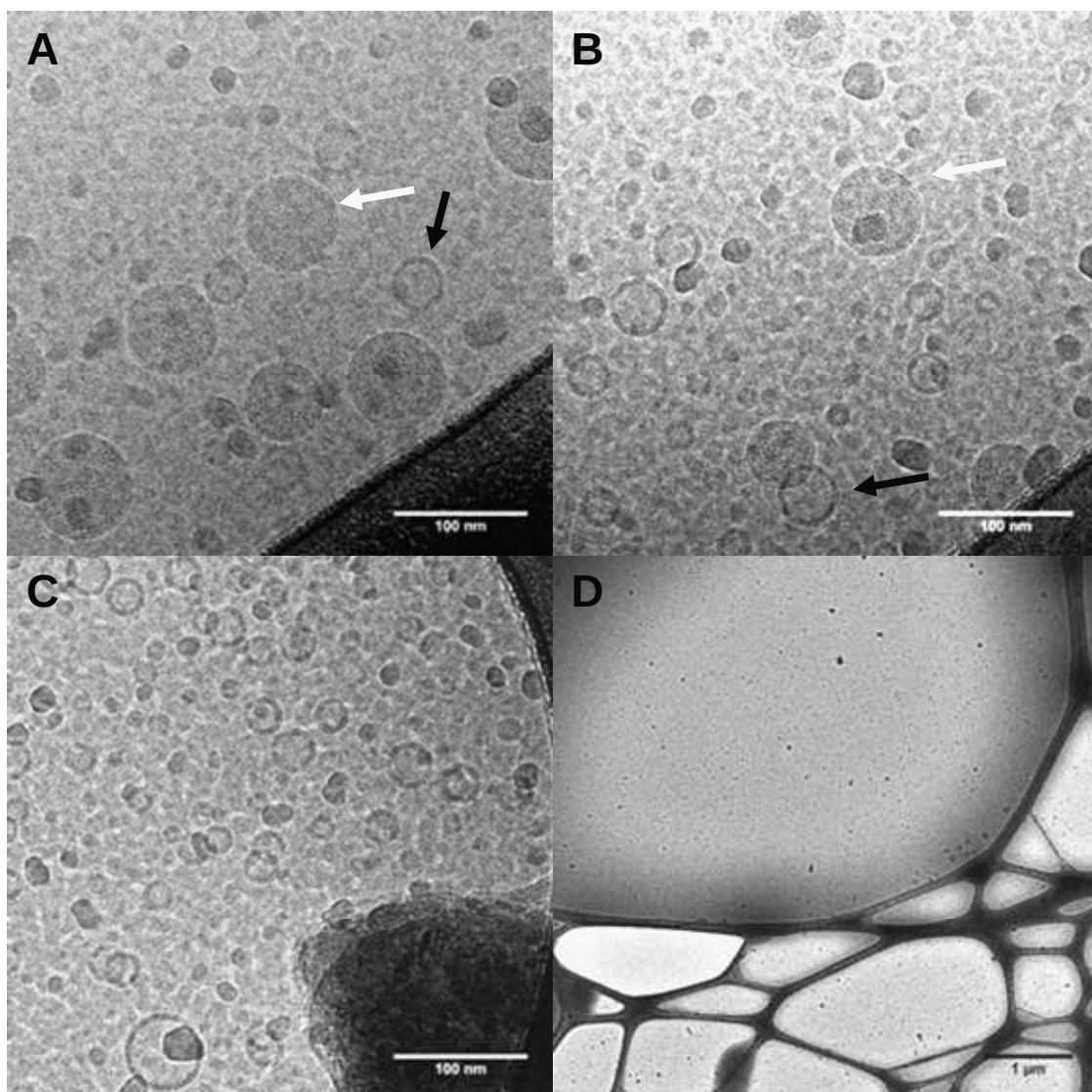


Figure 48 : Photographie de liposomes 100 par cryomicroscopie électronique.

A,B,C : photographies de liposomes grossissement x 50 000 ; D : photographie à champ large grossissement x 1000. Flèches blanches : structures lamellaires ; flèches noires : bicouches.

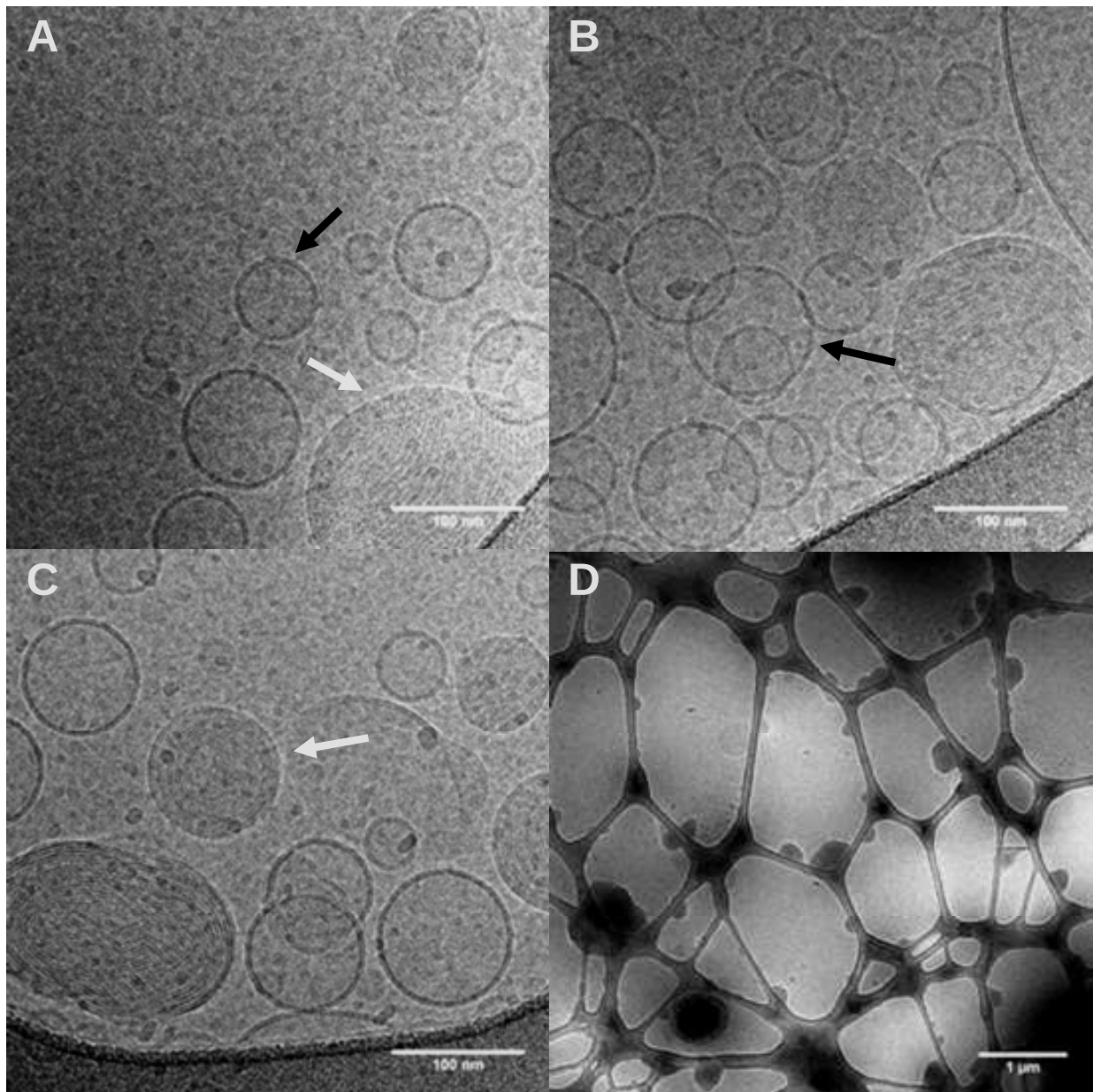


Figure 49 : Photographies de liposomes mannosylés par cryomicroscopie électronique. A,B,C : photographies de liposomes mannosylés grossissement x 50 000 ; D : photographie à champ large grossissement x 1000. Flèches blanches : structures lamellaires ; flèches noires : bicouches.

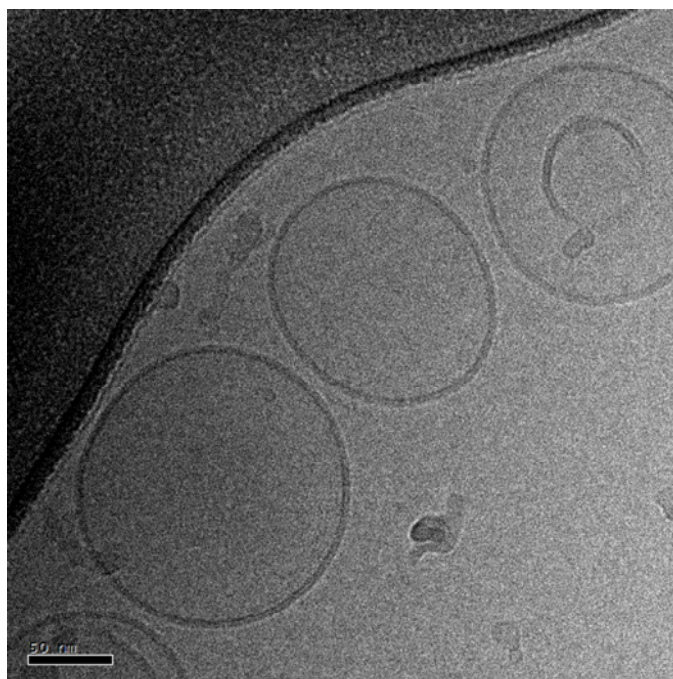


Figure 50 : Photographie de liposomes formés avec le lipide 1 (KLN25) seul par cryomicroscopie électronique.

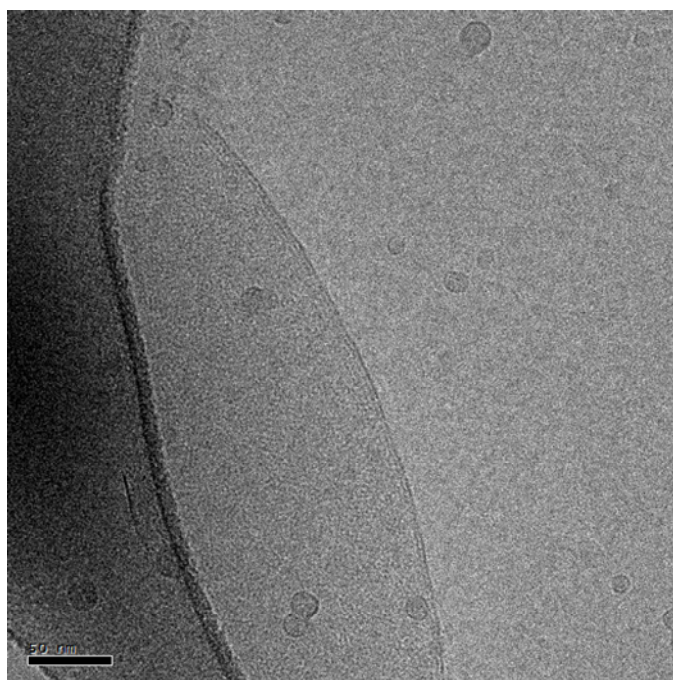


Figure 51 : Photographie de liposomes formés avec le lipide 2 (mm27) seul par cryomicroscopie électronique.

Observation des polyplexes

Les polyplexes ARNm / polylysine histidylée PEGylée (PEG-HpK, Fig. 52) forment des objets sphériques denses de 80 nm. L'organisation présente une certaine régularité qui n'est cependant pas de type concentrique dans toutes les dimensions, hexagonale ou inversée hexagonale, organisations observées dans les complexes ADN / liposomes cationiques (Koltover, 1998 ; Schmutz, 1999 ; Ewert et coll., 2006 ; Thierry, 2009). Alors que la microscopie électronique classique ne permettait de mettre en évidence que des sphères denses aux électrons dans le cas des polyplexes utilisés par Mockey et coll. avec le même ARNm et le même polymère (Fig 53), la cryomicroscopie permet d'obtenir des renseignements sur l'organisation des molécules entre elles. Outre le fait qu'il existe une organisation entre la polylysine histidylée PEGylée et l'ARNm il est difficile à ce stade d'en dire plus. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de résultats de cryoTEM de complexes ARNm / polymère alors que des complexes ADN/polymère ont été décrits (McLendon, 2010 ; Stanic, 2008).

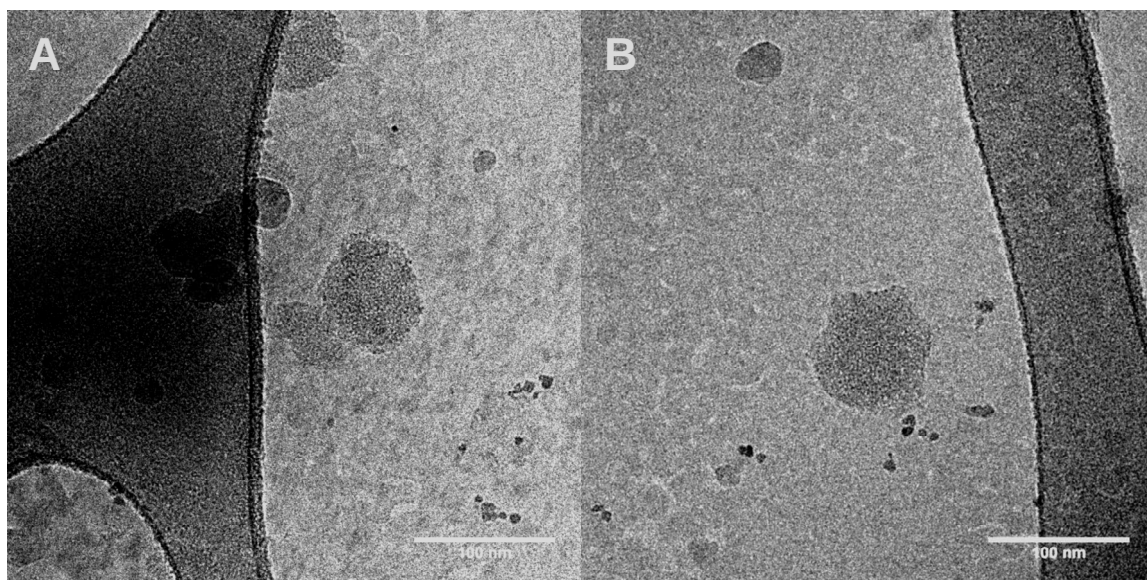


Figure 52 : Photographies de polyplexes ARNm MART1 / polylysine histidylée PEGylée par cryomicroscopie électronique. A,B : photographies de polyplexes grossissement x 50 000

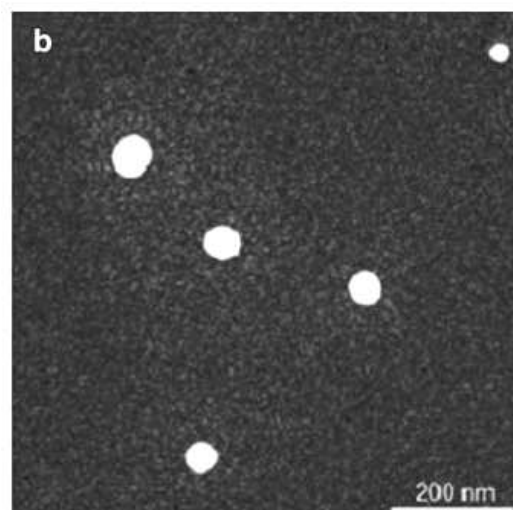


Figure 53 : Photographie de polyplexes ARNm MART1 / polylysine histidylé PEGylée par microscopie électronique. (Mockey et coll., 2007).

Observation des lipopolyplexes

Dans le cas des lipopolyplexes (Fig. 54 et 55), on observe plus généralement des structures dans lesquelles des vésicules (partie claire) sont entourées d'une couche plus contrastée en périphérie (flèches blanches). Des structures ressemblant aux polyplexes (flèches noires) sont également observées. Le premier type de structure pourrait correspondre à des polyplexes présents à la surface des liposomes. Ces structures sont comparables à celles du groupe de Huang Leaf avec des LPD constitués d'ADN/protamine/liposomes (Chesnoy et Huang, 2000).

Ces résultats ne sont pas en faveur d'une encapsulation des polyplexes dans les liposomes. Comme le montrent les images de champ large (Fig. 54B, 55C et D), les LPR100 et Man₁₁-LPR100 ne sont pas agrégés et ont des tailles de 80 nm, plus petites que celles mesurées par granulométrie laser.

Dans la figure 55B, nous pouvons distinguer des structures (flèche en pointillés) dans lesquelles le polyplexe est en d'interaction avec un liposome. Le polyplexe pourrait par la suite épouser la surface du liposome et donner une structure similaire à celle observée en-dessous (flèche blanche). Sous cette forme le liposome et le polymère pourrait interagir avec les membranes cellulaires et conduire à une meilleure transfection que les polyplexes ou les lipoplexes pris séparément. Si le polymère recouvrait totalement la surface des liposomes, ceux-ci ne pourraient interagir avec les membranes cellulaires qu'après dissociation d'avec les polyplexes, c'est-à-dire après internalisation.

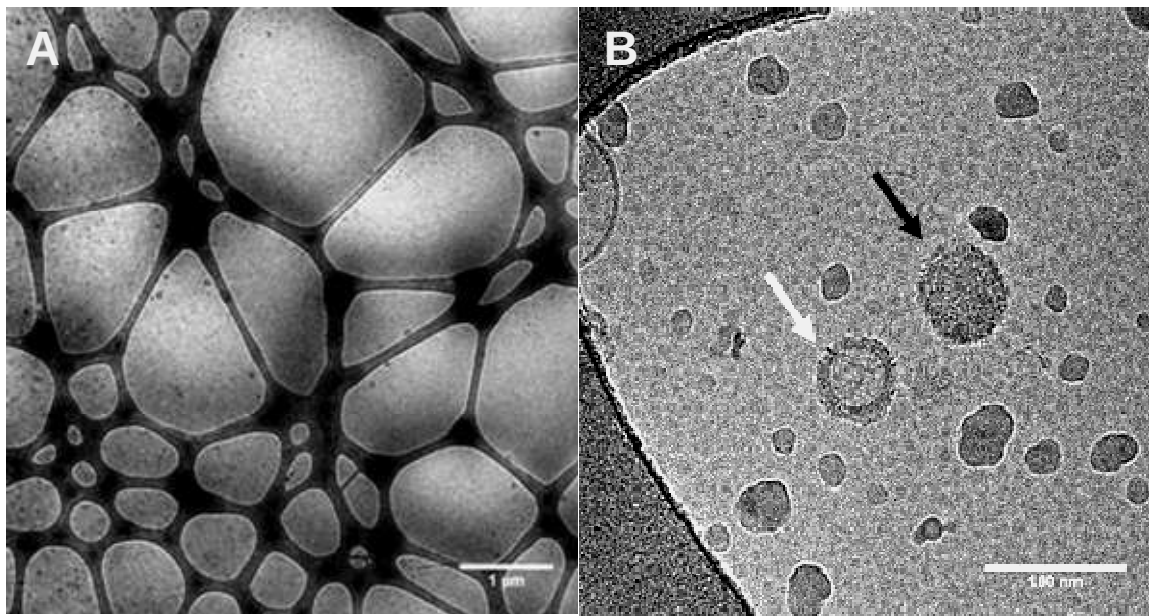


Figure 54 : Photographies de lipopolyplexes LPR100 par cryomicroscopie électronique. A : photographie de LPR100 grossissement x 1000; B : photographie de LPR100 grossissement x 50 000 . Flèche blanche : liposomes avec polyplexes en surface ; flèche noire : polyplexes entourés d'une structure lamellaire.

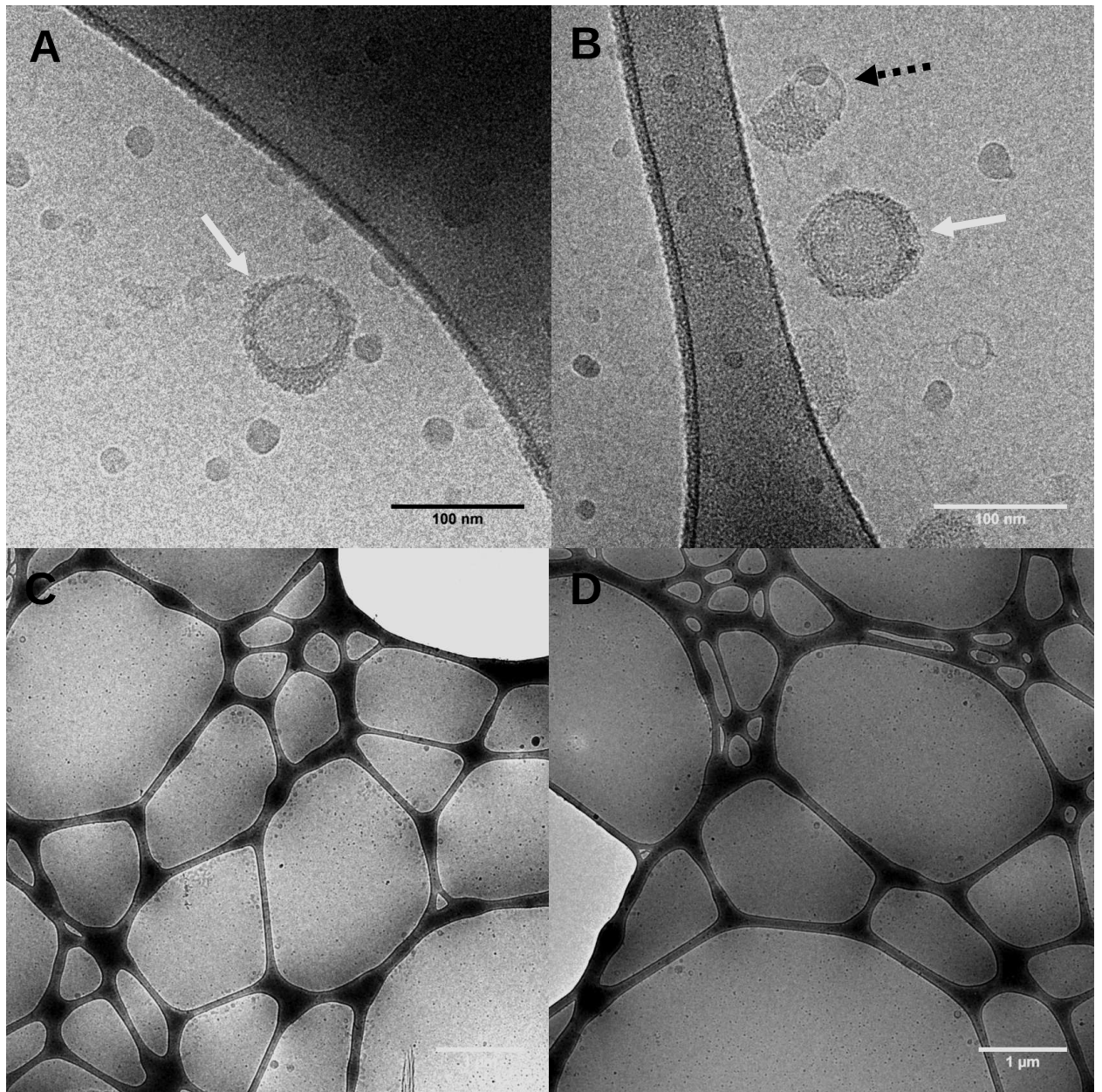


Figure 55 : Photographies de lipopolyplexes Man_{11} -LPR100 par cryomicroscopie électronique. A,B : photographie de Man_{11} -LPR100 grossissement x 50 000 ; C,D : photographie de Man_{11} -LPR100 grossissement x 1000. Flèches blanches : liposomes avec polyplexes en surface ; flèche noire pointillée : polyplexes interagissant avec une structure lamellaire.

Conclusion

Les liposomes et liposomes mannosylés forment des bicouches et des structures lamellaires.

Le LPR100 et Man₁₁-LPR100 forment des nanoparticules de tailles inférieures à 100 nm, taille compatible avec leur utilisation *in vivo*. Ces complexes ternaires sont formés par interaction entre des polyplexes et des liposomes. L'organisation différente des polyplexes et des lipopolyplexes pourrait expliquer la plus grande efficacité de transfection des LPD et LPR par rapport aux lipoplexes et polyplexes. Le rôle des groupements imidazoles et histidyls dans cette organisation reste à préciser. L'élucidation précise du type de structure pourrait être réalisée grâce à la TEM en trois dimensions. Cette technique permet, après analyse de l'objet sous des angles de +70° à -70°, sa reconstitution en trois dimensions (Janssen et coll., 2002). Des études de diffraction aux petits angles permettraient une analyse plus fine des structures et notamment des différences d'organisation entre liposomes seuls et lipopolyplexes.

Conclusion et perspectives

Pour plus de clarté, les conclusions et les perspectives qui découlent de l'ensemble de ce travail sont discutées en trois parties.

ARNm

Mes travaux confirment que le mélange ARNm MART1 plus MART1 fusionné à la séquence d'adressage LAMP1 est plus efficace pour induire une réponse immune anti-B16F10 que ces ARNm utilisés séparément. De plus, mes travaux montrent qu'il y a bien un effet synergique spécifique à l'ARNm MART1-LAMP1 puisque le mélange ARNm MART1 et ARNm Luc ne conduit pas à cette synergie.

Deux types d'ARNm ont été comparés : des ARNm transcrits *in vitro* avec une coiffe ARCA et des ARNm avec une coiffe IRES produits par la société Mitoprod. Ces derniers pouvant être produits en grande quantité en conditions GMP. Les expériences réalisées montrent que ces deux types d'ARNm permettent le retard de croissance de tumeurs primaires et de métastases expérimentales murines B16F10. Le mélange ARNm IRES-MART1 et ARCA-MART1_LAMP1 a permis des vaccinations efficaces avec un effet synergique. Il nous reste à tester le mélange composé de deux ARNm avec des coiffes IRES (IRES-MART1 et IRES-MART1_LAMP1). Il devrait également être efficace. Ceci est un résultat important en vue de la production en grande quantité en conditions GMP.

Pour améliorer les formulations vaccinales, on pourrait administrer l'ARNm sous forme libre en plus de l'ARNm complexé. Ce protocole déjà été mis en œuvre par la société CUREVAC GMBH a permis de montrer une meilleure efficacité de transfection *in vitro* et de meilleures capacités de vaccination anti-tumorale *in vivo* (GMBH, 2010). De plus on pourrait également utiliser des séquences polyA. Il a été montré au laboratoire que l'ajout de séquences polyA sous forme complexée permet d'augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* (Mockey, 2006).

Enfin, la stabilité des ARNm ainsi que l'optimisation de leur relargage des complexes et leur délivrance aux sites de transcription pourraient être optimisées.

Lipopolyplexes

Des nouveaux LPD, les LPD100 et plus particulièrement les LPD100 mannosylés spécifiques des DC ont été développés dans le cadre de ma thèse. Nous nous sommes intéressés à leurs paramètres physico-chimiques (taille, potentiel ζ , morphologie), leur toxicité *in vitro*, leur conservation par déshydratation et leur capacité de transfection *in vitro* et *in vivo*.

- Nous avons mis en évidence que les LPD et LPR 100 et 100 mannosylés qu'ils soient formés avec de l'ADN ou de l'ARNm ont des tailles proches de 100nm et des potentiels ζ positifs. Les profils de microscopie électronique montrent des organisations majoritairement lamellaires des liposomes et lipopolyplexes. La structure de ces complexes n'est pas encore déterminée avec certitude. Notamment il est difficile de savoir si les polyplexes sont soit encapsulés dans les liposomes, soit présents à leur surface ou si les préparations de LPD contiennent un mélange hétérogène de ces différentes organisations supramoléculaires comme le laissent penser nos résultats. D'autres études seront donc nécessaires pour affiner ce résultat.

- Nous avons montré que la toxicité des LPD diminue sensiblement lorsque ceux-ci sont formés avec des liposomes dialysés. Cependant l'effet de la dialyse n'est pas clairement élucidé. Les groupes histidines et imidazoles des lipides pourraient intervenir dans la cytotoxicité des liposomes avant dialyse.

- Nous avons montré qu'il est possible de déshydrater des polyplexes et des LPD100 contenant de l'ADN plasmidique tout en gardant de bonnes capacités de transfection après conservation à -20°C. Ce résultat est tout à fait intéressant car il permettrait de faciliter l'utilisation des LPD ainsi que leur transport. Des résultats identiques avec des LPR contenant de l'ARNm ouvriraient des perspectives pour l'utilisation de ces formulations vaccinales.

Les LPR100 mannosylés permettent le ciblage et une meilleure transfection de cellules dendritiques spléniques après administration intraveineuse. La biodistribution de ces complexes révèle une absence de piégeage pulmonaire des formulations après injection i.v. indiquant une absence d'agrégation.

La transfection de cellules dendritiques avec des complexes ARNm et ADN a été comparée par mesure de l'expression du transgène. Pour compléter cette comparaison entre les deux types d'acides nucléiques, il faudrait comparer l'internalisation de lipopolyplexes ADN et ARNm par les cellules DC 2.4 mais également faire des expériences de Northern blot avec une sonde dirigée contre l'EGFP à partir de lysats de cellules transfectées avec LPD ou LPR.

Pour améliorer ces nanoparticules, nous pourrions augmenter le nombre de mannose à la surface des liposomes en utilisant des glycolipides multi-mannosylés. L'utilisation de tels clusters de mannose pourrait permettre d'augmenter l'avidité des LPD mannosylés pour les récepteurs de la famille du récepteur mannose et de diminuer les quantités de vecteurs utilisés. De plus, des ligands de CD11c pourraient être employés (Faham et Altin, 2010).

Le glycolipide mannosylé possède des chaînes hydrophobes asymétriques qui sont différentes de celles des lipides 1 et 2. L'utilisation d'un glycolipide phosphoramidate pourrait permettre une meilleure incorporation dans les liposomes.

Pour réduire le nombre de constituants dans la préparation des liposomes (lipide 1, lipide 2, lipide mannosylé), il pourrait être envisagé de synthétiser un lipide histidyl mannosylé en remplacement du lipide 1 ou 2. Ce type de lipide a été employé par Nakamura et coll. pour former des lipoplexes (Nakamura, 2009). Le couplage des groupements mannosylés à ces lipides implique l'utilisation de bras espaceurs. La longueur de ce bras est un paramètre à optimiser pour augmenter la reconnaissance des liposomes et LPD par les récepteurs de la famille du récepteur mannose. Ainsi, des bras de différentes longueurs devront être testés.

D'autres types de ciblage pourraient être envisagés avec les LPD100, notamment le ciblage de XCR1 (chemokine ligand 1), ce récepteur à la chemokine XCL1 étant exprimé de façon spécifique par les DC humaines les plus efficaces dans la présentation croisée des antigènes (Bachem et coll., 2010).

De plus, les LPD100 et Man₁₁-LPD100 pourraient être employés afin d'administrer des siRNA dirigés contre des marqueurs de chimiorésistance tumorale.

Une importante accumulation hépatique est observée après injection systémique et l'utilisation de LPD lactosylés préparés par incorporation d'un glycolipide lactosylé aux préparations liposomales permettrait de favoriser la transfection des hépatocytes.

Vaccination anti mélanome

Les LPR100 mannosylés contenant des ARNm codant un antigène de mélanome permettent un retard de croissance de tumeurs primaires B16F10 et une augmentation de la survie des souris. Le ciblage des DC avec des LPR mannosylés a montré un plus grand nombre de DC spléniques transfecté et qu'une meilleure efficacité de vaccination anti-mélanome est obtenue par rapport aux LPR non mannosylés. Pour poursuivre ce travail, des tests d'activité cytotoxique et de sécrétion d'interferon γ à partir de splénocytes prélevés sur des souris vaccinées avec des vecteurs mannosylés ou non seront nécessaires.

L'efficacité de la vaccination pourrait être augmentée par induction d'une réponse immune innée. Ceci en utilisant d'autres stimulateurs des récepteurs TLR que les CpG qui n'ont pas montré de bénéfice dans le travail présenté. Ceux-ci pourraient être administrés soit séparément soit incorporés aux lipopolyplexes contenant l'ARNm MART1. La deuxième option semble plus intéressante. En effet, van Broekhoven et coll. ont montré une meilleure stimulation des lymphocytes spléniques et un moindre développement de métastases pulmonaires après injection intraveineuse de liposomes contenant de l'ovalbumine et de l'interferon γ ou du lipopolysaccharide par rapport aux liposomes ovalbumine seuls dans un modèle de cancer exprimant l'ovalbumine (van Broekhoven et coll., 2004).

Les immunisations des souris ont été faites avec la séquence humaine de MART1 et il conviendrait de comparer des vaccinations réalisées avec les séquences murines et humaines.

L'inhibition du développement tumoral n'est cependant pas totale. Les principaux mécanismes de résistance des cellules tumorales sont résumés dans le tableau 16. Parmi ceux-ci les cellules tumorales pourraient avoir développé des mécanismes de résistance contre la réponse immunitaire induite par cette vaccination. Cela pourrait être dû à un échappement immunitaire des cellules tumorales par diminution de l'expression de MART1. L'efficacité du vaccin pourrait alors être augmentée en utilisant les ARNm d'autres antigènes de mélanome comme gp 100 et tyrosinase en plus de MART1. L'efficacité des formulations vaccinales pourrait également être augmentée en augmentant le nombre d'injections comme démontré par Un et coll. (Un et coll., 2010). De plus, l'inhibition du développement tumoral pourrait être plus importante en vaccinant les souris avec les ARNm de plusieurs antigènes de mélanome.

Tableau 16: Principaux mécanismes de résistance des cellules tumorales.

Evasion au système immunitaire	Système CMH	Antigène		Stimulation
	défauts / pertes CMH	Perte de l'antigène Dérive antigénique Pas assez de lymphocytes spécifiques		↓TCR ↓CD80/86 Immunosuppresseurs Perte de l'aide lymphocytaire
Résistance à la lyse	Fas/Fas-L, inhibiteurs des caspases, mutations de régulateurs de l'apoptose			
Suppression immunitaire	Inflammation chronique	Inhibition des fonctions présentatrices des DC	Inhibition de maturation des DC	Induction/recrutement de Treg
		VEGF, TGF-β, IL-10, GM-CSF, ROS, gangliosides	TGF-β, IL-6, VEGF, IL-10	Induction de MSC Induction de TAM
Accès aux cellules cancéreuses		Les lymphocytes ne traversent pas le stroma autour des tumeurs ce qui empêche leur éradication		

CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), DC (cellules dendritiques), GM-CSF (facteur stimulant la formation de colonies de granulocyte et macrophages), IL (interleukine), MSC (cellules suppressives myéloïdes), TAM (macrophages associés aux tumeurs), TGF- β (facteur de croissance transformant), Treg (lymphocytes T régulateurs), VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial). A partir d'informations publiées dans (Peguet-Navarro et coll., 2003 ; Zou, 2005; Cochran et coll., 2006 ; Lowe et coll., 2007 ; Chouaib et coll., 2009).

Il est maintenant bien connu que les tumeurs sont des environnements immunosuppresseurs enrichis en cellules régulatrices telles que les cellules myéloïdes suppressives et les Tregs. Les cellules T régulatrices (Treg) jouent un rôle fondamental au cours des réponses immunes vis-à-vis des tumeurs (Baecher-Allan et Anderson, 2006 ; Wang, 2008). Les cellules Treg sont des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ qui se caractérisent par l'expression du marqueur CD25 et du facteur FoxP3 (Fontenot et coll., 2003). Une fois activées *via* leur récepteur TCR, elles exercent un effet suppresseur vis-à-vis de la réponse anti-tumorale. Chez la souris et l'Homme, les tumeurs sont infiltrées par des Treg et leur quantité est inversement proportionnelle à la survie : le nombre de Treg augmente avec la croissance tumorale (Gao et coll., 2007). On connaît mal le nombre et l'influence des Treg lorsque les tumeurs sont petites et non visibles ou en émergence après un traitement tel qu'une vaccination.

Nous avons là une possibilité intéressante d'étudier l'infiltration de la tumeur B16F10 par les Treg après une vaccination ayant induit des LT $CD8^+$ spécifiques. Afin de compléter ces résultats, l'évaluation de la présence de Treg dans les tumeurs B16F10 semble essentielle à l'amélioration du vaccin. La quantité de Treg serait comparée entre souris vaccinées ou non. Une analyse de la balance des cellules T régulatrices au sein des tumeurs échappant à la vaccination pourrait être intéressante. Afin de compléter les résultats de vaccination anti mélanome, l'évaluation de la présence de Tregs dans les tumeurs B16F10 semble essentielle à l'amélioration du vaccin. La présence des Treg pourrait être évaluée par histoimmunomarquage sur des coupes de tumeurs ou par cytométrie en flux après dilacération des tumeurs. Pour augmenter l'effet vaccinal, des drogues permettant la réduction du nombre de Treg pourraient être administrées en complément des formulations vaccinales.

L'évaluation de l'effet thérapeutique des LPR avec ARNm MART1 reste à effectuer. Cependant, la régression tumorale en utilisant une seule stratégie telle que la vaccination ne sera probablement pas suffisante pour une éradication totale. Il sera alors nécessaire d'utiliser des combinaisons de différents types de traitements en couplant l'immunothérapie à la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

Matériel et méthodes

1. Poly-L-Lysine Histidylée PEGylée

La poly-L-Lysine Histidylée PEGylée a été synthétisée comme décrit dans (Midoux et Monsigny, 1999 ; Mockey et coll., 2007). Le taux de substitution en histidine et PEG mesuré par intégration des signaux de ^1H RMN donne 90 résidus histidyles par molécules de polymère et 0,8 molécules de PEG par molécule de polymère. J'ai utilisé le même lot pour toutes les expériences présentées.

2. Préparation des liposomes 23 et 100

a. liposomes 23

Pour préparer les liposomes 23, le lipide HDHE et le cholestérol dans l'éthanol sont mélangés avec un rapport molaire 1 : 2.

b. liposomes 100

Pour préparer les liposomes 100, les lipides 1 et 2 dans l'éthanol sont mélangés avec un rapport molaire 1 :1. Les liposomes fluorescents sont préparés en incorporant 0.5% de NBD-PE (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-snglycerphosphoethanolamine, triethylammonium salt ; Avanti Polar lipids, Alabaster, Etats-Unis d'Amérique).

c. glycoliposomes

Les glycoliposomes sont préparés en ajoutant un certain pourcentage de glycolipides (Man-lip ou Lac-lip) au mélange permettant la préparation des liposomes 100.

La solution lipidique est ensuite évaporée à sec. Le film est repris avec 1mL d'HEPES 10mM (Sigma Aldrich) pH 7,4. La solution est agitées 30 s puis le hydratée une nuit à 4°C. Les liposomes sont alors soumis à agitation puis sonicqués dans un bain à ultrasons sous 37 Khz (Bioblock Scientific, Illkirch, France) pendant 15 min à 20°C.

Les liposomes (500 μL) ainsi préparés sont dialysés à 4°C (Dialysis Tubing Cellulose membrane size : 33mm x 21 mmm, Sigma Aldrich, MWCO de 12,4 kDa) contre 500 mL d'HEPES 10mM pH 7,4 pendant 6h puis toute une nuit après changement de tampon. Après dialyse, la concentration en lipides est déterminée en utilisant le dosage de Nile Red en plaques de 96 puits. A 10 μL de liposomes dialysés ou non, 70 μL de tampon HEPES 10 mM pH 7,4 et 20 μL de Nile Red (1 μM dans le méthanol) sont ajoutés. Le mélange est incubé 5 min à température ambiante sur le plateau agitateur. La fluorescence des solutions est mesurée avec le lecteur de plaque Victor II (PerkinElmer, Massachusetts, Etats-Unis, excitation : 531/25nm et émission : 620/10nm).

d. préparation des boudins de dialyse

Les boudins sont d'abord rincés à l'eau bi distillée pour les décoller. Ensuite ils sont mis à bouillir 20 min dans de l'eau contenant 5% de bicarbonate de sodium et 1mM EDTA, puis mis à bouillir 20 min dans de l'eau contenant 1mM EDTA. Après rinçage, ils sont mis à bouillir 20 min

dans l'eau et ils sont rincés par l'extérieur et l'intérieur avant stockage à 4°C dans un mélange éthanol/eau (1/1 vol/vol).

3. Plasmides

Les cartes des plasmides utilisés sont mises en annexe. Après transfection et culture des bactéries *E. Coli* DH5 α supercompétentes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), les ADN plasmidiques superenroulés ont été isolés des bactéries par lyse alcaline et purifiés avec le kit QIAGEN Mega Kit Endotoxine free (Qiagen, Courtaboeuf, France).

a. **pTG11033**

Le plasmide pTG11033 (pCMV-Luc; 9514 bp; généreusement donné par Trangène S.A., Strasbourg, France) code le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* (Firefly luciferase, FLuc) sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus (CMV).

b. **pGEM4Z-MART1-A64, pGEM4Z-MART1-LAMP1-A64 et pGEM4Z-EGFP-A64**

Les plasmides pGEM4Z-MART1-A64 et pGEM4Z-MART1-LAMP1-A64 codent pour la protéine MART1 humaine sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7. Ils ont été donnés au laboratoire par les docteurs A. Bonehill et K. Thielemans (Medical School of the Vrije universiteit Brussels, Brussels, Belgique). Le plasmide pGEM4Z-EGFP-A64 code la protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sous contrôle du promoteur T7, il nous a été donné par Dr. P. Ponsaerts (University of Antwerp, antwerpen, Belgium) (Heiser et coll., 2000).

c. **pEMCLuc β gA_n**

Ce plasmide code la luciférase sous contrôle du promoteur T7, sa construction est décrite dans (Deng et Wolff, 1994).

d. **pRab5EGFP et pRab7EGFP**

Ces plasmides codent pour des protéines rab5 et rab7, spécifiques aux endosomes précoces (rab 5) ou tardifs (rab 7), fusionnées à la partie N terminale de l'EGFP sous le contrôle d'un promoteur cytomegalovirus.

e. **pgagEGFP**

Ce plasmide code la protéine EGFP sous le contrôle du promoteur CMV.

f. **pCav1-GFP**

Ce plasmide code une protéine de fusion GFP-cavéoline 1. Il a été acheté chez Addgene (Cambridge, Etats-Unis d'Amérique).

g. marquage fluorescent des plasmides

Le plasmide pTG11033 est rendu fluorescent après couplage avec le fluorophore cyanine 3, (λ_{ex} 550 nm λ_{em} 570 nm) en utilisant le kit Label IT Cy 3 (Mirus, Madison, WI, USA) dans un rapport réactif/ADNp égal à 1/2 pendant 2h à 37°C. Ensuite, l'ADN a été précipité à l'éthanol puis repris dans de l'eau exempte d'endonucléases.

4. ARNm et transcription *in vitro*

Les plasmides pGEM4Z-EGFP-A64, pGEM4Z-MART1-A64 et pGEM4Z-MART1-LAMP1-A64 sont linéarisés par *SpeI*. Le plasmide pEMCLuc β gA_n est linéarisé par *BamHI*. Ils sont utilisés comme amorces pour une transcription *in vitro* à l'aide du kit T7 mMessage mMachine (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) permettant d'obtenir des ARNm avec une coiffe ARCA et une queue poly(A) de 100 adénosines (A100). La concentration en ARNm est déterminée par l'absorbance à 260 nm. Les ARNm transcrits *in vitro* ont des rapports 260 nm / 280 nm ≥ 2 et leur intégrité est vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Ils sont aliquotés et stockés à -80°C.

5. Cellules

La lignée cellulaire B16F10 (ATCC CRL-6475) est dérivée d'un mélanome spontané chez une souris C57BL/6 adaptée à la croissance *in-vitro* (Poste et coll., 1982). Les cellules B16F10 GFP-Luc nous ont été données par le Dr A. Jozkowicz (Laboratory of Evolutionary Immunobiology, Jagiellonian University, Cracovie, Pologne) et ont été obtenues par transduction de cellules B16F10 avec des rétrovirus produits dans des cellules PT67 avec le plasmide pBMN-LUC-I-GFP. Ce plasmide est bicistronique et exprime les protéines GFP et luciférase, la luciférase étant précédée d'une séquence IRES. Les cellules infectées ont ensuite été enrichies par deux étapes de tri cellulaire (trieur MoFlo, Dako Cytomation, Danemark). L'anticorps anti-MART1 utilisé pour vérifier l'expression de la protéine par ce clone a été acheté chez Tebu bio (anticorps monoclonal lapin anti-homme, IgG).

La lignée cellulaire HEK 293T7 est une lignée de cellules épithéliales embryonnaires de rein humaine qui exprime de façon stable l'ARN polymérase T7 (Brisson et coll., 1999).

La lignée cellulaire HeLa est une lignée de cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome (ATCC, CCL-2).

Les cellules DC 2.4 sont des cellules dendritiques murines qui nous ont été données par le Dr P. Jeannin (UMR 892 Nantes-Angers, France). Les DC 2.4 sont des clones de cellules dendritiques obtenus par l'équipe du Pr. Rock (Shen et Reznikoff 1997). Elles expriment de forts taux de CMH I

et II, de B7-1 et B7-2, de CD32 (FcγRII) et CD54 qui sont des marqueurs de DC. Ces cellules expriment également DEC-205 et 33D1, marqueurs plus spécifiques des DC murines.

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans des flasques plastiques de 75 cm² dans du milieu avec 10% de SVF (Biowest, Nuaille, France), 100 U/mL de penicilline et 100µg/mL de streptomycine (Fischer Bioblock, Illkirch, France). La composition des milieux est détaillée dans le tableau 17.

Tableau 17 : Composition des milieux de culture de cellules.

B16F10, B16F10GFP_Luc	DMEM, 10% SVF décomplémenté, 100 U/mL penicilline, 100 µg/mL streptomycine
DC 2.4	RPMI 1640 10% SVF décomplémenté, 100 U/mL penicilline, 100 µg/mL streptomycine
293 T7	DMEM 10% SVF décomplémenté, 100 U/mL penicilline, 100 µg/mL streptomycine, 400µg/mL de G418
HeLa	MEM 10% SVF décomplémenté, 100 U/mL penicilline, 100 µg/mL streptomycine

Un test pour vérifier l'absence de mycoplasmes est réalisé périodiquement, soit par marquage au bis-benzimide (Chen, 1977) soit à l'aide du kit MycoAlert®Assay (Lonza, Levallois-Perret, France). Ce test a été réalisé systématiquement lors de la décongélation des cellules avant leur mise en culture puis tous les deux mois lors de leur entretien sans indiquer la présence de mycoplasmes à un niveau détectable.

6. Formation des lipopolyplexes

Le polymère PEG-HpK (75 µg dans 25 µl de tampon HEPES 10mM pH 7,4) est ajouté à l'ADN plasmidique (25µg dans 125 µl de tampon HEPES 10mM pH 7,4). La solution est mélangée au vortex pendant 4s puis laissée au repos 30 min à 20°C. Ensuite, les liposomes sont ajoutés, mélangés aux polyplexes par pipetage et mis en contact 15 min à température ambiante (Fig. 56). Les rapports de charge polymère / ADN et polymère / ARNm sont de 2,8 et les rapports lipide cationique / ADN et lipide cationique / ARNm de 0,9.

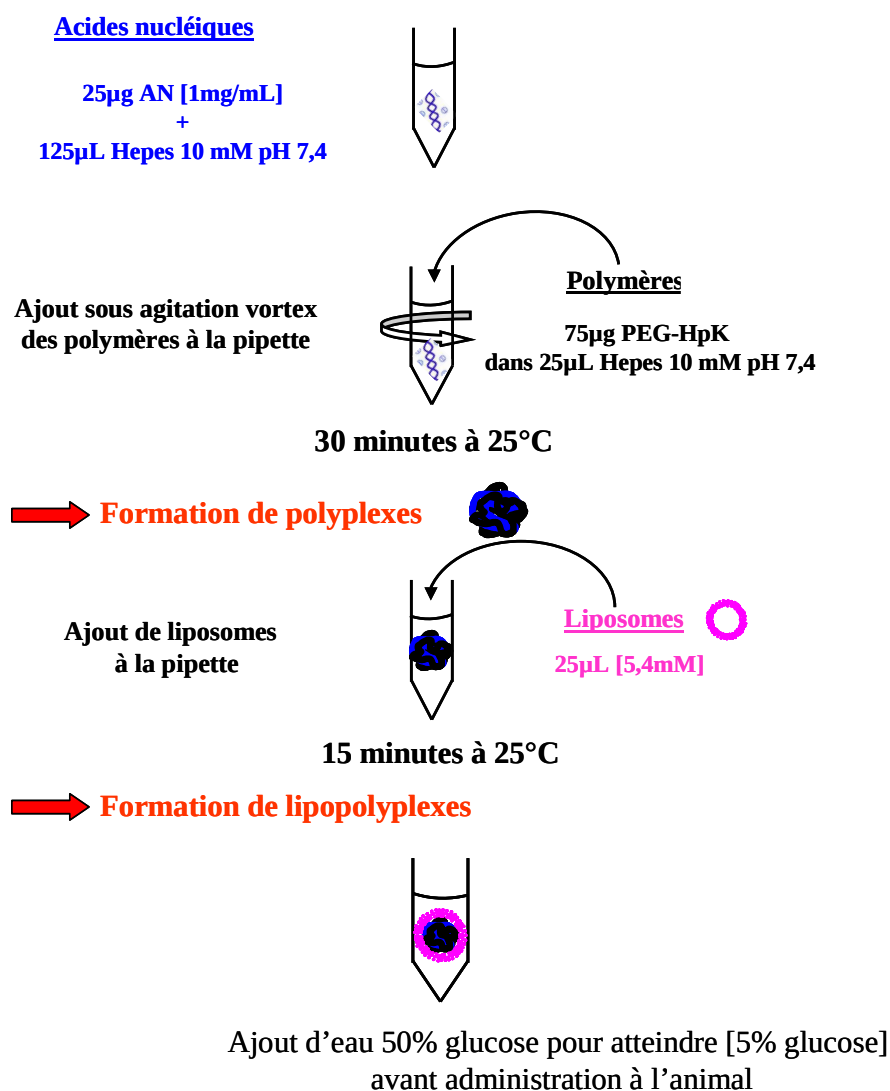


Figure 56 : formation des lipopolyplexes utilisés dans le cadre de ma thèse.

7. Dosage de sucre

La quantité de glycolipides incorporée dans les liposomes a été déterminée en utilisant un dosage colorimétrique au résorcinol / acide sulfurique selon (Monsigny, 1988). Pour cette mesure, des gammes étalons de lactose et de mannose ont été réalisées dans l'eau.

8. Taille et potentiel zêta

a. taille

La taille des liposomes (5,4 mM) et des lipopolyplexes (2,5 µg ADN) est déterminée par diffusion de la lumière laser avec l'appareil ZetaSizer 3000. Cette technique donne la taille moyenne des particules à partir de leur mouvement brownien ; la vitesse des particules est évaluée en fonction du temps de l'intensité diffusée par la particule en mouvement dans un réseau

d'interférences. Avant chaque série de mesure, la fiabilité des résultats est contrôlée en mesurant des billes de taille calibrée (50nm, 204 nm et 500 nm Nanosphere™ 126 Size Standards beads, Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA). Deux séries de dix mesures ont été réalisées par échantillon. L'index de polydispersité (PI) a également été mesuré ; il permet d'évaluer la distribution des particules. Les particules monodisperses ont des PI entre 0,1 et 0,2 et les hétérogènes entre 0,2 et 0,5. Un échantillon avec un PI de 1 étant polydisperse.

b. potentiel ζ

Le potentiel ζ des liposomes (5,4 mM) et des lipopolyplexes (5 μ g ADN) est mesuré par mobilité électrophorétique avec le ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France). La charge de surface d'une particule est la résultante de sa charge nette et du milieu qui l'entoure, notamment le pH. Les charges induisent la distribution des ions dans la solution, ce qui augmente la concentration en contre-ions près de sa surface. Il existe une couche proche avec les contre-ions (couche de Stern) et un plan externe (couche de Gouy) où la distribution ionique est plus diffuse. C'est à ce niveau que le potentiel zêta est mesuré, il est proportionnel à la densité de charge de surface (coulomb/m² ou mV). Avant chaque série de mesure, la fiabilité des résultats est contrôlée en mesurant le potentiel ζ des billes de potentiel calibré de -50 mV (DTS5050 Electrophoresis Standard beads ; Malvern). La valeur obtenue est une moyenne de 10 mesures.

9. Activité luciférase

L'activité luciférase est mesurée avec le luminomètre (Lumat LB9507, Berthold, Wildbach, Allemagne) en suivant la méthode de De Wet et coll. (de Wet et coll., 1987). L'activité luciférase obtenue (RLU/mg protéine) est exprimée par mg de protéines mesurées en utilisant le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith et coll., 1985).

10. Evaluation de la toxicité

Pour évaluer la cytotoxicité des formulations, nous avons utilisé le test de viabilité au MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Mosmann, 1983). Une solution de MTT (5 mg/mL dans du PBS) a été ajoutée à la culture cellulaire 48h post-transfection (100 μ L par mL de milieu). Après 4h d'incubation, le MTT converti en un colorant insoluble (formazane) par les cellules vivantes est dissous dans de l'isopropanol acidifié 0,5% SDS et l'absorbance à 560/10nm est mesurée avec le lecteur de plaque Victor. La cytotoxicité des composés est exprimée en prenant pour base 100% les cellules non transfectées cultivées dans les mêmes conditions.

11. Evaluation de l'apoptose

L'apoptose est évaluée 24h après transfection de cellules soit avec 0,027 mM de liposomes seuls dialysés ou non soit avec des LPD contenant 2,5µg d'ADN formés avec des liposomes dialysés ou non en utilisant le kit Annexin V FITC (Apoptosis Detection Kit, Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Succintement, 24h après transfection, les cellules sont rincées avec du PBS puis décollées en absence de trypsine et resuspendues dans du Binding Buffer 1X avant incubation avec annexin V FITC et iodure de propidium. La fluorescence est enregistrée à l'aide d'un cytomètre en flux (BDLSR, Becton Dickinson avec λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530/30 nm pour la FITC et λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 682/13 nm pour l'iodure de propidium). Les valeurs de fluorescence correspondent à la fluorescence moyenne de 10 000 événements.

12. Déshydratation

a. lyophilisateur

Les complexes (5µg d'ADN plasmidique) ont été dilués dans un volume final de 500µL dans des tubes eppendorfs de 2mL. Après complexation, les bouchons de ces tubes sont troués avec une aiguille 25 G. Ils sont ensuite placés à -70°C dans de l'isopropanol (>99,5% ; Fischer Scientific) dans un container Mr Frosty (Dominique Dutscher, Brumath, France) pour une congélation progressive, pendant 12h dans un congélateur à -70°C. Ils sont ensuite lyophilisés à l'aide du lyophilisateur Alpha 1-2 LD Plus lyophilizer (Christ, Osterode, Allemagne) à -55°C et 0,05 mbar pendant 14h.

b. speedvac

Les complexes (5µg d'ADN plasmidique) sont dilués à 500µL après leur formation dans des tubes eppendorfs de 2mL. Dans le cas d'une congélation préalable ils sont congelés dans l'isopropanol. L'évaporation est faite avec un speedvac (Speedvac SC110A, Savant; Refrigerated Vapor Trap RVT 400, Savant) à 35°C, 10 mbar pendant 8h.

13. Dosage d'ADN

Après hydratation des complexes déshydratés, la quantité d'ADN dans les lipopolyplexes et polyplexes est déterminée par fluorescence en présence de 12µg/mL de bromure d'éthidium (BET, Promega) et d' 1,7 mg/mL de sulfate de dextran 500 000 Da (Sigma) dans des plaques de 96 puits. La fluorescence (λ_{ex} = 531/25 nm, λ_{em} = 620/10 nm) est mesurée après 30 min d'incubation sur le plateau agitateur avec le lecteur de plaque Victor.

14. Cytométrie en flux et endocytose des liposomes et LPD

Les cellules sontensemencées comme pour une transfection puis incubées à 4°C ou à 37°C pendant différents temps avec les liposomes fluorescents seuls ou sous forme de lipopolyplexes. Les cellules ont été décollées, lavées par du PBS et la fluorescence associée aux cellules est ensuite mesurée, à l'aide d'un cytomètre en flux (FACSort, Becton Dickinson; λ_{ex} = 488nm; λ_{em} = 530/30 nm). Pour mesurer l'internalisation des liposomes ou des LPD, après un premier passage au cytomètre en flux, les différents échantillons sont incubés 5 min à 4°C avec du bleu de trypan 0,4% (Sigma, France) à raison de 10µL de bleu de trypan pour 400µL de PBS avant un autre passage au cytomètre en flux. C'est le rapport fluorescence avec trypan / fluorescence sans trypan qui permet d'estimer l'internalisation.

15. Microscopie

Les photos de microscopie et les analyses d'internalisation par microscopie confocale ont été réalisées par David Gosset.

16. Vaccination

Pour les expériences de vaccination, , les souris ont reçu à J0 et J7 des LPR contenant 25µg d'acides nucléiques dans de l'eau 5% sucrose (220µL). Les formulations ont été administrées avec des seringues à insuline (Myjector U-100, Dominique Dutscher). Les cellules tumorales sont ensuite injectées à J14 avec des seringues à insuline par voie intradermique pour la formation de tumeurs primaires (10⁵ cellules B16F10 dans 100µL de PBS) ou par voie intraveineuse pour le développement de métastases expérimentales (3 10⁵ cellules B16F10-GFP_Luc dans 100µL de PBS). Le volume tumoral est mesuré au pied à coulisse deux fois par semaine. Pour la mesure des métastases, les poumons sont prélevés après autopsie à J25 puis broyés dans l'azote liquide avant d'être lysés pour mesurer l'activité luciférase dans 500µL de tampon CCLR (cell culture lysis reagent, Promega) par poumon pendant 3h à 4°C avec agitation au vortex toutes les heures. L'activité luciférase est mesurée au luminomètre (Lumat LB9507, Berthold) puis exprimée en RLU/mg protéines après dosage des protéines en utilisant le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith, 1985).

Les analyses de survie des animaux sont réalisées à l'aide des logiciels XLSTAT Life ou SigmaStat. Pour comparer la survie entre plusieurs groupes, le test de Student n'est pas approprié et des test de Holm-Sidak ou Kruskal-Wallis lui sont préférés.

17. Clonage

Pour le clonage, les cellules DC 2.4 ont étéensemencées en boîtes de Pétri de 12 cm de diamètre de façon à obtenir des cellules à 80% de confluence au moment de la transfection. Ces cellules ont été transfectées avec des complexes Man₁₁-LPD100 contenant 20µg d'ADN plasmidique linéarisé, soit pRab5-EGFP soit pRab7-EGFP. 48h après la transfection le G418, antibiotique de sélection a été ajouté à 400µg/mL. Les cellules ont été maintenues en culture sous sélection antibiotique jusqu'à formation de clones visibles à l'œil nu. En effet, le plasmide exprimant la protéine de fusion exprime également l'aminoglycoside phosphotransférase qui permet la résistance au G418 (Southern, 1982). Ces populations clonales ont ensuite été amplifiées par transfert dans des plaques de 24 puits avant analyse de l'expression de la protéine de fusion fluorescente (EGFP) par cytométrie en flux (FACSort, Becton Dickinson; λ_{ex} = 488nm; λ_{em} = 530/30 nm). Après observation de ces cellules par microscopie, les clones intéressants ont ensuite été enrichis par tri cellulaire par Monsieur David Gosset (FACSVantage, λ_{ex} = 488nm; λ_{em} = 530/30 nm). Ces clones ont été cultivés dans du milieu DC 2.4 contenant 400µg / mL de G418.

18. Précipitation des halogénures

5µL de liposomes (5,4 mM) sont déposés dans une plaque de 96 puits, 25µL d'eau sont ajoutés puis 10µL d'acide nitrique (70%, Fisher) et 10µL de nitrate d'argent (10 mg/mL dans l'eau, Sigma). L'acide nitrique permet d'empêcher la formation de diiode. La plaque est agitée pendant 1h sur le plateau agitant avant lecture de la densité optique à 560 nm (1420 Multilabel Counter Victor, Wallac). Les concentrations en iodures et chlorures sont déterminées à l'aide de gammes d'iodure de potassium et de chlorure de potassium (Sigma).

19. Enrichissement en cellules dendritiques spléniques

La rate est d'abord prélevée puis coupée en morceaux dans du PBS à l'aide d'un scalpel dans une boîte de Pétri. Cette solution est ensuite prélevée à la seringue (aiguille 25 G) puis filtrée au travers d'une membrane de nylon autoclavée déposée sur un entonnoir dans un tube de 50 mL. Les cellules sont alors centrifugées à température ambiante 10 min 1500 rpm puis reprises dans 1,5 mL de PBS et déposées sur 1,5 mL d'Histopaque 1083 (Sigma) à température ambiante dans un tube de 15 mL avant centrifugation 30 min à 20°C et 400g sans frein. L'interphase est récupérée à la pipette et lavée par 3 mL de PBS. Ensuite, l'enrichissement des cellules dendritiques spléniques est réalisé en utilisant des anticorps anti-CD11c couplés à des billes magnétiques et passage sur colonne magnétique (anticorps CD11c_microbeads, colonnes MS columns de Miltenyi Biotec) en suivant le protocole du fournisseur. Les cellules issues de deux passages sur deux colonnes différentes sont ensuite marquées avec des anticorps anti-CD11c couplés au fluorophore FITC ou

APC (Miltenyi Biotec) avant analyse par cytométrie en flux avec enregistrement d'au moins 40 000 événements.

20. Microscopie électronique

Les images de microscopie électronique sont obtenues grâce à une collaboration avec le Docteur Olivier Lambert du Laboratoire de Chimie & Biologie des Membranes et des Nanoobjets, Bordeaux. Pour ces expériences, des liposomes dialysés sont utilisés et les polyplexes et LPR présentés contiennent de l'ARNm MART1. Les échantillons sont déposés sur des grilles de cuivre recouvertes d'une couche de carbone puis congelés dans l'éthane liquide. La couche de carbone présente des trous dans lesquels vient se fixer l'échantillon qui est alors inclus dans une couche de glace amorphe au niveau des trous du carbone. Ils ont ensuite été analysés à l'aide d'un microscope FEI Tecnai F20 à 200 kV et avec un grossissement x 50 000.

21. Scintigraphie

La biodistribution par scintigraphie des LPD formés avec de l'ADN radio-marqué au ^{99m}Tc a été réalisée au Centre d'Imagerie du Petit Animal par le Docteur Stéphanie Lerondel. L'examen est réalisé à l'aide du Gamma Imager (Biospace Mesure, France) avec une matrice 256x256, des temps d'acquisition de 1 min (pour le t0, t30min, t1h et t3h) et de 5min pour le t5h ; une fenêtre spectrale : 121-156 KeV. Les souris sont autopsiées immédiatement après le t5h. Les poumons, les reins, le foie, la rate sont prélevés et pesés puis la radioactivité est comptée à l'aide du Gamma Imager. Le temps d'acquisition est de 1 minute pour le foie et 5 minutes pour les autres tissus avec une matrice : 64 x 64.

Bibliographie

- Aarntzen, E. H., C. G. Figdor, et coll. (2008). "Dendritic cell vaccination and immune monitoring." Cancer Immunol Immunother **57**(10): 1559-1568.
- Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." Nat Immunol **5**(7): 678-684.
- ACS (2008). "Cancer Facts & Figures 2008." American Cancer Society.
- ACS (2010). "Melanoma Skin Cancer." American Cancer Society.
- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, et coll. (2006). "Inflammation and cancer: how hot is the link?" Biochem Pharmacol **72**(11): 1605-1621.
- Ahmad, A., H. M. Evans, et al. (2005). "New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery." J Gene Med **7**(6): 739-48.
- Allan, C. P., C. J. Turtle, et coll. (2004). "The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy." Cytotherapy **6**(2): 154-163.
- Allison, S. D., M. C. Molina, et coll. (2000). "Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis." Biochim Biophys Acta **1468**(1-2): 127-138.
- Amigorena, S. and A. Savina (2010). "Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **22**(1): 109-117.
- Anchordoquy, T. J., J. F. Carpenter, et coll. (1997). "Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/DNA complexes after freeze-drying and rehydration." Arch Biochem Biophys **348**(1): 199-206.
- Anderson, M. (2009). "Phase III trial indicates potential for melanoma vaccine." Future Oncol **5**(6): 759-761.
- Andrianaivo, F., M. Lecocq, et coll. (2004). "Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection." J Gene Med **6**(8): 877-83.
- Avrameas, A., D. McIlroy, et coll. (1996). "Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells." Eur J Immunol **26**(2): 394-400.
- Bachem, A., S. Guttler, et coll. (2010). "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells." J Exp Med **207**(6): 1273-81.
- Baecher-Allan, C. and D. E. Anderson (2006). "Regulatory cells and human cancer." Semin Cancer Biol **16**(2): 98-105.
- Ballestrero, A., D. Boy, et coll. (2008). "Immunotherapy with dendritic cells for cancer." Adv Drug Deliv Rev **60**(2): 173-183.

- Barrow, C., J. Browning, et coll. (2006). "Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 764-71.
- Belot A, G. P., Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S., T. B. Bouvier AM, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M., et coll. (2008). "Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005." Rev Epidemiol Sante Publique **56**(3): 159-175.
- Berinstein, N. L. (2009). "Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model." Ann N Y Acad Sci **1174**: 107-117.
- Bevan, M. J. (2004). "Helping the CD8(+) T-cell response." Nat Rev Immunol **4**(8): 595-602.
- Bieber, T., W. Meissner, et coll. (2002). "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes." J Control Release **82**(2-3): 441-454.
- Boczkowski, D., S. K. Nair, et coll. (1996). "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." J Exp Med **184**(2): 465-472.
- Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, et coll. (2004). "In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination." J Exp Med **199**(6): 815-824.
- Boon, T., P. G. Coulie, et coll. (2006). "Human T cell responses against melanoma." Annu Rev Immunol **24**: 175-208.
- Brigham, K. L., B. Meyrick, et coll. (1989). "In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle." Am J Med Sci **298**(4): 278-281.
- Bringmann, A., S. A. Held, et coll. (2010). "RNA vaccines in cancer treatment." J Biomed Biotechnol: 623687.
- Brissault, B., C. Leborgne, et coll. (2006). "Linear topology confers in vivo gene transfer activity to polyethylenimines." Bioconjug Chem **17**(3): 759-765.
- Brisson, M., Y. He, et coll. (1999). "A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes." Gene Ther **6**(2): 263-270.
- Brunel, F., A. Darbouret, et coll. (1999). "Cationic lipid DC-Chol induces an improved and balanced immunity able to overcome the unresponsiveness to the hepatitis B vaccine." Vaccine **17**(17): 2192-2203.
- Brus, C., E. Kleemann, et coll. (2004). "Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization." J Control Release **95**(1): 119-131.
- Bryant, P. W., A. M. Lennon-Dumenil, et coll. (2002). "Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules." Adv Immunol **80**: 71-114.

- Buhtoiarov, I. N., P. M. Sonnel, et coll. (2007). "Macrophages are essential for antitumour effects against weakly immunogenic murine tumours induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides." Immunology **120**(3): 412-423.
- Burgdorf, S., A. Kautz, et coll. (2007). "Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation." Science **316**(5824): 612-616.
- Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, et coll. (2006). "The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation." J Immunol **176**(11): 6770-6776.
- Caminschi, I., M. H. Lahoud, et coll. (2009). "Enhancing immune responses by targeting antigen to DC." Eur J Immunol **39**(4): 931-938.
- Carralot, J. P., J. Probst, et coll. (2004). "Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines." Cell Mol Life Sci **61**(18): 2418-2424.
- Carralot, J. P., B. Weide, et coll. (2005). "Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas." Genet Vaccines Ther **3**: 6.
- Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, et coll. (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy." Science **326**(5954): 818-823.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, et coll. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., C. Lagresle, et coll. (2005). "Gene therapy for severe combined immunodeficiency." Annu Rev Med **56**: 585-602.
- Chabaud, P., M. Camplo, et coll. (2006). "Cationic nucleoside lipids for gene delivery." Bioconjug Chem **17**(2): 466-472.
- Chang, L. J. (2010). "Lentiviral vector transduction of dendritic cells for novel vaccine strategies." Methods Mol Biol **614**: 161-171.
- Chaudhry, U. I., T. P. Kingham, et coll. (2006). "Combined stimulation with interleukin-18 and CpG induces murine natural killer dendritic cells to produce IFN-gamma and inhibit tumor growth." Cancer Res **66**(21): 10497-10504.
- Chen, C., D. Han, et coll. (2010). "An overview of liposome lyophilization and its future potential." J Control Release **142**(3): 299-311.
- Chen, T. R. (1977). "In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain." Exp Cell Res **104**(2): 255-262.
- Cheradame, H., M. SASSATELLI, et coll. (2009). "Polymère dérivé de la polyéthylénimine pour le transfert de gène." Brevet FR 2928373 (A1).
- Chesnoy, S. and L. Huang (2000). "Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 27-47.

- Cho, H. I. and E. Celis (2009). "Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects." Cancer Res **69**(23): 9012-9019.
- Chouaib, S., F. Meslin, et coll. (2009). "Tumor resistance to specific lysis: a major hurdle for successful immunotherapy of cancer." Clin Immunol **130**(1): 34-40.
- Clamme, J. P., G. Krishnamoorthy, et coll. (2003). "Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy." Biochim Biophys Acta **1617**(1-2): 52-61.
- Clement, J., K. Kiefer, et coll. (2005). "Large-scale production of lipoplexes with long shelf-life." Eur J Pharm Biopharm **59**(1): 35-43.
- Cochran, A. J., R. R. Huang, et coll. (2006). "Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes." Nat Rev Immunol **6**(9): 659-670.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Copland, M. J., M. A. Baird, et coll. (2003). "Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells." Vaccine **21**(9-10): 883-890.
- Cortesi, R., E. Esposito, et coll. (2000). "Effect of DNA complexation and freeze-drying on the physicochemical characteristics of cationic liposomes." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **10**(3): 205-215.
- Croft, M. (2003). "Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?" Nat Rev Immunol **3**(8): 609-620.
- Crowe, L. M. (2002). "Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(3): 505-513.
- Cruz-Munoz, W., S. Man, et coll. (2008). "Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis." Cancer Res **68**(12): 4500-5.
- Cummins, D. L., J. M. Cummins, et coll. (2006). "Cutaneous malignant melanoma." Mayo Clin Proc **81**(4): 500-507.
- Dai, Y., T. S. Lawrence, et coll. (2009). "Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B." Am J Transl Res **1**(1): 1-15.
- Dalton, W. S. and S. H. Friend (2006). "Cancer biomarkers--an invitation to the table." Science **312**(5777): 1165-1168.
- Dankort, D., D. P. Curley, et coll. (2009). "Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma." Nat Genet **41**(5): 544-52.
- Dass, C. R. (2004). "Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection." J Mol Med **82**(9): 579-591.

- Davis, M. E., Z. G. Chen, et coll. (2008). "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." Nat Rev Drug Discov **7**(9): 771-782.
- De Vries, I. J., D. J. Krooshoop, et coll. (2003). "Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state." Cancer Res **63**(1): 12-17.
- De Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, et coll. (2005). "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy." Nat Biotechnol **23**(11): 1407-13.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et coll. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-737.
- Deng, H. and J. A. Wolff (1994). "Self-amplifying expression from the T7 promoter in 3T3 mouse fibroblasts." Gene **143**(2): 245-249.
- Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et coll. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3365-3374.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et coll. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.
- Disis, M. L., H. Bernhard, et coll. (2009). "Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment." Lancet **373**(9664): 673-683.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.
- Douglas, K. L. (2008). "Toward development of artificial viruses for gene therapy: a comparative evaluation of viral and non-viral transfection." Biotechnol Prog **24**(4): 871-883.
- Drake, C. G. (2010). "Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy." Nat Rev Immunol **10**(8): 580-93.
- Dreno, B., J. M. Nguyen, et coll. (2002). "Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." Cancer Immunol Immunother **51**(10): 539-546.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et coll. (2003). "Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients." J Immunother **26**(4): 332-342.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et coll. (2002). "A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma." J Immunother **25**(3): 243-251.
- Dudley, M. E., J. C. Yang, et coll. (2008). "Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens." J Clin Oncol **26**(32): 5233-5239.

- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, et coll. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-111.
- El Ouahabi, A., M. Thiry, et coll. (1997). "The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids." FEBS Lett **414**(2): 187-192.
- Engell-Noerregaard, L., T. H. Hansen, et coll. (2009). "Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters." Cancer Immunol Immunother **58**(1): 1-14.
- Engering, A. J., M. Cella, et coll. (1997). "The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells." Eur J Immunol **27**(9): 2417-2425.
- Engering, A. J., M. Cella, et coll. (1997). "Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells." Adv Exp Med Biol **417**: 183-187.
- Escoffre, J. M., T. Portet, et coll. (2009). "What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues." Mol Biotechnol **41**(3): 286-295.
- Espuelas, S., C. Thumann, et coll. (2008). "Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes." Bioconjug Chem **19**(12): 2385-2393.
- Ewert, K. K., H. M. Evans, et al. (2006). "A columnar phase of dendritic lipid-based cationic liposome-DNA complexes for gene delivery: hexagonally ordered cylindrical micelles embedded in a DNA honeycomb lattice." J Am Chem Soc **128**(12): 3998-4006.
- Faham, A. and J. G. Altin (2010). "Ag-bearing liposomes engrafted with peptides that interact with CD11c/CD18 induce potent Ag-specific and anti-tumor immunity." Int J Cancer.
- Faneca, H., S. Simoes, et coll. (2002). "Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery." Biochim Biophys Acta **1567**(1-2): 23-33.
- Faries, M. B. and D. L. Morton (2005). "Therapeutic vaccines for melanoma: current status." BioDrugs **19**(4): 247-60.
- Felgner, P. L., Y. Barenholz, et coll. (1997). "Nomenclature for synthetic gene delivery systems." Hum Gene Ther **8**(5): 511-512.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et coll. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.
- Filion, M. C. and N. C. Phillips (1997). "Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells." Biochim Biophys Acta **1329**(2): 345-356.
- Fischer, P. M. (2009). "Cap in hand: targeting eIF4E." Cell Cycle **8**(16): 2535-2541.

- Floch, V., S. Loisel, et coll. (2000). "Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity." J Med Chem **43**(24): 4617-4628.
- Foglieni, C., A. Bragonzi, et coll. (2000). "Glomerular filtration is required for transfection of proximal tubular cells in the rat kidney following injection of DNA complexes into the renal artery." Gene Ther **7**(4): 279-285.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et coll. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fraszczak, J., M. Trad, et coll. (2010). "Peroxynitrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells." J Immunol **184**(4): 1876-1884.
- Gandini, S., F. Sera, et coll. (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi." Eur J Cancer **41**(1): 28-44.
- Gao, Q., S. J. Qiu, et coll. (2007). "Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection." J Clin Oncol **25**(18): 2586-2593.
- Gao, X. and L. Huang (1996). "Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations." Biochemistry **35**(3): 1027-1036.
- Garcia, L., M. Bunuales, et coll. (2007). "Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells." Eur J Pharm Biopharm **67**(1): 58-66.
- Giblin, A. V. and J. M. Thomas (2007). "Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma." J Plast Reconstr Aesthet Surg **60**(1): 32-40.
- Ginzkey, C., S. O. Eicker, et coll. (2010). "Increase in tumor size following intratumoral injection of immunostimulatory CpG-containing oligonucleotides in a rat glioma model." Cancer Immunol Immunother **59**(4): 541-551.
- Glasspool-Malone, J., P. R. Steenland, et coll. (2002). "DNA transfection of macaque and murine respiratory tissue is greatly enhanced by use of a nuclease inhibitor." J Gene Med **4**(3): 323-332.
- GMBH, CUREVAC (2010). "Composition comprising a complexed (M)RNA and a naked mrna for providing or enhancing an immunostimulatory response in a mammal and uses thereof."
- Golda, A., J. Pelisek, et coll. (2007). "Small poly-L-lysines improve cationic lipid-mediated gene transfer in vascular cells in vitro and in vivo." J Vasc Res **44**(4): 273-282.
- Goula, D., J. S. Remy, et coll. (1998). "Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system." Gene Ther **5**(5): 712-717.
- Granucci, F., M. Foti, et coll. (2005). "Dendritic cell biology." Adv Immunol **88**: 193-233.

- Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, et coll. (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." Nature **445**(7130): 851-857.
- Grit, M. and D. J. Crommelin (1993). "Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability." Chem Phys Lipids **64**(1-3): 3-18.
- Groothuis, T. A. and J. Neefjes (2005). "The many roads to cross-presentation." J Exp Med **202**(10): 1313-8.
- Gruber, A., J. Kan-Mitchell, et coll. (2000). "Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro." Blood **96**(4): 1327-1333.
- Grudzien-Nogalska, E., J. Jemielity, et coll. (2007). "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells." RNA **13**(10): 1745-1755.
- Guernonprez, P., J. Valladeau, et coll. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-667.
- Gunter, K. C., A. S. Khan, et coll. (1993). "The safety of retroviral vectors." Hum Gene Ther **4**(5): 643-645.
- Gustafsson, J., G. Arvidson, et coll. (1995). "Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 305-312.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et coll. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.
- Hafez, I. M. and P. R. Cullis (2001). "Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery." Adv Drug Deliv Rev **47**(2-3): 139-48.
- Hahn, L. D., H. Kong, et coll. (2010). "Polycation Structure Mediates Expression of Lyophilized Polycation/pDNA Complexes." Macromol Biosci.
- Hansen, S., S. Thiel, et coll. (2000). "Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum." J Immunol **164**(5): 2610-2618.
- Harty, J. T. and V. P. Badovinac (2008). "Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory." Nat Rev Immunol **8**(2): 107-119.
- Hashida, M., S. Kawakami, et coll. (2005). "Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery." Chem Pharm Bull (Tokyo) **53**(8): 871-880.
- Hashida, M., M. Nishikawa, et coll. (2001). "Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers." Adv Drug Deliv Rev **52**(3): 187-196.
- Hattori, Y., S. Kawakami, et coll. (2006). "Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route." J Pharmacol Exp Ther **318**(2): 828-834.
- HCSP, Haut Comité de Santé Publique (2009). "Evaluation du Plan Cancer, rapport final."

- Heiser, A., P. Dahm, et coll. (2000). "Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro." J Immunol **164**(10): 5508-5514.
- Hersh, E. M. and A. T. Stopeck (1997). "Recent advances in the treatment of malignant melanoma with gene therapy." Mol Med **3**(10): 636-651.
- Higano, C. S., P. F. Schellhammer, et coll. (2009). "Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer." Cancer **115**(16): 3670-9.
- Higgins, J., N. A. Hodges, et coll. (1986). "Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing." J Pharm Pharmacol **38**(4): 259-263.
- Hinrichs, W. L., F. A. Mancenido, et coll. (2006). "The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying." Int J Pharm **311**(1-2): 237-244.
- Hobel, S., R. Prinz, et coll. (2008). "Polyethylenimine PEI F25-LMW allows the long-term storage of frozen complexes as fully active reagents in siRNA-mediated gene targeting and DNA delivery." Eur J Pharm Biopharm **70**(1): 29-41.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et coll. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-23.
- Hoerr, I., R. Obst, et coll. (2000). "In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies." Eur J Immunol **30**(1): 1-7.
- Holtkamp, S., S. Kreiter, et coll. (2006). "Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells." Blood **108**(13): 4009-17.
- Houde, M., S. Bertholet, et coll. (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." Nature **425**(6956): 402-406.
- Hu, Y., K. Li, et coll. (2010). "Pegylated immuno-lipopolyplexes: A novel non-viral gene delivery system for liver cancer therapy." J Control Release.
- IARC, I. A. f. R. o. C. (2006). "Exposure to Artificial UV Radiation and Skin Cancer."
- IARC, W. (2008). "WORLD CANCER REPORT 2008."
- Inoh, Y., T. Furuno, et coll. (2009). "Nonviral vectors with a biosurfactant MEL-A promote gene transfection into solid tumors in the mouse abdominal cavity." Biol Pharm Bull **32**(1): 126-128.
- Institut de Veille Sanitaire, Belot et coll. (2008). "Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005."

- INVS, Institut National de Veille Sanitaire (2010). "Mortalité observée par cancer en France et dans 22 régions métropolitaines Situation pour la période 2003-2007 et évolution entre 1983-1987 et 2003-2007."
- Itoh, K., C. D. Platsoucas, et coll. (1988). "Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor." J Exp Med **168**(4): 1419-1441.
- Ivanov, V. N., A. Bhoumik, et coll. (2003). "Death receptors and melanoma resistance to apoptosis." Oncogene **22**(20): 3152-3161.
- Iwaoka, S., T. Nakamura, et coll. (2006). "Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase-caspase-8-Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 cells." J Leukoc Biol **79**(1): 184-191.
- Janssen, A. H., P. Van der Voort, et coll. (2002). "A 3D-TEM study of the shape of mesopores in SBA-15 and modified SBA-15 materials." Chem Commun (Camb)(15): 1632-3.
- Jayankura, M., C. Boggione, et coll. (2003). "In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer." J Gene Med **5**(7): 618-624.
- Jemal, A., R. Siegel, et coll. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Jemal, A., A. Thomas, et coll. (2002). "Cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **52**(1): 23-47.
- Jemielity, J., T. Fowler, et coll. (2003). "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties." RNA **9**(9): 1108-1122.
- Jesorka, O. O. e. A. (2008). "Liposomes: Technologies and Analytical Applications " Annu Rev Anal Chem **1**: 801-832.
- Kato, M., K. J. McDonald, et coll. (2006). "Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes." Int Immunol **18**(6): 857-869.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Pathogen recognition with Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **17**(4): 338-344.
- Kawakami, S., A. Sato, et coll. (2000). "Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes." Gene Ther **7**(4): 292-299.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, et coll. (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." J Immunol **154**(8): 3961-3968.
- Kawasaki, T., R. Etoh, et coll. (1978). "Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver." Biochem Biophys Res Commun **81**(3): 1018-1024.
- Keller, M., R. P. Harbottle, et coll. (2003). "Nuclear localisation sequence templated nonviral gene delivery vectors: investigation of intracellular trafficking events of LMD and LD vector systems." ChemBiochem **4**(4): 286-298.

- Khalil, I. A., K. Kogure, et coll. (2006). "Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery." Pharmacol Rev **58**(1): 32-45.
- Kim, H. A., H. M. Ko, et coll. (2009). "CpG-ODN-based immunotherapy is effective in controlling the growth of metastasized tumor cells." Cancer Lett **274**(1): 160-164.
- King, M., D. Spooner, et coll. (2001). "Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature." Clin Oncol (R Coll Radiol) **13**(6): 466-469.
- Klapper, J. A., A. A. Thomasian, et coll. (2009). "Single-pass, closed-system rapid expansion of lymphocyte cultures for adoptive cell therapy." J Immunol Methods **345**(1-2): 90-99.
- Kofler, P., B. Wiesenhofer, et coll. (1998). "Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo." Cell Transplant **7**(2): 175-185.
- Kohn, D. B. and F. Candotti (2009). "Gene therapy fulfilling its promise." N Engl J Med **360**(5): 518-521.
- Koltover, I., T. Salditt, et coll. (1998). "An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery." Science **281**(5373): 78-81.
- Koutsky, L. A., K. A. Ault, et coll. (2002). "A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine." N Engl J Med **347**(21): 1645-1651.
- Krogsgaard, M., J. Juang, et coll. (2007). "A role for "self" in T-cell activation." Semin Immunol **19**(4): 236-244.
- Kryczek, I., S. Wei, et coll. (2007). "Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment." J Immunol **178**(11): 6730-6733.
- Kuhn, A. N., M. Diken, et coll. (2010). "Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo." Gene Ther.
- Kumar, V. V., C. Pichon, et coll. (2003). "Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH." Gene Ther **10**(15): 1206-1215.
- Kutzler, M. A. and D. B. Weiner (2008). "DNA vaccines: ready for prime time?" Nat Rev Genet **9**(10): 776-788.
- Kuvichkin, V. V., R. S. Danev, et coll. (2009). "DNA-induced aggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes in the presence of multivalent cations observed by the cryo-TEM technique." J Membr Biol **227**(2): 95-103.
- Kyte, J. A., G. Kvalheim, et coll. (2005). "Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination." Cancer Gene Ther **12**(6): 579-591.

- Kyte, J. A., L. Mu, et coll. (2006). "Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA." Cancer Gene Ther **13**(10): 905-918.
- Labarriere, N., M. C. Pandolfino, et coll. (2002). "Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients." Cancer Immunol Immunother **51**(10): 532-538.
- Lamarche, F., M. Mevel, et coll. (2007). "Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery." Bioconjug Chem **18**(5): 1575-1582.
- Landi, A., L. A. Babiuk, et coll. (2007). "High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer." J Leukoc Biol **82**(4): 849-860.
- Larsson, M., J. F. Fonteneau, et coll. (2001). "Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells." Eur J Immunol **31**(12): 3432-3442.
- Lasic, D. D. (1998). "Novel applications of liposomes." Trends Biotechnol **16**(7): 307-321.
- Le Gall, T., D. Loizeau, et coll. (2010). "A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities." J Med Chem **53**(4): 1496-1508.
- Leaf, H. (1996). "A DRY POWDER FORMULATION FOR GENE THERAPY." Brevet WO **96/27393**.
- Leblond, J., N. Mignet, et coll. (2007). "Lipopolythioureas: a new non-cationic system for gene transfer." Bioconjug Chem **18**(2): 484-93.
- Leblond, J., N. Mignet, et coll. (2006). "Design, synthesis, and evaluation of enhanced DNA binding new lipopolythioureas." Bioconjug Chem **17**(5): 1200-8.
- Lee, K. H., M. C. Panelli, et coll. (1998). "Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination." J Immunol **161**(8): 4183-4194.
- Lee, R. J. and L. Huang (1996). "Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer." J Biol Chem **271**(14): 8481-8487.
- Lesterhuis, W. J., E. H. Aarntzen, et coll. (2008). "Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof?" Crit Rev Oncol Hematol **66**(2): 118-134.
- Li, B., S. Li, et coll. (2000). "Lyophilization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes." J Pharm Sci **89**(3): 355-364.
- Li, S. and L. Huang (1997). "In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes." Gene Ther **4**(9): 891-900.
- Liao, Y. P., C. C. Wang, et coll. (2009). "Local irradiation of murine melanoma affects the development of tumour-specific immunity." Immunology **128**(1 Suppl): e797-804.

- Lin, A. J., N. L. Slack, et coll. (2003). "Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density controls universal transfection behavior in lamellar cationic liposome-DNA complexes." Biophys J **84**(5): 3307-3316.
- Lipsker, D., F. Engel, et coll. (2007). "Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma." Br J Dermatol **157**(2): 338-343.
- Liu, F., C. C. Conwell, et coll. (2007). "Novel nonviral vectors target cellular signaling pathways: regulated gene expression and reduced toxicity." J Pharmacol Exp Ther **321**(2): 777-783.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et coll. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-2761.
- Lladser, A., K. Ljungberg, et coll. (2009). "Intradermal DNA electroporation induces survivin-specific CTLs, suppresses angiogenesis and confers protection against mouse melanoma." Cancer Immunol Immunother.
- Llorca, O. (2008). "Extended and bent conformations of the mannose receptor family." Cell Mol Life Sci **65**(9): 1302-1310.
- Lonchay, C., P. van der Bruggen, et coll. (2004). "Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **101** Suppl 2: 14631-14638.
- Lonez, C., M. Vandenbranden, et coll. (2008). "Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling." Prog Lipid Res **47**(5): 340-347.
- Lowe, D. B., M. H. Shearer, et coll. (2007). "Towards progress on DNA vaccines for cancer." Cell Mol Life Sci **64**(18): 2391-2403.
- Lu, Q. L., G. Bou-Gharios, et coll. (2003). "Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory." Gene Ther **10**(2): 131-142.
- Lu, Y., S. Kawakami, et coll. (2007). "Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes." Biomaterials **28**(21): 3255-3262.
- Lv, H., S. Zhang, et coll. (2006). "Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery." J Control Release **114**(1): 100-109.
- Ma, B., S. Zhang, et coll. (2007). "Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery." J Control Release **123**(3): 184-194.
- Maguire, A. M., K. A. High, et coll. (2009). "Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial." Lancet **374**(9701): 1597-1605.

- Mahnke, K., M. Guo, et coll. (2000). "The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments." J Cell Biol **151**(3): 673-684.
- Maitani, Y., Y. Aso, et coll. (2008). "Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency." Int J Pharm **356**(1-2): 69-75.
- Mannisto, M., M. Reinisalo, et coll. (2007). "Polyplex-mediated gene transfer and cell cycle: effect of carrier on cellular uptake and intracellular kinetics, and significance of glycosaminoglycans." J Gene Med **9**(6): 479-487.
- Mao, H. Q., K. Roy, et coll. (2001). "Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency." J Control Release **70**(3): 399-421.
- Marghoob, A. A., L. Changchien, et coll. (2009). "The most common challenges in melanoma diagnosis and how to avoid them." Australas J Dermatol **50**(1): 1-13; quiz 14-15.
- Marghoob, A. A., K. Koenig, et coll. (2000). "Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging." Cancer **88**(3): 589-595.
- Martinez-Pomares, L., D. Wienke, et coll. (2006). "Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor." Eur J Immunol **36**(5): 1074-1082.
- Matheoud, D., L. Perie, et coll. (2010). "Crosspresentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo." Blood.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-612.
- McLendon, P. M., D. J. Buckwalter, et coll. (2010). "Interaction of Poly(glycoamidoamine) DNA Delivery Vehicles with Cell-Surface Glycosaminoglycans Leads to Polyplex Internalization in a Manner Not Solely Dependent on Charge." Mol Pharm.
- McNeil, S. E., A. Vangala, et coll. (2010). "Lipoplexes formulation and optimisation: in vitro transfection studies reveal no correlation with in vivo vaccination studies." Curr Drug Deliv **7**(2): 175-187.
- Medina-Kauwe, L. K., J. Xie, et coll. (2005). "Intracellular trafficking of nonviral vectors." Gene Ther **12**(24): 1734-1751.
- Melnikova, V. O. and M. Bar-Eli (2008). "Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype." Cancer Biol Ther **7**(7): 997-1003.
- Mevel, M., G. Breuzard, et coll. (2008). "Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative." Chembiochem **9**(9): 1462-1471.

- Mevel, M., T. Montier, et coll. (2007). "Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers." Bioconjug Chem **18**(5): 1604-1611.
- Mevel, M., C. Neveu, et coll. (2008). "Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays." Chem Commun (Camb)(27): 3124-3126.
- Midoux, P., G. Breuzard, et coll. (2008). "Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes." Curr Gene Ther **8**(5): 335-352.
- Midoux, P. and M. Monsigny (1999). "Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes." Bioconjug Chem **10**(3): 406-411.
- Midoux, P., C. Pichon, et coll. (2009). "Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers." Br J Pharmacol **157**(2): 166-178.
- Mihm, M. C., Jr., C. G. Clemente, et coll. (1996). "Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response." Lab Invest **74**(1): 43-47.
- Miller, A. J. and M. C. Mihm, Jr. (2006). "Melanoma." N Engl J Med **355**(1): 51-65.
- Mintzer, M. A. and E. E. Simanek (2009). "Nonviral vectors for gene delivery." Chem Rev **109**(2): 259-302.
- Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12349-12354.
- Mockey, M., E. Bourseau, et coll. (2007). "mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes." Cancer Gene Ther **14**(9): 802-814.
- Mockey, M., C. Goncalves, et coll. (2006). "mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level." Biochem Biophys Res Commun **340**(4): 1062-1068.
- Mohammed, A. R., V. W. Bramwell, et coll. (2006). "Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products." Methods **40**(1): 30-38.
- Molina, M. C., S. D. Allison, et coll. (2001). "Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators." J Pharm Sci **90**(10): 1445-1455.
- Monsigny, M., C. Petit, et coll. (1988). "Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod." Anal Biochem **175**(2): 525-530.
- Montier, T., P. Delepine, et coll. (2004). "Efficient gene transfer into human epithelial cell lines using glycosylated cationic carriers and neutral glycosylated co-lipids." Blood Cells Mol Dis **32**(2): 271-282.

- Moon, I. J., H. Kang, et coll. (2007). "Marked transfection enhancement by the DPL (DNA/peptide/lipid) complex." Int J Mol Med **20**(4): 429-437.
- Morille, M., C. Passirani, et coll. (2008). "Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer." Biomaterials **29**(24-25): 3477-3496.
- Moriya, K., A. Wakabayashi, et coll. (2010). "Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205(+) dendritic cells." Cancer Immunol Immunother.
- Morton, D. L., L. J. Foshag, et coll. (1992). "Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine." Ann Surg **216**(4): 463-82.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mounkes, L. C., W. Zhong, et coll. (1998). "Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo." J Biol Chem **273**(40): 26164-26170.
- Mountain, A. (2000). "Gene therapy: the first decade." Trends Biotechnol **18**(3): 119-128.
- Murphy, K. T., Paul, Walport Mark (2010). "Janeway's Immunobiology, Seventh Edition Editions Garland Science."
- Nabel, G. J., E. G. Nabel, et coll. (1993). "Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11307-11311.
- Nakamura, K., Y. Kuramoto, et coll. (2009). "Enhanced gene transfection in macrophages by histidine-conjugated mannosylated cationic liposomes." Biol Pharm Bull **32**(9): 1628-1631.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, et coll. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." Nat Immunol **6**(8): 769-776.
- Nguyen, L. T., K. Atobe, et al. (2007). "Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes." Biol Pharm Bull **30**(4): 751-7.
- Norman, J., W. Denham, et al. (2000). "Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation." Gene Ther **7**(16): 1425-30.
- Obata, Y., D. Suzuki, et coll. (2008). "Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery." Bioconjug Chem **19**(5): 1055-1063.
- OMS "Pathology and Genetics of Tumours of the Skin." World Health Organization Classification of Tumours.
- OMS (2002). "National cancer control programmes : policies and managerial guidelines."

- OMS (2009). "Relevé épidémiologique hebdomadaire." **84**(15): 117-132.
- Oved, K., E. Eden, et coll. (2009). "Predicting and controlling the reactivity of immune cell populations against cancer." Mol Syst Biol **5**: 265.
- Owen, S. A., L. L. Sanders, et coll. (2001). "Identification of higher risk thin melanomas should be based on Breslow depth not Clark level IV." Cancer **91**(5): 983-991.
- Pages, F., A. Berger, et coll. (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." N Engl J Med **353**(25): 2654-2666.
- Pascolo, S. (2004). "Messenger RNA-based vaccines." Expert Opin Biol Ther **4**(8): 1285-1294.
- Pasquinelli, A. E., J. E. Dahlberg, et coll. (1995). "Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases." RNA **1**(9): 957-967.
- Paulos, C. M., A. Kaiser, et coll. (2007). "Toll-like receptors in tumor immunotherapy." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5280-5289.
- Pedroso de Lima, M. C., S. Simoes, et coll. (2001). "Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications." Adv Drug Deliv Rev **47**(2-3): 277-294.
- Peguet-Navarro, J., M. Sportouch, et coll. (2003). "Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis." J Immunol **170**(7): 3488-3494.
- Perouzel, E., M. R. Jorgensen, et coll. (2003). "Synthesis and formulation of neoglycolipids for the functionalization of liposomes and lipoplexes." Bioconjug Chem **14**(5): 884-898.
- Phan, G. Q., J. C. Yang, et coll. (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8372-7.
- Polak, M. E., N. J. Borthwick, et coll. (2009). "Melanoma vaccines: The problems of local immunosuppression." Hum Immunol **70**(5): 331-339.
- Porteous, D. J., J. R. Dorin, et coll. (1997). "Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **4**(3): 210-218.
- Poste, G., J. Doll, et coll. (1982). "Comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastases." Cancer Res **42**(7): 2770-2778.
- Potts, M. (1994). "Desiccation tolerance of prokaryotes." Microbiol Rev **58**(4): 755-805.
- Pozzi, L. A., J. W. Maciaszek, et coll. (2005). "Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells." J Immunol **175**(4): 2071-2081.

- Presicce, P., A. Taddeo, et coll. (2008). "Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor." Mol Immunol **45**(4): 1136-1145.
- Prieto, P. A., K. H. Durflinger, et coll. (2010). "Enrichment of CD8+ cells from melanoma tumor-infiltrating lymphocyte cultures reveals tumor reactivity for use in adoptive cell therapy." J Immunother **33**(5): 547-556.
- Ramakrishna, V., J. F. Treml, et coll. (2004). "Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules." J Immunol **172**(5): 2845-2852.
- Raper, S. E., N. Chirmule, et coll. (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." Mol Genet Metab **80**(1-2): 148-58.
- Ray, S., A. Chhabra, et coll. (2009). "Obstacles to and opportunities for more effective peptide-based therapeutic immunization in human melanoma." Clin Dermatol **27**(6): 603-613.
- Rees, J. L. (2008). "Melanoma: what are the gaps in our knowledge." PLoS Med **5**(6): e122.
- Ren, T., Y. K. Song, et coll. (2000). "Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse." Gene Ther **7**(9): 764-768.
- Resina, S., P. Prevot, et coll. (2009). "Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy." PLoS One **4**(6): e6058.
- Robbins, P. F., M. E. Dudley, et coll. (2004). "Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy." J Immunol **173**(12): 7125-7130.
- Robson, N. C., S. Hoves, et coll. (2010). "Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced." Curr Opin Immunol **22**(1): 137-144.
- Rock, K. L. and A. L. Goldberg (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides." Annu Rev Immunol **17**: 739-779.
- Rock, K. L. and L. Shen (2005). "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." Immunol Rev **207**: 166-83.
- Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2009). "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma." Curr Opin Immunol **21**(2): 233-240.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard, et coll. (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N Engl J Med **319**(25): 1676-1680.
- Rosenberg, S. A., N. P. Restifo, et coll. (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **8**(4): 299-308.

- Rosenberg, S. A., R. M. Sherry, et coll. (2005). "Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with melanoma." J Immunol **175**(9): 6169-6176.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et coll. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-915.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et coll. (2003). "Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen." Hum Gene Ther **14**(8): 709-714.
- Sahay, G., D. Y. Alakhova, et coll. (2010). "Endocytosis of nanomedicines." J Control Release **145**(3): 182-95.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, et coll. (2010). "FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 490-500.
- Sallusto, F., M. Cella, et coll. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F., D. Lenig, et coll. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Sanderson, K., R. Scotland, et coll. (2005). "Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma." J Clin Oncol **23**(4): 741-750.
- Sato, N., Y. Hirohashi, et coll. (2009). "Molecular pathological approaches to human tumor immunology." Pathol Int **59**(4): 205-217.
- Scheel, B., R. Teufel, et coll. (2005). "Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA." Eur J Immunol **35**(5): 1557-66.
- Schmutz, M., D. Durand, et coll. (1999). "DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12293-8.
- Schuurhuis, D. H., P. Verdijk, et coll. (2009). "In situ expression of tumor antigens by messenger RNA-electroporated dendritic cells in lymph nodes of melanoma patients." Cancer Res **69**(7): 2927-2934.
- Seder, R. A. and R. Ahmed (2003). "Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation." Nat Immunol **4**(9): 835-842.
- Segura, E., A. L. Albiston, et coll. (2009). "Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20377-20381.

- Shen, Z., G. Reznikoff, et coll. (1997). "Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules." J Immunol **158**(6): 2723-2730.
- Shortman, K. and W. R. Heath (2010). "The CD8+ dendritic cell subset." Immunol Rev **234**(1): 18-31.
- Simberg, D., D. Danino, et coll. (2001). "Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. Relevance to optimal transfection activity." J Biol Chem **276**(50): 47453-47459.
- Singh, R. S., C. Goncalves, et coll. (2004). "On the gene delivery efficacies of pH-sensitive cationic lipids via endosomal protonation: a chemical biology investigation." Chem Biol **11**(5): 713-723.
- Slansky, J. E., F. M. Rattis, et coll. (2000). "Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex." Immunity **13**(4): 529-538.
- Smisterova, J., A. Wagenaar, et coll. (2001). "Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery." J Biol Chem **276**(50): 47615-47622.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et coll. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Sonawane, N. D., F. C. Szoka, Jr., et coll. (2003). "Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes." J Biol Chem **278**(45): 44826-44831.
- Sondak, V. K., P. Y. Liu, et coll. (2002). "Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: overall results of a randomized trial of the Southwest Oncology Group." J Clin Oncol **20**(8): 2058-66.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." Cell **136**(4): 731-745.
- Southern, P. J. and P. Berg (1982). "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." J Mol Appl Genet **1**(4): 327-341.
- Stahl, P. and S. Gordon (1982). "Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids." J Cell Biol **93**(1): 49-56.
- Stanic, V., Y. Arntz, et coll. (2008). "Filamentous condensation of DNA induced by pegylated poly-L-lysine and transfection efficiency." Biomacromolecules **9**(7): 2048-55.

- Steitz, J., C. M. Britten, et coll. (2006). "Effective induction of anti-melanoma immunity following genetic vaccination with synthetic mRNA coding for the fusion protein EGFP.TRP2." Cancer Immunol Immunother **55**(3): 246-253.
- Stepinski, J., C. Waddell, et coll. (2001). "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG." RNA **7**(10): 1486-1495.
- Stevenson, F. K., C. H. Ottensmeier, et coll. (2010). "DNA vaccines against cancer come of age." Curr Opin Immunol.
- Stopeck, A. T., E. M. Hersh, et coll. (1997). "Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **15**(1): 341-349.
- Strobel, I., S. Berchtold, et coll. (2000). "Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes." Gene Ther **7**(23): 2028-2035.
- Sun, X., H. W. Zhang, et coll. (2009). "Growth inhibition of the pulmonary metastatic tumors by systemic delivery of the p27 kip1 gene using lyophilized lipid-polycation-DNA complexes." J Gene Med **11**(6): 535-544.
- Swami, A., A. Aggarwal, et coll. (2007). "Imidazolyl-PEI modified nanoparticles for enhanced gene delivery." Int J Pharm **335**(1-2): 180-192.
- Switaj, T., A. Jalili, et coll. (2004). "CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide 1826 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4165-4175.
- Tacke, P. J., I. J. de Vries, et coll. (2007). "Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting." Nat Rev Immunol **7**(10): 790-802.
- Tagawa, S. T., P. Lee, et coll. (2003). "Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma." Cancer **98**(1): 144-154.
- Talebi, T. and J. S. Weber (2003). "Peptide vaccine trials for melanoma: preclinical background and clinical results." Semin Cancer Biol **13**(6): 431-438.
- Terakita, A., H. Matsunaga, et coll. (2009). "The influence of water on the stability of lyophilized formulations with inositol and mannitol as excipients." Chem Pharm Bull (Tokyo) **57**(5): 459-463.
- Terando, A. M., M. B. Faries, et coll. (2007). "Vaccine therapy for melanoma: current status and future directions." Vaccine **25 Suppl 2**: B4-16.
- Thierry, A. R., V. Norris, et coll. (2009). "Lipoplex nanostructures reveal a general self-organization of nucleic acids." Biochim Biophys Acta **1790**(5): 385-94.

- Thomas, M. and A. M. Klibanov (2002). "Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14640-14645.
- Tokunaga, M., N. Hazemoto, et coll. (2004). "Effect of oligopeptides on gene expression: comparison of DNA/peptide and DNA/peptide/liposome complexes." Int J Pharm **269**(1): 71-80.
- Tousignant, J. D., A. L. Gates, et coll. (2000). "Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice." Hum Gene Ther **11**(18): 2493-2513.
- Trionzi, P. L., W. Aldrich, et coll. (2005). "Phase I study of a plasmid DNA vaccine encoding MART-1 in patients with resected melanoma at risk for relapse." J Immunother **28**(4): 382-388.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol **23**: 975-1028.
- Tsai, J. T., K. J. Furstoss, et coll. (2002). "Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes." Biotechnol Appl Biochem **36**(Pt 1): 13-20.
- Un, K., S. Kawakami, et coll. (2010). "Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy." Biomaterials.
- van Broekhoven, C. L., C. R. Parish, et coll. (2004). "Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy." Cancer Res **64**(12): 4357-65.
- Van Nuffel, A. M., J. Corthals, et coll. (2010). "Immunotherapy of cancer with dendritic cells loaded with tumor antigens and activated through mRNA electroporation." Methods Mol Biol **629**: 405-452.
- Van Tendeloo, V. F., P. Ponsaerts, et coll. (2001). "Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells." Blood **98**(1): 49-56.
- Varmus, H. (2006). "The new era in cancer research." Science **312**(5777): 1162-1165.
- Viaud, S., C. Thery, et coll. (2010). "Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?" Cancer Res **70**(4): 1281-1285.
- Villadangos, J. A. and K. Shortman (2010). "Found in translation: the human equivalent of mouse CD8⁺ dendritic cells." J Exp Med **207**(6): 1131-1134.
- Wang, R. F. (2008). "CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer." Hum Immunol **69**(11): 811-814.

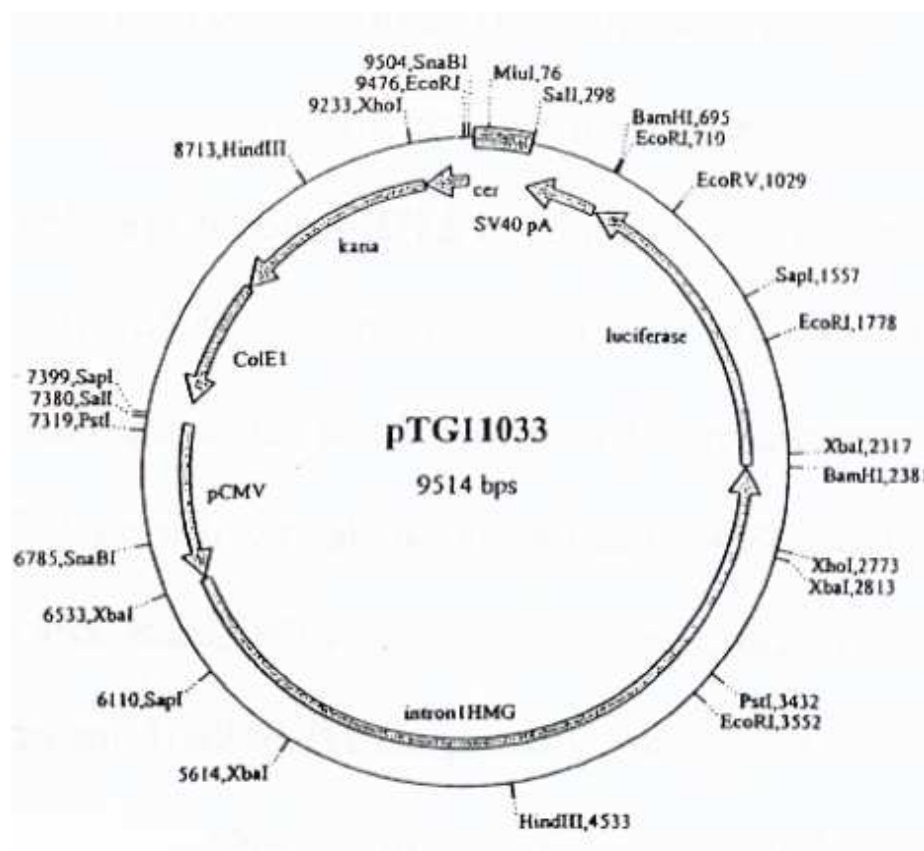
- Weber, J. S., H. Zarour, et coll. (2009). "Randomized phase 2/3 trial of CpG oligodeoxynucleotide PF-3512676 alone or with dacarbazine for patients with unresectable stage III and IV melanoma." Cancer **115**(17): 3944-3954.
- Wei, H., S. Wang, et coll. (2009). "Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice." Clin Cancer Res **15**(14): 4612-4621.
- Weide, B., J. P. Carralot, et coll. (2008). "Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA." J Immunother **31**(2): 180-188.
- Weide, B., S. Pascolo, et coll. (2009). "Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients." J Immunother **32**(5): 498-507.
- Weissman, D., H. Ni, et coll. (2000). "HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response." J Immunol **165**(8): 4710-4717.
- Werth, S., B. Urban-Klein, et coll. (2006). "A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes." J Control Release **112**(2): 257-270.
- Williams, J. A., A. E. Carnes, et coll. (2009). "Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production." Biotechnol Adv **27**(4): 353-370.
- Wilson, K. D., S. D. de Jong, et coll. (2009). "Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy." Adv Drug Deliv Rev **61**(3): 233-242.
- Wolf, P. R. and H. L. Ploegh (1995). "How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 267-306.
- Wolff, J. A. and V. Budker (2005). "The mechanism of naked DNA uptake and expression." Adv Genet **54**: 3-20.
- Wu, G. Y. and C. H. Wu (1987). "Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system." J Biol Chem **262**(10): 4429-4432.
- Xu, L. and T. J. Anchordoquy (2008). "Cholesterol domains in cationic lipid/DNA complexes improve transfection." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 2177-2181.
- Xu, Y. and F. C. Szoka, Jr. (1996). "Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection." Biochemistry **35**(18): 5616-5623.
- Yamamoto, A., M. Kormann, et coll. (2009). "Current prospects for mRNA gene delivery." Eur J Pharm Biopharm **71**(3): 484-489.

- Yamane, I., M. Nishikawa, et coll. (2005). "Cellular uptake and activation characteristics of naked plasmid DNA and its cationic liposome complex in human macrophages." Int J Pharm **305**(1-2): 145-153.
- Yan, W., W. Chen, et coll. (2008). "Reactive oxygen species play a central role in the activity of cationic liposome based cancer vaccine." J Control Release **130**(1): 22-28.
- Yang, J., K. I. Amiri, et coll. (2006). "BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 950-960.
- Yee, C., J. A. Thompson, et coll. (2002). "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16168-16173.
- Yewdall, A. W., S. B. Drutman, et coll. (2010). "CD8+ T cell priming by dendritic cell vaccines requires antigen transfer to endogenous antigen presenting cells." PLoS One **5**(6): e11144.
- Yuan, J., G. Y. Ku, et coll. (2009). "Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma." Cancer Immun **9**: 5.
- Zachowski, A. (1993). "Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement." Biochem J **294** (Pt 1): 1-14.
- Zamboni, W. C. (2005). "Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents." Clin Cancer Res **11**(23): 8230-8234.
- Zelenin, A. V., V. A. Kolesnikov, et coll. (1997). "Bacterial beta-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection." FEBS Lett **414**(2): 319-322.
- Zhang, H., Y. Ma, et coll. (2009). "Chemically-selective surface glyco-functionalization of liposomes through Staudinger ligation." Chem Commun (Camb)(21): 3032-3034.
- Zhang, J. S., F. Liu, et coll. (2005). "Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity." Adv Drug Deliv Rev **57**(5): 689-698.
- Zhang, S., Q. Wang, et coll. (2007). "Review: dendritic cell-based vaccine in the treatment of patients with advanced melanoma." Cancer Biother Radiopharm **22**(4): 501-507.
- Zhang, S., Y. Xu, et coll. (2004). "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery." J Control Release **100**(2): 165-180.
- Zhang, Y. and L. C. Yu (2008). "Microinjection as a tool of mechanical delivery." Curr Opin Biotechnol **19**(5): 506-510.
- Zhi, D., S. Zhang, et coll. (2010). "Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery." Bioconjug Chem.

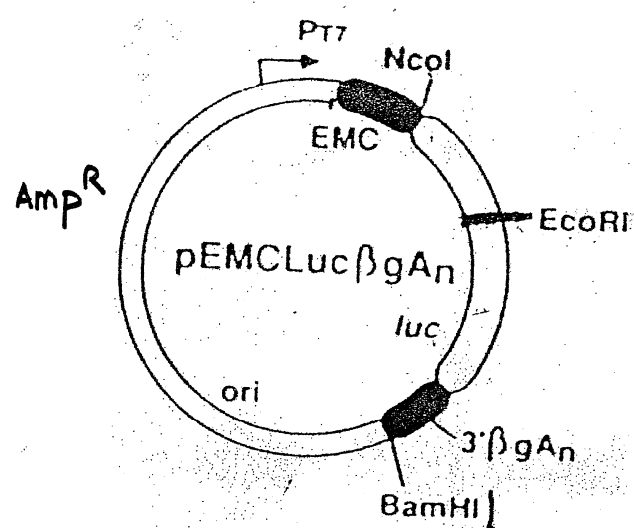
- Zhong, Z. R., Z. R. Zhang, et coll. (2007). "Characteristics comparison before and after lyophilization of transferrin modified Procationic-Liposome-Protamine-DNA complexes (Tf-PLPD)." Arch Pharm Res **30**(1): 102-108.
- Zhou, J., M. E. Dudley, et coll. (2005). "Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy." J Immunother **28**(1): 53-62.
- Zhou, X. and L. Huang (1994). "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action." Biochim Biophys Acta **1189**(2): 195-203.
- Zippelius, A., M. J. Pittet, et coll. (2002). "Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans." J Exp Med **195**(4): 485-494.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et coll. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.
- Zou, S. M., P. Erbacher, et coll. (2000). "Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse." J Gene Med **2**(2): 128-134.
- Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer **5**(4): 263-274.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.
- Zuber, G., E. Dauty, et coll. (2001). "Towards synthetic viruses." Adv Drug Deliv Rev **52**(3): 245-253.
- Zuhorn, I. S., U. Bakowsky, et coll. (2005). "Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency." Mol Ther **11**(5): 801-810.

Annexe

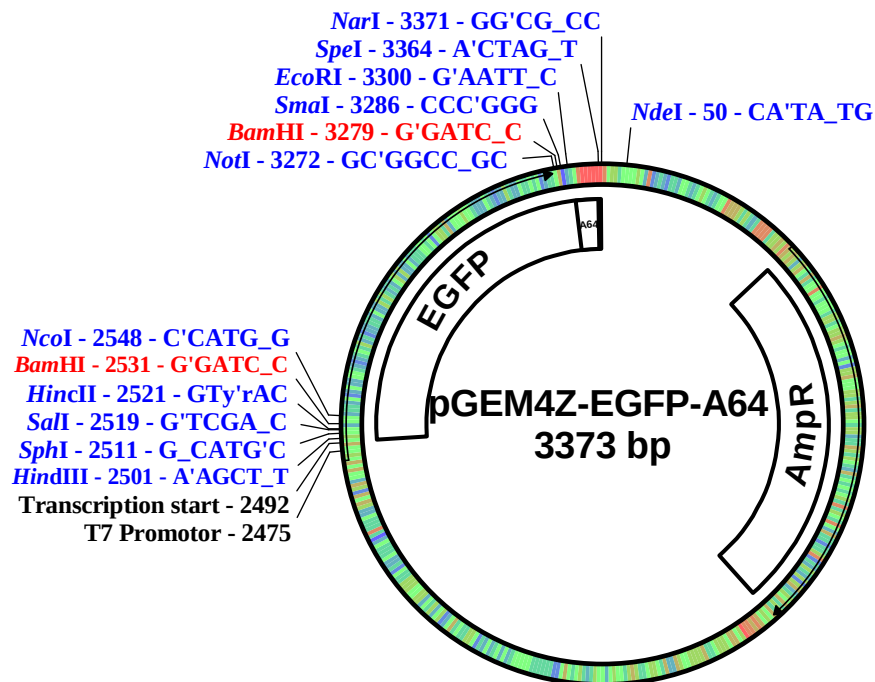
Annexe 1 : Carte du plasmide pTG11033



Annexe 2 : Carte du plasmide pEMCLuc β gA_n

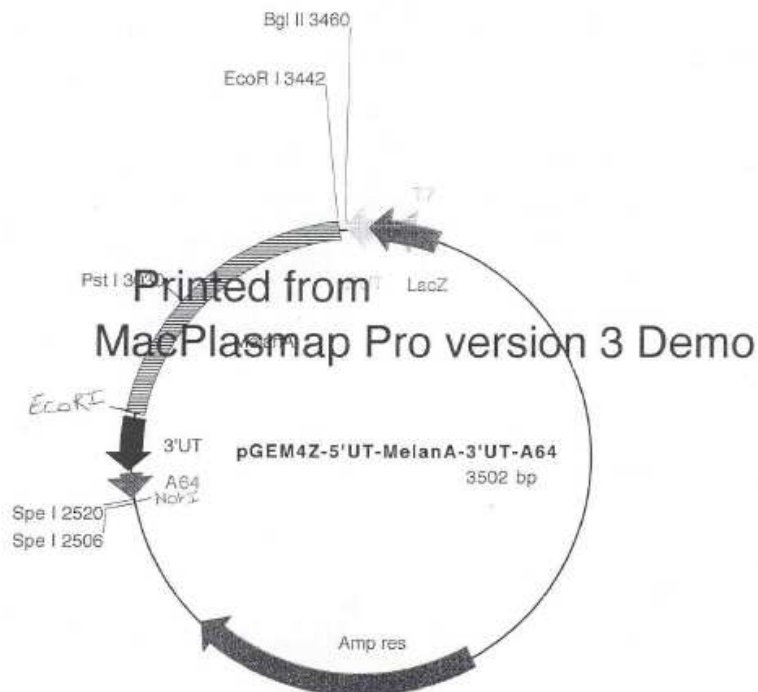


Annexe 3 : Carte du plasmide pGEM4Z-EGFP-A64

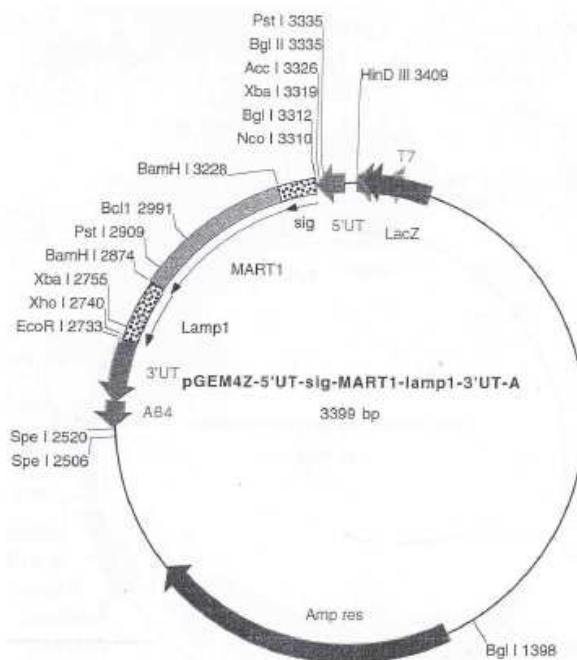


Annexe 4 : Cartes des plasmides pGEM4Z-MART1-A64 et pGEM4Z-MART1-LAMP1-A64

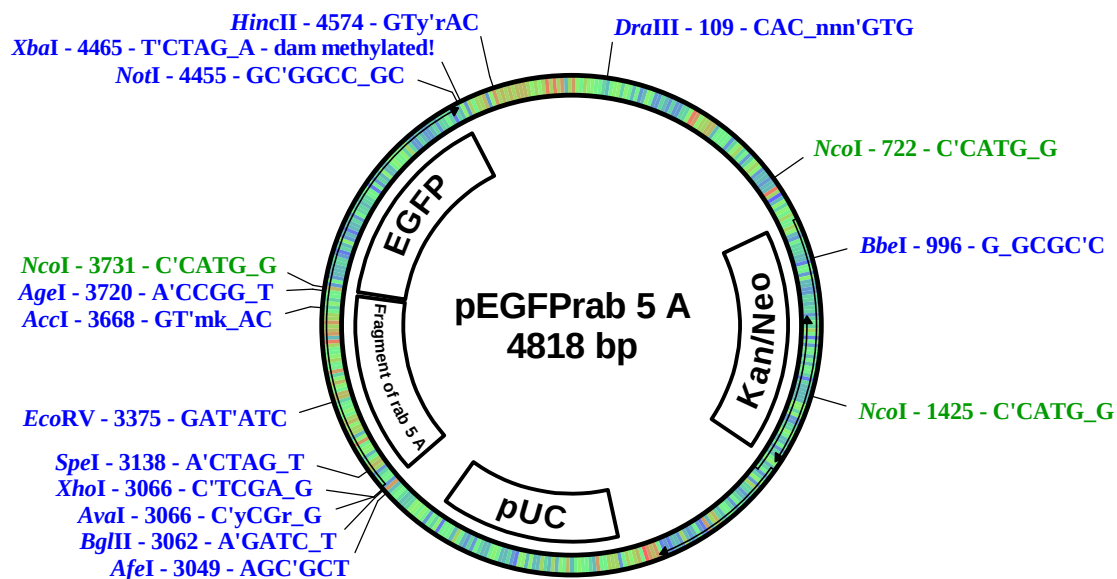
Carte du plasmide pGEM-4Z/MART1/A64



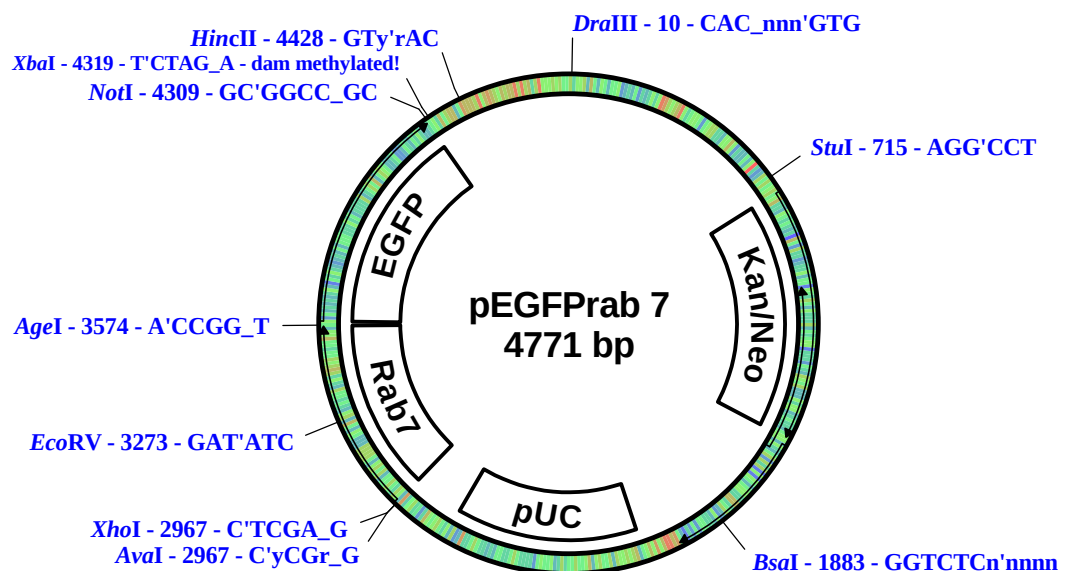
Carte du plasmide pGEM-4Z/sig-MART1-LAMP1/A64



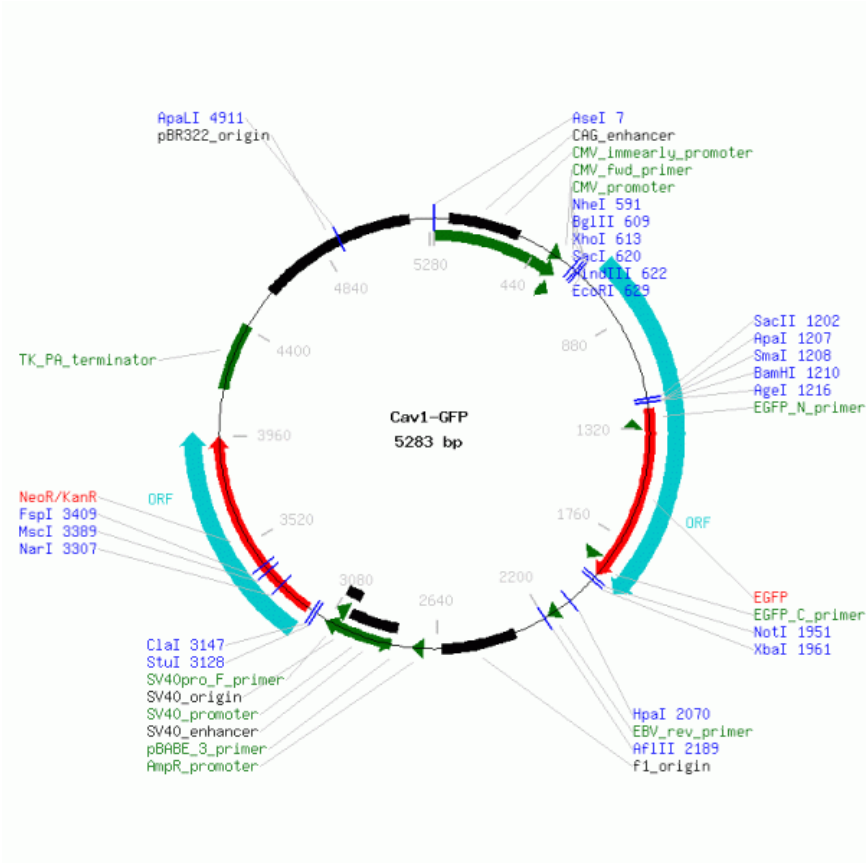
Annexe 5 : Carte du plasmide pEGFP-Rab5



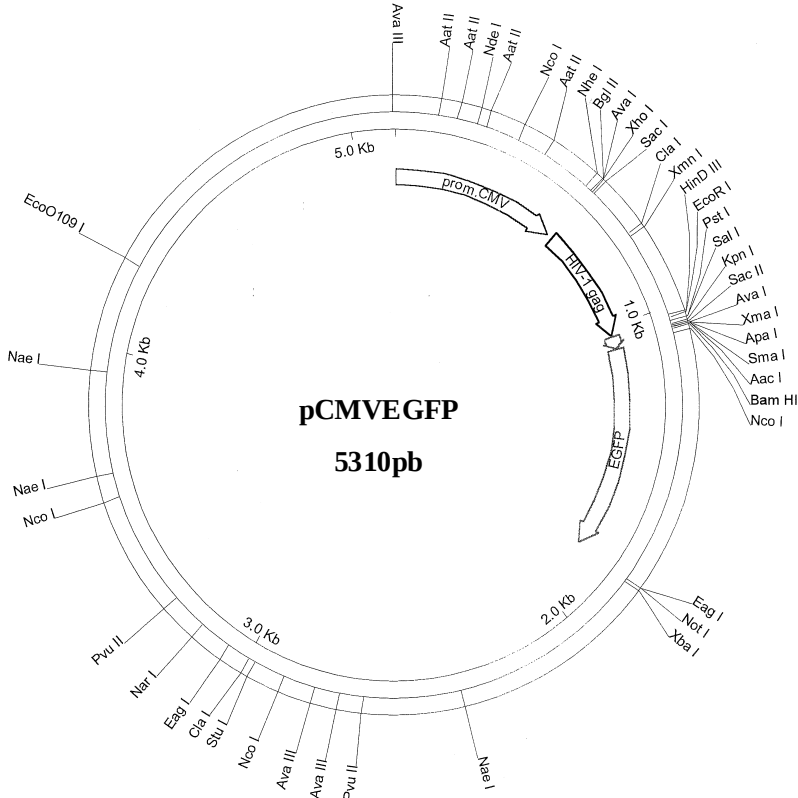
Annexe 6 : Carte du plasmide pEGFP-Rab7



Annexe 7 : Carte du plasmide pCav-1-GFP



Annexe 8 : Carte du plasmide pCMVEGFP



Federico PERCHE

Transfert d'ARNm par des lipopolyplexes et vaccination anti-mélanome : Ciblage des cellules dendritiques avec des lipopolyplexes mannosylés

Résumé :

Précédemment, il a été démontré au laboratoire qu'une vaccination des souris avec des lipopolyplexes (LPR) contenant l'ARNm de l'antigène de mélanome MART1 permet d'induire la formation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques et de retarder le développement de mélanomes B16F10 et de métastases pulmonaires. Les LPR sont des complexes ternaires constitués d'ARNm, d'un polymère cationique histidylé et de liposomes cationiques histidylés. L'objectif de ma thèse était d'améliorer cette vaccination anti-tumorale en développant de nouveaux liposomes capables de cibler les cellules dendritiques (DC). Le ciblage a été réalisé en incorporant un glycolipide mannosylé aux liposomes afin de favoriser leur reconnaissance par le récepteur mannose. A partir de ces liposomes, des formulations de complexes ternaires à base d'ADN (LPD mannosylés ou Man₁₁-LPD100) ou à base d'ARN (LPR mannosylés ou Man₁₁-LPR100) ont été mis au point. Les résultats montrent que : *in vitro* les formulations Man₁₁-LPD100 sont mieux internalisées et transfectent plus efficacement les DC que les LPD100 non mannosylés. Les formulations Man₁₁-LPR100 transfectent avec une plus grande efficacité les DC par rapport aux Man₁₁-LPD100. Par ailleurs, une forte réduction de la toxicité des formulations a été obtenue en dialysant les liposomes. Il est également possible de conserver les formulations sous forme déshydratée. Une imagerie par scintigraphie effectuée chez la souris a permis de constater que 9% des LPD sont captés dans la rate après une injection IV. Nous avons mis en évidence après un isolement de DC spléniques que les formulations Man₁₁-LPR100 transfectent 4 fois plus de DC que les LPR non mannosylés. Enfin, l'immunisation des souris avec Man₁₁-LPR100 contenant l'ARNm MART1 permet une vaccination plus efficace contre la tumeur B16F10 et une meilleure survie. En conclusion, les LPR Man₁₁-LPD100 sont de bons vecteurs pour cibler et transfecter les DC spléniques avec l'ARNm d'un antigène tumoral et pour induire la réponse immune contre les cellules tumorales.

Mots clés : Vaccination anti-mélanome, cellules dendritiques, polymères cationiques, liposomes, ARNm, MART-1, lipopolyplexes

mRNA transfer with lipopolyplexes and anti-melanoma vaccination : Dendritic cells targeting with mannosylated lipopolyplexes

Summary:

Previously, it has been demonstrated that mice vaccination with lipopolyplexes (LPR) containing melanoma antigen MART1 mRNA can induce the generation of specific cytotoxic T cells and delay B16F10 melanoma growth and lung metastases. LPR are ternary complexes consisting of mRNA, a histidylated cationic polymer and histidylated cationic liposomes. The objective of my thesis was to enhance this antitumor vaccination through the development of new liposomes that can target specifically dendritic cells (DC). The targeting of DC was achieved by incorporating a mannosylated glycolipid within liposomes to enhance their recognition by the mannose receptor. From these liposomes, formulations based ternary complexes of DNA (mannosylated-LPD or Man₁₁-LPD100) or formulations based on mRNA (mannosylated LPR or Man₁₁-LPR100) were developed. The results show that formulations made with Man₁₁-LPD100 are better internalized and transfect efficiently DC than LPD100. Man₁₁-LPR100 transfect with greater efficiency DC compared to DNA based formulation (Man₁₁-LPD100). Furthermore, a strong reduction of the toxicity of LPD was obtained by liposomes dialysis. It is also possible to preserve their activity by freeze-drying. Mice scintigraphy revealed that 9% of LPD are captured in the spleen following IV injection. We demonstrated after isolation of splenic DC that Man₁₁-LPR100 transfect DC 4 times more than LPR100. Finally, immunization of mice with Man₁₁-LPR100 containing mRNA MART1 allows a more effective vaccination against B16F10 tumor and a better mice survival than non-mannosylated ones.

In conclusion, Man₁₁-LPR100 are promising vectors to target and transfect splenic DC with a tumor antigen mRNA aiming to an induction of an immune response against tumor cells.

Keywords: Vaccination against melanoma, dendritic cells, cationic polymers, liposomes, mRNA, MART-1, lipopolyplexes



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02

