



# **Développement et caractérisation de la gésification comme méthode de livraison d'acides nucléiques dans les cellules de mammifères**

**Thèse**

**Mathias Mangion**

**Doctorat en génie chimique**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Mathias Mangion, 2020

**Développement et caractérisation de la gésifaction  
comme méthode de livraison d'acides nucléiques dans  
les cellules de mammifères**

**Thèse**

**Mathias Mangion**

Sous la direction de :

Bruno Gaillet, directeur de recherche

# Résumé

La livraison d'acides nucléiques a révolutionné la recherche biomédicale depuis des décennies. Il existe de nombreuses manières de livrer des acides nucléiques dans des cellules de mammifères. Chaque méthode possède ses avantages et ses inconvénients. Parmi elles, celles dites hybrides, représentent une alternative très intéressante puisqu'elles résultent de la combinaison de méthodes de livraison traditionnelles pour en obtenir une nouvelle aux propriétés améliorées. Cette thèse se consacre à l'étude d'une de ces méthodes de livraison hybride appelée gésiffection. Cette dernière consiste à combiner des nanovésicules biologiques appelées « gésicules » avec un agent chimique nommé bromure d'hexadiméthrine pour livrer des acides nucléiques dans des cellules de mammifères. Bien que cette méthode ait fait l'objet de peu de recherches, les résultats publiés jusqu'à présent apparaissent suffisamment intéressants pour poursuivre son développement et sa caractérisation. Cette thèse est divisée en quatre chapitres. Le chapitre 1, est dédié à la revue de la littérature. Il présente un tour d'horizon des méthodes de livraison d'acides nucléiques, puis une présentation des mécanismes impliqués dans la pénétration cellulaire, et enfin, un état des lieux concernant les travaux sur les gésicules. Les chapitres 2, 3 et 4, présentent les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Le chapitre 2 est consacré au développement d'une méthode optimisée pour produire et utiliser les gésicules pour la livraison d'acides nucléiques. Les gésicules se sont révélées être des particules très résistantes puisque leur capacité de livraison a été maintenue après plusieurs semaines de conservation à différentes températures, ainsi qu'après plusieurs cycles de congélation-décongélation. Par ailleurs, les expériences de gésiffection ont démontré la capacité de cette méthode à livrer de l'ADN dans des cellules primaires (connues pour être réfractaires) mais également des acides ribonucléiques (ARN) et des plasmides de grandes tailles. Le chapitre 3 est consacré à des expériences de caractérisation des gésicules au niveau morphologique et de leur contenu protéique. Les gésicules ont été visualisées par microscopie électronique avec la confirmation de la présence de la protéine VSV-G à leur membrane. Enfin, une analyse par spectrométrie de masse a permis de fournir la première description du contenu protéique des gésicules. Cela a permis de faire apparaître toute la complexité de ces nanovésicules. Le dernier chapitre de cette thèse (chapitre 4) est dédié à l'identification des mécanismes de pénétration et de transport cellulaire impliqués dans la gésiffection. Tout d'abord, une série d'expériences préliminaires a permis d'établir des conditions expérimentales garantissant la fiabilité des résultats (efficacité des lavages, efficacité et innocuité des inhibiteurs métaboliques). Les résultats ont démontré que les complexes de gésiffection pénètrent dans les cellules

HeLa par macropinocytose et endocytose dépendante des clathrines. Leur parcours intracellulaire jusqu'au noyau de la cellule implique quant à lui, les dynéines et les microtubules. En conclusion, cette thèse contribue significativement au développement de la méthode de gésification en décrivant un procédé de production et d'utilisation efficaces, et en apportant une meilleure compréhension de la composition et du fonctionnement des gésicules pour livrer des acides nucléiques.

# Abstract

The delivery of nucleic acids has revolutionized the biomedical field for decades, for research as well as for therapeutic applications. There are many nucleic acids delivery methods for mammalian cells. Each has its advantages and disadvantages. Hybrid methods represent a very interesting alternative for the delivery of nucleic acids since it consists in combining elements of existing vectors to develop more efficient new ones. This thesis is devoted to the study of one of these hybrid delivery methods called gesifection. Gesifection involves virus-like particles, pseudotyped with the VSV glycoprotein, able to deliver nucleic acids when combined with a chemical agent named polybrene. Even though the gesifection's efficiency has been stated in only a few publications, the results were interesting enough for us to investigate the depth of its potential. This thesis is divided into 4 main parts. The chapter 1 is dedicated to a review of the literature and presents the main methods of nucleic acid delivery, followed by a presentation of the mechanisms involved in cell penetration and finally, an inventory of the gesicles and their uses. The chapter 2 of this thesis presents the work that allowed us to optimize the production of gesicles, to determine the best way to use them, to demonstrate their great robustness as well as their capacity to transfect primary cells, large plasmids and also interfering RNAs. The chapter 3 is dedicated to the characterization of gesicles. We have highlighted the formation of gesifection complexes, successfully carried out the purification of gesicles efficient for nucleic acid delivery, visualized the gesicles with their membrane composed of VSV-G proteins and finally, provides the first description of their protein content, showing all the complexity of these particles. Finally, the chapter 4 studies the mechanisms of penetration and cell transport involved during the gesifection. Our results revealed for the first time, that the gesifection complexes enter in HeLa cells by macropinocytosis and clathrin-dependent endocytosis. Furthermore, their intracellular course involves dyneins and microtubules. All of the results presented in this thesis provide a better understanding of gesifection for future developments.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements.....	xiii
Avant-propos .....	xvi
Introduction .....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature .....	4
1.1 Technologies de transfert des acides nucléiques .....	4
1.1.1 Méthodes physiques .....	4
1.1.1.1 Électroporation .....	5
1.1.1.2 Canon à particules .....	6
1.1.1.3 Micro-injection.....	6
1.1.1.4 Magnétofection .....	7
1.1.1.5 Sonoporation.....	7
1.1.1.6 Phototransfection .....	8
1.1.2 Vecteurs viraux .....	8
1.1.3 Agents chimiques et biochimiques.....	11
1.1.3.1 Précipitation au phosphate de calcium.....	11
1.1.3.2 Polymères cationiques .....	12
1.1.3.3 Lipides cationiques.....	13
1.1.3.4 Peptides de pénétration .....	14
1.1.4 Vecteurs hybrides .....	15
1.1.4.1 Hybrides d'origine virale.....	15
1.1.4.2 Hybrides d'origine non virale.....	17
1.2 Voies cellulaires pour le transport de biomolécules .....	18
1.2.1 Mécanismes naturels du transport membranaire .....	19
1.2.1.1 Membranes cellulaires .....	19
1.2.1.2 Bases du transport cellulaire.....	20
1.2.1.3 Voies d'endocytose .....	21
1.2.1.3.1 Phagocytose .....	22
1.2.1.3.2 Pinocytose .....	23
1.2.1.3.2.1 Endocytose dépendante des clathrines .....	23
1.2.1.3.2.2 Endocytose dépendante des cavéoles.....	24
1.2.1.3.2.3 Macropinocytose .....	25
1.2.1.3.2.4 Voies de pinocytoses alternatives .....	26
1.2.1.4 Facteurs déterminants les voies d'endocytoses utilisées .....	27
1.2.1.4.1 Taille .....	27
1.2.1.4.2 Charges de surface.....	27
1.2.1.4.3 Hydrophobicité de surface .....	27
1.2.1.4.4 Forme.....	28
1.2.1.4.5 Type cellulaire.....	28

1.2.2 Mécanismes du transport intracellulaire.....	28
1.2.2.1 Mécanismes de fuite des endosomes.....	28
1.2.2.1.1 Mécanismes viraux.....	29
1.2.2.1.2 Mécanisme des polymères cationiques.....	30
1.2.2.1.3 Mécanisme des lipides cationiques.....	31
1.2.3.2 Transport cytoplasmique de l'ADN.....	32
1.2.3.3 Passage de la membrane nucléaire.....	33
1.3 Gésicules.....	33
1.3.1 Virus de la stomatite vésiculaire.....	33
1.3.1.1 Structure du VSV-G.....	35
1.3.1.2 Tropisme et pseudotypage.....	36
1.3.1.3 Mécanisme de fusion membranaire.....	37
1.3.2 Capacités de livraison des gésicules.....	38
1.4 Conclusion de la revue de littérature.....	40
1.5 Objectifs de la thèse.....	41
Chapitre 2 : Production and use of gesicles for nucleic acid delivery.....	43
2.1 Résumé.....	44
2.2 Abstract.....	45
2.3 Introduction.....	46
2.4 Materials and methods.....	47
2.4.1 Construction of plasmids used in this study.....	47
2.4.2 Cell culture.....	48
2.4.3 PEI transfection.....	48
2.4.4 Harvest and concentration of gesicles.....	48
2.4.5 Western blot analysis.....	49
2.4.6 DNA delivery cell assay using gesicles.....	49
2.4.7 siRNA-gesicle delivery assay.....	49
2.4.8 GFP analysis by flow cytometry.....	50
2.4.9 Cell Viability assay.....	50
2.4.10 Statistical analysis.....	50
2.5 Results.....	50
2.5.1 Optimization of HEK293 cell transfection with PEI.....	50
2.5.2 Optimization of gesicle production.....	51
2.5.3 Gesicle transfection properties.....	53
2.5.4 Identification of optimal conditions for cell transfection using gesicles.....	55
2.5.6 Storage temperature and gesifection efficacy.....	57
2.5.7 Gesicle-based transfection of different cell types and effects of plasmid size on cell transfection.....	58
2.5.8 siRNA delivery using gesicles.....	60
2.6 Discussion and conclusion.....	61
2.7 Acknowledgments.....	63
2.8 References.....	64
Chapitre 3 : Caractérisation des gésicules.....	69
3.1 Introduction.....	69
3.2 Matériel et méthodes.....	69
3.2.1 Retard sur gel.....	69
3.2.2 Purification par gradient d'iodixanol.....	69

3.2.3 Immunobuvardage de type dot blot et western blot.....	70
3.2.4 Microscopie électronique à transmission .....	70
3.2.5 Diffusion dynamique de la lumière .....	71
3.2.6 Analyse protéomique .....	71
3.3 Résultats et discussion .....	72
3.3.1 Mise en évidence des complexes de gésifection .....	72
3.3.2 Purification analytique des gésicules .....	75
3.3.3 Analyse morphologique.....	77
3.3.4 Analyse de la composition protéique.....	80
3.4 Conclusion .....	82
Chapitre 4 : Analyse des mécanismes de la gésifection .....	84
4.1 Introduction .....	84
4.2 Matériel et méthodes .....	84
4.2.1 Construction des plasmides utilisés dans cette étude .....	84
4.2.2 Culture cellulaire .....	84
4.2.3 Préparation des gésicules.....	85
4.2.4 Livraison de plasmides par gésifection .....	85
4.2.5 Détection de la GFP et du Cy5 dans les cellules par cytométrie de flux .....	85
4.2.6 Évaluation de la toxicité cellulaire des inhibiteurs métaboliques de l'endocytose et du transport intracellulaire.....	86
4.2.7 Analyse des voies de pénétration et de transport intracellulaire à l'aide d'inhibiteurs métaboliques.....	86
4.2.8 Analyses statistiques.....	87
4.3 Résultats et discussion .....	88
4.3.1 Efficacité de la solution de lavage.....	88
4.3.2 Implication du bromure d'hexadiméthrine et des gésicules dans le processus de gésifection.....	92
4.3.3 Cinétique de pénétration et d'expression de l'ADN par gésifection.....	96
4.3.4 Implication des mécanismes d'endocytose ou fusogénique.....	100
4.3.5 Concentration et cytotoxicité des inhibiteurs métaboliques pour étudier l'endocytose et le transport intracellulaire.....	101
4.3.6 Étude des mécanismes d'endocytose et intracellulaires .....	104
4.3.6.1 Effet de l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines .....	104
4.3.6.2 Effet de l'inhibition de la macropinocytose .....	105
4.3.6.3 Effet de l'inhibition de l'endocytose dépendante des cavéolines.....	107
4.3.6.4 Effet combiné de l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines et de la macropinocytose.....	108
4.3.6.5 Rôle des microtubules et des dynéines dans le transport intracellulaire .....	109
4.4 Conclusion .....	114
Conclusion de la thèse.....	115
Perspectives .....	118
Bibliographie .....	122
Annexes.....	158



## Liste des figures

Figure 1 : Classification des principales méthodes de livraison de gènes.....	4
Figure 2 : Principales étapes d'un processus de livraison d'acides nucléiques en cellules de mammifères .....	19
Figure 3 : Membrane des cellules eucaryotes.....	20
Figure 4 : Étapes simplifiées de l'endocytose .....	21
Figure 5 : Voies d'internalisation de biomolécules en cellules de mammifères.....	22
Figure 6 : Mécanismes de fuite des endosomes des virus.....	30
Figure 7 : Mécanisme : effet éponge à protons.....	31
Figure 8 : Mécanisme 'flip flop' suggéré .....	32
Figure 9 : Structure du VSV et organisation de son génome .....	34
Figure 10 : Cycle de vie du VSV .....	35
Figure 11 : Structure de la partie extracellulaire de la protéine VSV-G (trimère) .....	36
Figure 12 : Changement de conformation du VSV-G lors de la fusion membranaire.....	38
Figure 13 : Optimization of parameters for gesicle production .....	52
Figure 14 : DNA delivery in HEK293 cells using gesicles .....	54
Figure 15 : Identification of optimal conditions for cell transfection using gesicles .....	56
Figure 16 : Effect of storage conditions and freeze/thaw cycles on gesicle bioactivity.....	58
Figure 17 : Gesicle-based transfection of different cell types and effects of plasmid size on cell transfection .....	59
Figure 18 : siRNA-gesicles mediated gene interference .....	61
Figure 19 : Mise en évidence de la formation des complexes de gésifaction par gel retard .....	74
Figure 20 : Analyse par immunobuvardage des fractions issues de la purification par gradient d'iodixanol.....	76
Figure 21 : Quantification par densitométrie des signaux obtenus par immunobuvardage de type dot blot et efficacité de transfection des fractions recueillies à l'issue du gradient d'iodixanol .....	77
Figure 22 : Détermination de la morphologie des gésicules et de la présence de la protéine VSV-G .....	78
Figure 23 : Analyse des gésicules par DLS .....	79
Figure 24 : Analyse protéomique de la composition des gésicules purifiées .....	81
Figure 25 : Efficacité de différentes solutions de lavage pour éliminer les complexes de gésifaction liés à la surface des cellules .....	90
Figure 26 : Effet cytotoxique des solutions de lavage .....	91
Figure 27 : Présence de complexes liés à la surface des cellules après lavage avec la solution B... ..	92
Figure 28 : Profil de pénétration cellulaire de l'ADN selon la composition des complexes de transfection .....	95
Figure 29 : Profil d'expression selon la composition des complexes de transfection .....	96
Figure 30 : Cinétique de pénétration des complexes composés d'un plasmide marqué au Cy5 .....	98
Figure 31 : Cinétique de pénétration des complexes composés d'un plasmide codant pour la GFP. ..	99
Figure 32 : Effet de la baisse de température sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa .....	101
Figure 33 : Toxicité des inhibiteurs de voies métaboliques sur des cellules HeLa .....	103
Figure 34 : Effet de la chlorpromazine sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa .....	105
Figure 35 : Effet de l'amiloride sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa .....	106
Figure 36 : Effet du nystatin sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa .....	107
Figure 37 : Effet combiné de la chlorpromazine (CPZ) et de l'amiloride (EIPA) en cellules HeLa ...	109
Figure 38 : Effet du nocodazole sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa .....	110

Figure 39 : Effet du ciliobrévin sur l'efficacité de gésifecton en cellules HeLa..... 111

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux vecteurs viraux pour la livraison d'acides nucléiques. ...	10
Tableau 2 : Exemples de vecteurs viraux hybrides couplés à des nanomatériaux testés in vitro et in vivo. ....	17
Tableau 3 : Inhibiteurs métaboliques, mécanismes d'actions et concentrations. ....	87
Tableau 4 : Composition des solutions de lavage testées. ....	89
Tableau 5 : Voies d'endocytose empruntées par les gésicules et des systèmes de livraison similaires. ....	113

## Liste des abréviations

**AAV** : Adeno-Associated Virus (virus adéno-associé)  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AdV** : Adénovirus  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**CHO** : Chinese hamster ovary (cellules ovariennes de hamster chinois)  
**CMV** : Cytomegalovirus  
**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)  
**kDa** : kilo Dalton  
**DLS** : Dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**EBV** : Virus Epstein Barr  
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique (ethylenediaminetetra acetic acid)  
**FBS** : Fetal bovin serum (sérum bovin foetal)  
**FDA** : Food and Drug Administration (agence de santé américaine)  
**GFP** : Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)  
**HEK293** : Human Embryonic Kidney (cellules embryonnaires de rein humain)  
**LV** : Lentivirus  
**PAGE** : Électrophorèse en gel de polyacrylamide (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)  
**PBS** : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate)  
**PEI** : Polyéthylèneimine  
**RV** : Rétrovirus  
**SFV** : Semliki forest virus  
**siRNA** : Small interfering RNA (petit ARN interférent)  
**SV40** : Virus simien 40  
**VIH-1** : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1  
**VSV** : Vesicular stomatitis virus (virus de la stomatite vésiculaire)  
**VSV-G** : Vesicular stomatitis virus glycoprotein (glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire)

*< À ma tante, Mireille. Tu nous manques! >*

# Remerciements

J'ai commencé à travailler dans le domaine de la production de protéines recombinantes et de vecteurs viraux depuis déjà quelques années et l'accomplissement de cette thèse constitue une étape très importante de ma vie. J'ai eu l'opportunité de travailler sur de nombreux projets tels que la gésification (présenté dans cette thèse), l'optimisation de la production de virus associés à l'adénovirus (AAV) en cellules BMAd, l'optimisation de la production transitoire de protéines recombinantes en cellules HEK293 et CHO et enfin l'évaluation d'un vaccin contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) basé sur l'utilisation du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) produit en cellules Vero. J'en sors enrichi par des connaissances et des compétences pointues dans le domaine de la bioproduction et avec de nombreux objectifs professionnels dont celui de créer une entreprise de biotechnologie.

Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui ont contribué à mon épanouissement personnel et professionnel.

Tout d'abord, merci à mon directeur de thèse, **Bruno Gaillet**, pour sa confiance, ses précieux conseils et les différentes opportunités de projets. Bruno m'a permis de réaliser ma thèse avec beaucoup d'autonomie ce qui m'a permis d'apprendre à mieux me connaître professionnellement pour en ressortir plus efficace. Je tiens également à remercier Bruno pour son soutien dans mon projet d'entreprise et j'espère que cela est le début d'une série de collaborations pour développer des produits innovants.

Je voudrais également remercier **Rénauld Gilbert ainsi que toute l'équipe du CNRC** pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs bons conseils qui ont contribué à l'approfondissement de mes connaissances et à faciliter le bon déroulement de mes travaux de recherche.

Je tiens également à remercier **Alain Garnier**, pour sa confiance en me proposant le contrat de production de Maria Fernandes. Cette expérience a définitivement contribué à me faire réaliser ma passion pour l'entrepreneuriat.

Un grand merci à **Ann Bourrassa, France Cayouette et Nadia Dumontier** pour la qualité leur travail, leur rigueur, leur disponibilité et leur gentillesse. Sans vous, le département ne fonctionnerait pas aussi bien.

Merci beaucoup à **Marc Lavoie, Jérôme Noel, Yann Giroux et Jean-Nicolas Ouellet** pour leur disponibilité et leurs astuces pour résoudre tous nos petits et grands problèmes techniques.

Je tiens également à remercier le **CRSNG, PROTEO et ThéCell** pour les bourses doctorales qui m'ont été attribuées. Je tiens à nouveau les réseaux **Thécell et PROTEO** pour les bourses de déplacement à des congrès internationaux. Sans ces soutiens, mon expérience au doctorat n'aurait pas été aussi positives.

Merci également à **Julie-Christine Levesque** pour son aide et son expertise qui m'ont permis d'obtenir de belles images de mes gésicules par microscopie électronique.

Je remercie tous mes collègues du génie chimique pour les discussions enrichissantes, le soutien mutuel et les bons moments en votre compagnie (**Juliette Champeil, Adéline Paris, Alexandre Audy, Igor Slivac, Julien Lauzon, Pierre-Marc Juneau, Thierry Vincent, Jean-Pascal Lepetit-Stoffaes, Anahita Bakhshi Zadeh Gashti, Barbara Valeria Mejia Bohorquez, Kiswendsida Habib Gael Koanda...**)

Mes remerciements à **Maria Fernandez** de m'avoir fait confiance pour produire et purifier ses différentes protéines. Cela a contribué à mon développement entrepreneurial et je suis heureux de compter parmi mon réseau une chercheuse passionnée, à l'écoute et ayant des valeurs humaines exceptionnelles. J'espère que nous aurons de nombreuses occasions de collaborer dans le futur.

Merci également à toute l'équipe d'**Entrepreneuriat Laval (Louis Provencher, Marc Purcell, Manon Lortie, Sandra Cinq-Mars et Simon Chouinard)** pour leur confiance, leurs conseils, leur bonne humeur, leur dynamisme constant et leur professionnalisme. Tout ce que vous faites pour Juliette et moi, nous permet d'avancer en surmontant les embûches de l'entrepreneuriat pour conduire notre entreprise vers le succès.

Je remercie également mes parents de leur soutien ainsi que pour l'envoi régulier de colis de fromages et de Zan tout au long de ma thèse ! Votre force et votre résilience face aux difficultés de la vie m'inspirent pour poursuivre mon chemin.

Je remercie **Lucie Charrier**, ma meilleure amie depuis plus de 17 ans, rencontrée lors de notre formation pour devenir technicien de laboratoire dans une petite ville du sud-ouest de la France. Nous

sommes toujours restés en contact et la vie nous a réunis par hasard à Québec pour notre doctorat. Ainsi, on a pu se soutenir dans les moments difficiles mais aussi et surtout bien rigoler et profiter à de nombreuses reprises des concerts de la Grande Lynda et de grandes bouffes!

Enfin, je tiens à remercier **Juliette Champeil** de faire partie de ma vie professionnelle et personnelle. Merci pour ta patience, ta gentillesse et ton ouverture d'esprit. Nos discussions quasi quotidiennes sur nos projets respectifs et communs m'ont considérablement aidé pour avancer dans ma thèse et dans la vie. Ta résilience dans les épreuves est aussi une inspiration pour moi. Je suis extrêmement chanceux de t'avoir rencontrée ! 사랑해요



## Avant-propos

Le sujet principal de mon doctorat, présenté dans cette thèse, a donné lieu à une publication intitulée « *Production and use of vesicles for nucleic acid delivery* ». Cet article a été soumis le 24 octobre 2020 dans le journal « *Molecular Biotechnology* » et a été inséré au chapitre 2 de cette thèse. Cet article ne contient pas de modification entre la version intégrée et sa version publiée, en dehors de la numérotation des figures et des tableaux pour que ceux-ci s'intègrent dans la continuité du mémoire. Dans cet article, mon statut est premier auteur principal. J'ai élaboré les stratégies expérimentales, préparé et réalisé le travail technique, analysé et rédigé l'article. Marc-André Robert, Igor Slivac, Rénaud Gilbert et Bruno Gaillet ont contribué à la rédaction de l'article en apportant des révisions. Par ailleurs, les résultats présentés au chapitre 3 et 4 pourront donner lieu à des publications supplémentaires.

Au cours de mon doctorat, j'ai également eu l'opportunité de participer à l'écriture de deux revues de littérature. La première s'intitule « *New developments in lentiviral vector design, production and purification* » et a été publiée le 16 avril 2013 dans le journal « *Expert Opinion on Biological Therapy* » (annexe A). Mon statut est co-premier auteur. Mon travail s'est focalisé sur la partie liée à la production des lentivirus pour laquelle j'ai élaboré le plan de rédaction, rassemblé et synthétisé les informations pertinentes de la littérature. Mercedes Segura, également co-première auteure, a rédigé la deuxième partie de cette revue. Alain Garnier et Bruno Gaillet ont contribué à la rédaction en apportant des révisions. La deuxième revue, publiée en 2016 dans le journal « *Expert Opinion on Biological Therapy* », s'intitule « *Non-viral nucleic acid delivery methods* » et est disponible à l'annexe B. Mon statut est deuxième auteur. En collaboration avec Juliette Champeil, ma contribution a consisté à effectuer une revue de littérature en vue d'élaborer, sous forme de tableau, l'état des lieux des essais cliniques. Dans cette revue Igor Slivac (premier auteur) a réalisé la rédaction. Bruno Gaillet et David Guay ont contribué à la rédaction en apportant des révisions. L'écriture de ces deux revues a été très pertinente pour mon doctorat puisqu'elle m'a permis d'étoffer mes connaissances sur les lentivirus et sur les méthodes non-virales de livraison d'acides nucléiques en cellules de mammifères.

Au cours de mon doctorat, j'ai également eu l'opportunité d'être impliqué dans d'autres projets complémentaires à mon sujet de thèse. L'un d'entre eux était un projet de développement d'un vaccin contre le VIH. Ce vaccin est un virus de type VSV, recombinant et répliatif exposant à sa surface un antigène du VIH. Ma participation a consisté à élaborer et à réaliser les stratégies expérimentales pour

optimiser les rendements de production du virus-vaccin, en vue de leur évaluation en tests précliniques. Le travail réalisé dans ce projet a donné lieu à une publication dont je suis co-premier auteur. Cet article est intitulé : « *Evaluation of novel HIV vaccine candidates using recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vector produced in serum-free Vero Cell Culture* » et a été accepté le 17 octobre 2020 et publié dans le journal « *Vaccine* » (annexe C). Dans cet article, Jean-François Gélinas (co-premier auteur) a participé à la rédaction de l'article. Anahita Bakhshi Zadeh Gashti avait la charge de la purification. Hiva Azizi a réalisé les tests de vaccination sur les animaux. Sascha Kiesslich a mis en forme l'article. Nasha Nassoury et Parminder S Chahal ont contribué à déterminer les bons paramètres de purification. Enfin, Gary Kobinger, Rénaud Gilbert, Alain Garnier, Bruno Gaillet, Amine A. Kamen sont intervenus en tant que superviseurs et notamment pour les révisions de l'article.

Enfin, mon doctorat m'a permis de participer à trois conférences internationales et plusieurs autres conférences locales pour présenter mes travaux à la communauté scientifique et élargir mon réseau.

En conclusion, mon expérience au doctorat m'a permis d'acquérir des connaissances et compétences qui vont au-delà du sujet de ma thèse, ce qui sera un atout pour le développement de ma carrière professionnelle.

# Introduction

La livraison d'acides nucléiques dans les cellules de mammifères est une technique fondamentale pour étudier la régulation et la fonction des gènes (Takahashi et al. 2007), mais également pour produire des protéines recombinantes (Wurm 2004) ou encore pour réaliser des traitements de thérapie génique et cellulaire (Pfeifer et Verma 2001; Ramezani et Hawley 2002). En fonction de la nature des acides nucléiques et de la méthode de livraison utilisée, le matériel génétique introduit dans les cellules peut exister de manière stable ou transitoire. La transfection stable est définie par l'intégration d'un ADN étranger dans le génome cellulaire ou par la maintenance d'un plasmide sous forme d'épisome. La transfection stable permet donc de maintenir sur plusieurs générations cellulaires l'expression d'un ADN exogène dans une cellule hôte. Cette méthode est particulièrement appropriée pour la production de protéines recombinantes à l'échelle industrielle, pour l'analyse des effets *in vivo* à long terme de l'expression d'un gène spécifique ainsi que pour le traitement de maladies génétiques. À l'inverse, la transfection transitoire désigne l'introduction temporaire d'acides nucléiques (ADN ou ARN) dans des cellules, sans intégration dans le génome (T. K. Kim et Eberwine 2010). Les acides nucléiques livrés de manière transitoire finissent par disparaître des cellules hôtes par l'action de nucléases et par effet de dilution à la suite des divisions cellulaires successives (S. Subramanian et Srienc 1996). La transfection transitoire d'ARN et d'ADN trouve de nombreuses applications dans le domaine de la recherche et du développement clinique mais également dans le domaine thérapeutique. En effet, l'expression à court terme d'acides nucléiques peut être utilisé pour étudier des mécanismes cellulaires *in vitro* (Dransfeld et al. 2010), pour la production de protéines recombinantes destinées à des études analytiques et précliniques (Pham, Kamen, et Durocher 2006), pour la production de vecteurs viraux (Wright 2009), pour la thérapie cellulaire *ex vivo* de cellules-souches (Haider et al. 2008) et pour la vaccination (Jackson et al. 2020). De manière générale, l'ensemble des méthodes destinées à livrer des acides nucléiques dans des cellules de mammifères doivent franchir une série de barrières extracellulaires et intracellulaires (Sanders et al. 2009). En effet, les acides nucléiques non protégés peuvent être dégradés par des endonucléases présents dans le milieu extracellulaire (Kawabata, Takakura, et Hashida 1995). Par ailleurs, les acides nucléiques sont incapables de traverser la membrane plasmique en raison de propriétés biochimiques similaires (hydrophile et charges négatives) qui entraînent un phénomène de répulsion (Khalil et al. 2006; Liang et Lam 2012). Pour livrer efficacement des acides nucléiques, une méthode de livraison doit être capable d'accomplir plusieurs fonctions : 1 - former un complexe ou condenser les acides nucléiques 2 - protéger les acides

nucléiques de la dégradation enzymatique, 3 - favoriser la pénétration cellulaire, 4 - libérer les acides nucléiques dans le cytoplasme, 5 - favoriser l'entrée dans le noyau (pour la livraison d'ADN) (Mb et al. 1999). Enfin, la méthode de livraison idéale devrait être non toxique, biodégradable et non immunogène (pour les applications *in vivo*).

Le marché global des produits de transfection est estimé à plus de 1 milliard de dollars américains en 2021 avec un taux de croissance de 7,5% par année (MarketsandMarkets 2017). D'après les données mises à jour en 2019, on pouvait compter 3 025 essais cliniques de thérapie génique en cours. Malgré le potentiel de la thérapie génique, ces essais représentent moins de 1% des études cliniques réalisées à travers le monde (« ClinicalTrials.Gov » 2019). L'une des principales raisons pour laquelle il y a encore un nombre limité d'études cliniques de thérapie génique est le manque de méthodes adaptées et sécuritaires pour livrer le matériel génétique dans les cellules cibles (Jayant et al. 2016). Les principales maladies concernées sont les cancers (66,6%), les maladies monogéniques (11,9%), les maladies infectieuses (6,1%) et les maladies cardiovasculaires (6,1%) (Edelstein 2019a).

Les méthodes de livraison d'acides nucléiques peuvent être classées en deux catégories : les méthodes virales, (transduction) et les méthodes non virales (transfection). Les méthodes virales présentent l'avantage d'être plus efficaces que les méthodes non virales pour livrer des acides nucléiques dans des cellules. Néanmoins, l'utilisation de vecteurs viraux possède certains inconvénients tels que le coût et la complexité de leur production ainsi que les potentiels risques sécuritaires qui leurs sont associés. Malgré ces inconvénients, ces derniers sont utilisés dans près de 70% des essais cliniques de thérapie génique en raison de leur efficacité, alors que les méthodes non virales telles que l'injection d'ADN nu et la lipofection représentent, 15% et 4%, respectivement (Edelstein 2019b). Les méthodes de livraison non virales sont très populaires en recherche fondamentale en raison de leur facilité et de leur sécurité d'utilisation. Néanmoins, elles manquent encore d'efficacité sur de nombreuses lignées cellulaires et cellules primaires couramment utilisées (Maurisse et al. 2010; Yates et Daley 2006; Zhao et al. 2012). Par conséquent, il est primordial de développer de nouvelles technologies de livraison d'acides nucléiques plus efficaces, plus sécuritaires, faciles à utiliser et moins cytotoxiques, pour faciliter les découvertes en recherche biomédicale et le développement de nouveaux traitements.

L'objectif général de cette thèse est d'apporter des informations nouvelles concernant le développement et la caractérisation d'une méthode prometteuse de livraison d'acides nucléiques qui

utilise des nanovésicules cellulaires appelées gésicules. Les résultats obtenus permettront d'une part, de produire et d'utiliser plus efficacement ces gésicules et d'autre part, de guider les futures optimisations grâce aux connaissances apportées sur leur composition et leurs mécanismes de pénétration cellulaire.

# Chapitre 1 : Revue de la littérature

## 1.1 Technologies de transfert des acides nucléiques

Il existe plusieurs méthodes pour livrer des acides nucléiques dans les cellules de mammifères. Le choix d'une méthode est multifactoriel : type cellulaire, taille du gène, coût, expertise, application *in vivo* ou *in vitro*, etc. La méthode idéale doit permettre de livrer des acides nucléiques dans toutes les cellules cibles, avec une faible cytotoxicité, un effet minimum sur la physiologie cellulaire et être facile à utiliser et à reproduire. Les différentes méthodes de livraison peuvent être divisées en deux grandes catégories : virales et non virales, dont la dernière peut à son tour être divisée en méthodes chimiques et physiques (Figure 1).

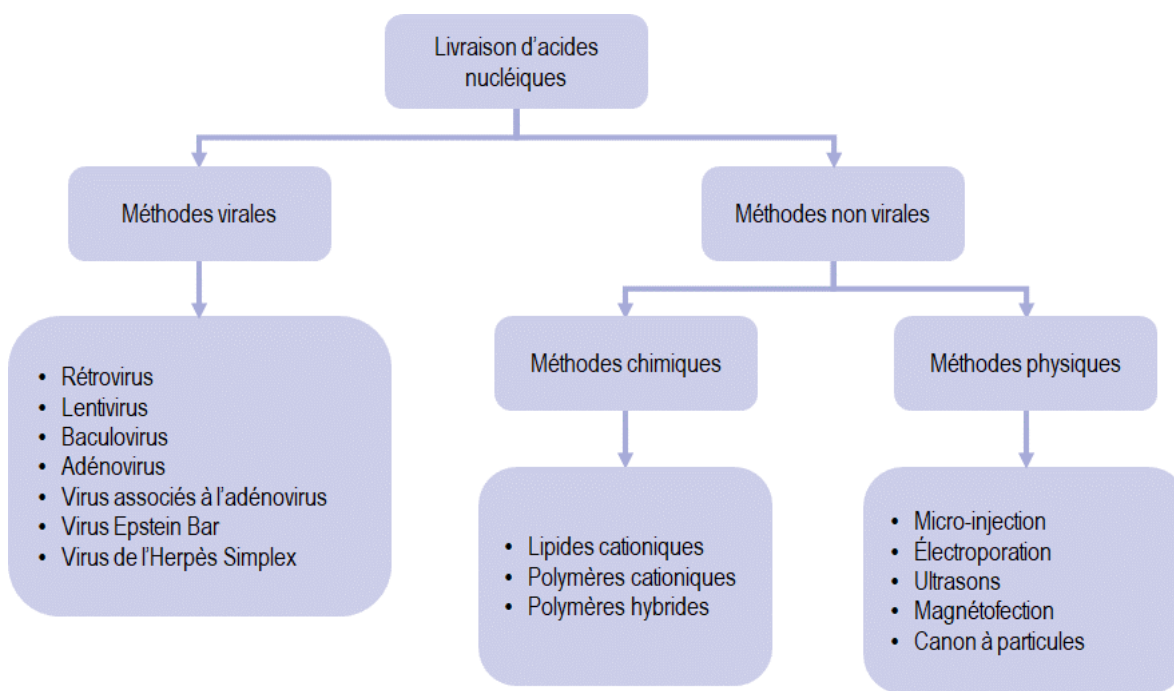


Figure 1 : Classification des principales méthodes de livraison de gènes. Adaptée de (Jayant et al. 2016)

### 1.1.1 Méthodes physiques

Les méthodes physiques consistent à mettre en contact les cellules avec une solution contenant des acides nucléiques puis à provoquer des ouvertures ou des perturbations temporaires dans la membrane cellulaire pour permettre l'entrée du matériel génétique dans le cytoplasme ou jusqu'au noyau. Les méthodes physiques n'impliquent pas l'utilisation d'agents chimiques pour complexer les

acides nucléiques. L'un des avantages réside dans la capacité de ces méthodes à transférer des acides nucléiques de grande taille contrairement aux méthodes chimiques et virales. Bien que des taux de transfection élevés puissent être atteints avec certains types cellulaires, ces méthodes sont susceptibles de provoquer une plus forte mortalité cellulaire. Par ailleurs, la mise en œuvre des différentes techniques peut être complexe, les instruments coûteux et la mise à l'échelle difficile à mettre en place (Jin et al. 2014; Meacham et al. 2014). Les méthodes de transfection physique incluent la micro-injection (Y. Zhang et Yu 2008a), la phototransfection (D. J. Stevenson et al. 2010; Waleed et al. 2013), les canons à particules (O'Brien et Lummis 2011; M. Uchida et al. 2009), l'électroporation (Potter et Heller 2003), la sonoporation (P. Fan et al. 2017; Lentacker et al. 2014) et la magnétofection (Laurentt et al. 2011; Plank, Zelphati, et Mykhaylyk 2011).

#### **1.1.1.1 Électroporation**

L'électroporation est une méthode largement utilisée pour le transfert de gènes. Elle utilise un champ électrique à impulsions courtes qui décroît de manière exponentielle dans le temps ce qui modifie la perméabilité cellulaire. Cela provoque l'ouverture de pores de taille nanométrique dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'absorption des acides nucléiques présents dans le milieu environnant. La taille des pores d'une membrane plasmique peut varier de 1 nm jusqu'à 120 nm en fonction de l'intensité et du temps d'application du champ électrique (Krassowska et Filev 2007; Saulis et Saulé 2012). Toutefois, des pores de plus de 10 nm sont requis pour délivrer dans la cellules des plasmides dont la taille est comprise entre 5 et 20 kpb (Fink et al. 2006). Ces pores peuvent rester ouverts plus de 30 minutes avant de se fermer une fois le champ électrique interrompu (M.-P. Rols 2008; M. P. Rols, Coulet, et Teissié 1992). Cette méthode a été utilisée pour la première fois pour le transfert de gènes *in vitro* dans des cellules de mammifères en 1982 (Sukharev et al. 1992; Tsong 1991). Depuis, l'électroporation s'est avérée efficace dans un large éventail de types cellulaires tels que les bactéries et les cellules de mammifères, de plantes et d'insectes mais également dans des tissus tels que la peau ou le foie (Shi et al. 2018). Pour une transfection optimale, l'impulsion électrique doit prendre en compte le diamètre ou la taille de la cellule et la composition de la membrane cellulaire. En ce sens, des protocoles spécifiques ont été élaborés pour plusieurs lignées cellulaires dont des cellules primaires connues pour être difficiles à transfecter (E. T. Jordan et al. 2008). Toutefois, il est bien connu que l'impulsion électrique peut induire un fort taux de mortalité cellulaire. Les conditions d'électroporation doivent donc être établies avec soin pour chaque type de cellules afin d'obtenir la meilleure efficacité de transfection et le minimum de mortalité. Plus récemment, une méthode basée

sur l'électroporation, appelée nucléofection a été développée (Gresch et al. 2004). Elle permet de transférer des acides nucléiques directement dans le noyau cellulaire. Cette méthode s'est montrée efficace sur des cellules qui ne se divisent pas et connues pour être difficiles à transfecter, telles que les cellules primaires et les neurones de mammifères (Jacobsen et al. 2006; Parreno et al. 2016). Des taux de transfection de 47% et 68% ont pu être obtenus, respectivement, dans des cellules-souches neuronales (Cesnulevicius et al. 2006) et mésenchymateuses (Aslan et al. 2006). Toutefois, une importante mortalité ( $\geq 50\%$ ) (Hamann, Nguyen, et Pannier 2019) et le coût du matériel ( $\approx 10K$  \$US) constituent les principaux désavantages.

### **1.1.1.2 Canon à particules**

Cette méthode consiste à bombarder des cellules ou des tissus avec des nanoparticules sphériques (diamètre de 1 à 3  $\mu\text{m}$ ) de métaux lourds (or, tungstène, argent) recouvertes d'ADN ou d'ARN. Dans cette procédure les particules sont propulsées à grande vitesse à l'aide d'un gaz inerte sous pression pour pénétrer dans les cellules (M. Uchida et al. 2002). L'utilisation de canons à particules a été décrite pour la première fois en 1987 pour la livraison d'acides nucléiques dans des cellules végétales (Klein et al. 1992). Depuis, cette méthode a notamment été utilisée *ex vivo* pour livrer du matériel génétique dans des tissus de mammifères (Al-Dosari et Gao 2009; Roberts et al. 2005; Yoshizawa et al. 2004). Malheureusement, l'utilisation de canons à particules peut causer des dommages considérables aux cellules (M. Uchida et al. 2009).

### **1.1.1.3 Micro-injection**

La micro-injection est une procédure dans laquelle une seule cellule est généralement transfectée à la fois. Les acides nucléiques sont livrés directement dans le cytoplasme ou dans le noyau d'une cellule, à l'aide d'une micro-aiguille. Cette procédure est très efficace puisqu'elle donne la certitude que les cellules injectées contiennent bien le matériel génétique. La micro-injection est très utilisée en recherche clinique pour transférer des acides nucléiques dans des cellules primaires de neurones en culture (Y. Zhang et Yu 2008a; 2008b). En revanche, cette méthode ne convient pas à des applications *in vivo* et *in vitro* à grande échelle en raison du temps nécessaire à sa réalisation. Des optimisations visant à faciliter l'usage de cette technique ont été réalisées (Chow et al. 2016). Néanmoins, c'est une méthode qui requiert toujours un équipement spécifique, coûteux et une grande expertise du manipulateur pour limiter la mortalité cellulaire.



#### **1.1.1.4 Magnétofection**

La magnétofection consiste à livrer des acides nucléiques dans des cellules à la suite de l'application d'un champ magnétique. Le matériel génétique à transférer est préalablement associé à des nanoparticules magnétiques qui, sous l'effet du champ magnétique, se concentrent sur la membrane des cellules et pénètrent par endocytose (Mykhaylyk et al. 2007; Plank et al. 2003). Cette méthode a été décrite pour la première fois dans le cadre d'un brevet en 1996 (Kuehnle et Kuehnle 1996) et fait depuis l'objet de plusieurs études afin d'améliorer son efficacité (Plank, Zelphati, et Mykhaylyk 2011). Comparativement aux autres méthodes de transfection, la magnétofection requiert une faible quantité de matériel génétique et permet d'augmenter la cinétique de transfection. La magnétofection est une méthode efficace pour livrer des acides nucléiques, des protéines dans les cellules ainsi que pour améliorer la pénétration des virus (Plank, Zelphati, et Mykhaylyk 2011). En ce qui concerne la transfection de cellules en culture, la magnétofection a démontré son efficacité sur de nombreux types de cellules primaires difficiles à transférer, telles que des neurones (Buerli et al. 2007), des myoblastes (Couchoux et al. 2007), des chondrocytes (Megías et al. 2009) ou encore des cellules embryonnaires (Bhattarai et al. 2008). La magnétofection est une méthode simple et efficace pour faire pénétrer du matériel génétique dans des cellules mais doit néanmoins être utilisée avec des acides nucléiques préalablement associés à des agents efficaces dans la fuite des endosomes tels que le polyéthylèneimine (PEI). Des cellules lymphocytaires T immortalisées (Jurkat), connues pour être réfractaires à la transfection, ont pu être transfectées à hauteur de 27% (Plank, Zelphati, et Mykhaylyk 2011). Toutefois, son efficacité *in vivo* est limitée par un flux sanguin  $\leq 20$  cm/sec (Crespo-Barreda et al. 2016). Par ailleurs, le principal inconvénient de cette méthode est lié au manque d'homogénéité dans la taille des nanoparticules utilisées. La synthèse de ces nanoparticules est très sensible à une multitude de facteurs lors de leur fabrication (qualité des sels ferreux, de l'eau purifiée et de la température de synthèse) (Prosen et al. 2013).

#### **1.1.1.5 Sonoporation**

La sonoporation utilise des ultrasons pour perméabiliser temporairement la membrane cellulaire afin d'introduire des acides nucléiques dans les cellules. L'action des ultrasons dans un milieu liquide repose sur le phénomène de cavitation, c'est-à-dire la création, la croissance et l'implosion de microbulles formées lorsqu'un liquide est soumis à une onde de pression. Il en résulte un choc de pression au voisinage de la bulle et la formation d'un microréacteur thermo-chimique à l'intérieur de cette dernière (Lentacker et al. 2014; Yu, Chen, et Yan 2019). Ce phénomène de cavitation est

responsable de la création de pores membranaires permettant aux acides nucléiques présents dans le milieu environnant de pénétrer dans les cellules (Tachibana et al. 1999). Plusieurs publications rapportent l'utilisation additionnelle de microbilles (1 à 10  $\mu\text{m}$ ) stabilisées avec un lipide, une protéine ou encore un polymère. Cela a pour conséquence d'amplifier les effets biophysiques des ultrasons sur les cellules et ainsi d'augmenter l'efficacité de la livraison d'acides nucléiques (Ferrara, Pollard, et Borden 2007; Hernot et Klibanov 2008). La sonoporation a été utilisée pour livrer de l'ADN et de l'ARN dans des cellules en culture difficiles à transfecter telles que des cellules dendritiques (De Temmerman et al. 2011; Karshafian et al. 2010). Néanmoins, l'efficacité maximale de transfection rapportée dans la littérature est relativement plus faible (30%) et la mortalité cellulaire plus importante (50%) comparativement aux autres méthodes physiques (Bekeredjian, Grayburn, et Shohet 2005; Z. Fan, Chen, et Deng 2013).

#### **1.1.1.6 Phototransfection**

La phototransfection a été décrite pour la première fois en 1984 (Tsukakoshi et al. 1984) et consiste à utiliser un faisceau laser à impulsions pour irradier une membrane cellulaire afin de former des pores transitoires. La création des pores membranaires permet aux acides nucléiques du milieu de pénétrer dans la cellule en raison de la différence osmotique entre le milieu et le cytosol. La phototransfection a été développée de manière à cibler sélectivement des mitochondries et des membranes cellulaires (Yao et al. 2008). Une amélioration de la méthode de phototransfection consiste à utiliser des impulsions laser de quelques femtosecondes pour transfecter des cellules. Des efficacités de transfection allant jusqu'à 80% ont été obtenues avec néanmoins une mortalité cellulaire importante atteignant 50% (Antkowiak et al. 2013; Brown et al. 2008; He et al. 2008; Soman et al. 2011; D. Stevenson et al. 2006). Cette méthode est particulièrement appropriée lorsque l'on souhaite transfecter une cellule à la fois ou une cellule parmi un groupe cellulaire (D. Stevenson et al. 2006). Néanmoins, de nombreux inconvénients subsistent tels qu'une mortalité cellulaire importante, la nécessité d'optimiser plusieurs paramètres spécifiquement pour chaque lignée cellulaire (temps d'explosion, puissance du laser, région ciblée dans la cellule) ainsi que l'achat d'un instrument coûteux.

#### **1.1.2 Vecteurs viraux**

La méthode employant des vecteurs viraux, aussi connue sous le nom de transduction, est la plus utilisée en recherche clinique (Pfeifer et Verma 2001). Il existe plusieurs catégories de vecteurs viraux se distinguant par leur forme, leur composition, leur tropisme, la nature et la structure de leur génome

(Sharp 2002). Favorisés par des millions d'années d'évolution, les virus constituent donc, après des manipulations génétiques, d'excellents vecteurs pour livrer de manière transitoire ou stable, des acides nucléiques d'intérêts dans des cellules de mammifères. Les vecteurs viraux les plus utilisés en thérapie génique sont les adénovirus (AdV), les virus associés à l'adénovirus (AAV), les rétrovirus (RV), les lentivirus (LV) et le virus de l'herpès simplex (VHS). Les vecteurs RV et LV ont la particularité de permettre l'intégration d'un gène dans le génome des cellules cibles et ainsi obtenir une expression sur le long terme (Aiuti et al. 2013). Néanmoins, l'utilisation de vecteurs viraux pour la thérapie génique met en lumière un certain nombre de problèmes sécuritaires tels que des réactions inflammatoires et immunogènes ainsi qu'un potentiel génotoxique. La reconnaissance des structures virales par les récepteurs de l'immunité innée peut provoquer une inflammation des tissus et déclencher la production d'interféron de type 1 (IFN-1) permettant l'activation de la réponse immunitaire acquise. Par ailleurs, les vecteurs viraux sont susceptibles d'être neutralisés par des anticorps en raison d'une immunité préexistante. En effet, les vecteurs viraux sont composés de protéines virales qui peuvent être identiques ou similaires aux antigènes auxquels les humains ont déjà été exposés à la suite d'infections naturelles (Shirley et al. 2020). En règle générale, la génotoxicité des vecteurs viraux est le résultat de la surexpression d'oncogènes cellulaires à la suite de l'insertion ou de l'activation de promoteurs. Cette génotoxicité peut être influencée par le type de virus, le site de l'intégration et le type cellulaire (Sokol et al. 2014; Suerth, Labenski, et Schambach 2014). La probabilité de génotoxicité est plus élevée pour les vecteurs viraux intégratifs (Woods et al. 2003). De nombreux travaux ont permis de rendre les vecteurs viraux plus sécuritaires même si le risque n'est pas totalement éliminé (David et Doherty 2017). Par exemple, la génotoxicité des vecteurs LV a été réduite grâce à la suppression de la région non traduite U3 de l'extrémité 3' comportant des longues répétitions (LTR 3', long repeat repeat) présent dans le génome viral (W.-S. Hu et Pathak 2000; Cesana et al. 2014). Par ailleurs, l'utilisation de molécules de blocage de la chromatine a permis de réduire le risque d'insertions mutagènes en limitant l'interaction entre le génome du vecteur intégratif et le génome de la cellule (Emery 2011; Ryu et al. 2008). On dénombre sur le marché pas moins de six traitements de thérapie génique. Luxtuma, un vecteur AAV pour traiter une forme congénitale de la cécité. Zolgensma, un vecteur AAV pour traiter l'atrophie musculaire spinale. Strimvelis, un vecteur  $\gamma$ -RV pour le traitement de l'ADA-SCID. Kymriah, un LV pour le traitement la leucémie lymphoblastique aiguë. Yescarta, un LV pour le traitement des lymphomes non hodgkinien. Et enfin, Imlygic, un vecteur oncolytique HSV pour traiter les mélanomes (High et Roncarolo 2019). Toutefois, les inconvénients liés à la limite de taille du transgène pouvant

être emballé dans le génome des vecteurs viraux (Maetzig et al. 2011) ainsi que le coût de la production restent des problèmes majeurs pour la démocratisation des vecteurs viraux à usage thérapeutique (Carr et Bradshaw 2016; Garrison et al. 2019; Salzman et al. 2018). Le tableau 1 apporte une vue d'ensemble des principaux vecteurs viraux utilisés en recherche et dans les essais cliniques de thérapie génique.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux vecteurs viraux pour la livraison d'acides nucléiques.

<b>Vecteurs viraux</b>	<b>AdV</b>	<b>AAV</b>	<b>RV</b>	<b>LV</b>
<b>% des essais cliniques (2017)</b>	21	7,2	18,6	6
<b>Nature du génome</b>	ADN double brin	ADN simple brin	ARN	ARN
<b>Taille du génome</b>	36 kb	8.5 kb	7 – 11 kb	8 kb
<b>Enveloppé</b>	Non	Non	Oui	Oui
<b>Niveau de sécurité</b>	2	1	1-2	2-3
<b>Taille de l'insert</b>	8 – 36 kb	5 kb	8 kb	9 kb
<b>Infectivité</b>	Cellule quiescente et en division	Cellule quiescente et en division	Cellule en division	Cellule quiescente et en division
<b>Expression du transgène</b>	Transitoire	Transitoire ou stable	Stable	Stable
<b>Maintenance du génome</b>	Épisomal	Épisomal (>98%); Intégration site spécifique (<1%)	Intégré	Intégré
<b>Potentiel inflammatoire</b>	Élevé (faible avec 3 <sup>ème</sup> génération)	Faible	Faible	Faible
<b>Avantages</b>	Bon rendement, transduction très efficace sur la plupart des tissus et cellules	Livraison relativement sécuritaire ; peu immunogène	Gène transmis aux cellules en division	Gène transmis à la plupart des cellules
<b>Inconvénients</b>	Capside induisant une réponse inflammatoire Coût ++	Petite capacité d'emballage Coût +++	Cellules quiescentes ; Risque oncogène Coût +++	Risque oncogène Coût +++

### **1.1.3 Agents chimiques et biochimiques**

Les méthodes de transfection chimiques sont les plus largement utilisées en recherche et ont été les premières à permettre l'introduction de gènes étrangers dans des cellules de mammifères (Graham et Van Der Eb 1973). Ces méthodes impliquent l'utilisation de molécules chargées positivement telles que le phosphate de calcium, les polymères cationiques, les lipides cationiques ou encore les peptides cationiques (Godbey, Wu, et Mikos 1999; Holmen et al. 1995; Martin et Rice 2007; Schenborn et Goiffon 2000). Les méthodes chimiques de livraison d'acides nucléiques fonctionnent toutes selon le même principe de base. Elles impliquent des composés chargés positivement, capables d'interagir avec les charges négatives du matériel génétique à livrer. Ces interactions permettent la condensation des acides nucléiques et aboutissent à la formation de complexes réversibles de taille nanométrique (Mintzer et Simanek 2009). Ces derniers, majoritairement chargés positivement, interagissent à leur tour avec les charges négatives de la membrane plasmique et pénètrent dans les cellules. Une fois internalisés, les complexes sont libérés dans le cytosol et les acides nucléiques sont transportés jusqu'au noyau. L'utilisation de méthodes chimiques implique de déterminer les paramètres de formation des complexes permettant d'obtenir une efficacité de transfection optimale (concentration des acides nucléiques et de l'agent chimique, temps d'incubation, densité cellulaire, composition du milieu). Ces paramètres sont largement influencés par le type cellulaire, le milieu de culture et la taille du matériel génétique utilisé. Le potentiel de charge des agents de transfection chimique conditionne également l'efficacité de la livraison mais aussi ses effets cytotoxiques. En effet, un agent chimique de transfection possédant des charges de surface élevées aura une capacité accrue pour interagir avec les acides nucléiques et la membrane cellulaire mais sera en contrepartie plus cytotoxique (Breunig et al. 2007). D'importants efforts ont été réalisés pour augmenter l'efficacité du transfert de gènes et réduire dans le même temps la toxicité des agents chimiques de transfection (Khosravi-Darani et al. 2010).

#### **1.1.3.1 Précipitation au phosphate de calcium**

La transfection par précipitation au phosphate de calcium est la méthode historique élaborée en 1973 (Graham et Van Der Eb 1973). Elle consiste à former des précipités de taille nanométrique composés de phosphate de calcium et d'acides nucléiques. Ces nanoparticules se forment grâce à des interactions électrostatiques à la suite du dépôt de chlorure de calcium sur l'ADN suivi par l'ajout d'une solution de phosphate entraînant la formation des précipités. La transfection par précipitation au

phosphate de calcium est une méthode intéressante car elle est non toxique pour les cellules (Sokolova et al. 2007), biocompatible, biodégradable (Dorozhkin et Epple 2002) et moins coûteuse que les autres méthodes commerciales (Epple et al. 2009). Néanmoins, l'efficacité de transfection observée est souvent inférieure à celle obtenue avec des agents commerciaux à base de liposomes et de polymères (Kovtun, Heumann, et Epple 2009). Par ailleurs, la formation des précipités de phosphate de calcium requiert une expertise spécifique (M. Jordan, Schallhorn, et Wurm 1996).

### **1.1.3.2 Polymères cationiques**

Les polymères cationiques sont des composés naturels ou synthétiques, constitués principalement de nombreux résidus aminés qui deviennent positifs dans des conditions physiologiques. Ils sont capables d'interagir avec les acides nucléiques par des interactions électrostatiques. Ces dernières provoquent la compaction des acides nucléiques pour aboutir à la formation d'un complexe appelé polyplexe. L'adsorption des polyplexes dans la cellule se produit par des interactions entre la membrane cellulaire chargée négativement, et le polyplexe, chargé positivement, suivi de l'internalisation par des mécanismes d'endocytose (Khalil et al. 2006; Pichon, Billiet, et Midoux 2010). Des polymères cationiques naturels tels que le chitosan (Guang Liu et De Yao 2002; Mansouri et al. 2004; Mao et al. 2001) et synthétiques tels que le polyéthylèneimine (PEI) (Boussif et al. 1995; Durocher, Perret, et Kamen 2002; Godbey, Wu, et Mikos 1999; Neuberg et Kichler 2014), les poly(amidoamines) (Pettit et al. 2011; Richardson et al. 2001) et la Poly (L-lysine) (S. W. Kim 2012; Zauner, Ogris, et Wagner 1998; Ziady et al. 2003) ont été développés pour livrer des acides nucléiques. Plusieurs revues décrivent en détail tous ces polymères cationiques ainsi que les nombreuses modifications pour en améliorer les performances (Samal et al. 2012). Parmi tous ces polymères cationiques, le PEI est l'agent de transfection le plus utilisé au laboratoire. C'est en effet l'un des polymères les plus étudiés depuis 1995 pour la livraison de gènes (Boussif et al. 1995; Durocher, Perret, et Kamen 2002; Vicennati et al. 2008). Le PEI est un agent de transfection très souvent utilisé pour le transfert d'ADN mais quelques publications démontrent également son efficacité dans le transfert d'ARN (Günther et al. 2011; Wirth et al. 2011). Même si le PEI permet d'obtenir des niveaux de transfection relativement élevés sur certains types cellulaires, les cellules primaires y sont majoritairement réfractaires (Maurisse et al. 2010). L'un des inconvénients majeurs est sa toxicité à fortes concentrations (Florea et al. 2002; Kafil et Omid 2011). Plusieurs publications rapportent des modifications du PEI pour diminuer son effet cytotoxique (Gosselin, Guo, et Lee 2001; M. Wang et al. 2013; Zintchenko et al. 2008), pour permettre sa dégradation par les cellules (Ahn et al. 2002; Zintchenko et al. 2008) ou encore pour transfecter

spécifiquement des cellules (Parhiz, Shier, et Ramezani 2013). Le PEI a également fait l'objet d'études cliniques pour la livraison d'acides nucléiques (Anchiano Therapeutics Israel Ltd. 2019) mais son utilisation reste marginale.

### **1.1.3.3 Lipides cationiques**

L'utilisation des lipides cationiques comme agents de livraison d'ADN est apparue pour la première fois dans les années 1980 sous le terme de lipofection (Fralely et al. 1980; Felgner et al. 1987). Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été développés et leur capacité à livrer du matériel génétique dans différents types de cellules a été évaluée (Zhi et al. 2010; Pezzoli et al. 2013). Tous partagent une structure commune composée de trois parties : une tête hydrophile, un groupe de liaison et une queue hydrophobe (Simões et al. 2005). La tête hydrophile est couramment constituée de groupes amines primaires, secondaires et tertiaires ainsi que des sels d'ammonium quaternaires. Les charges cationiques de la tête hydrophile sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et possèdent une charge positive nette dans des conditions physiologiques. En solution, les lipides cationiques s'assemblent sous forme d'une bicouche membranaire sphérique pouvant être utilisée pour encapsuler des molécules (lipoplexes) telles que des acides nucléiques (Felgner et al. 1997; Al-Dosari et Gao 2009). Le groupe de la tête hydrophile, chargé positivement, interagit avec les charges négatives de l'ADN (Elouahabi et Ruyschaert 2005). Les lipides cationiques sont très populaires en recherche car efficaces sur une large gamme de types cellulaires incluant certaines cellules primaires (difficiles à transfecter). Néanmoins, certaines cellules telles que les cardiomyocytes (Kaestner et al. 2014) et les cellules épithéliales HTEC (Maurisse et al. 2010) sont réfractaires à la livraison d'acides nucléiques par des lipides cationiques. Par ailleurs, ces derniers peuvent être toxiques pour les cellules. La littérature démontre que la nature cationique des têtes hydrophiles peut interagir avec des protéines cellulaires conduisant à l'activation de voies pro-apoptotiques et pro-inflammatoires ce qui limite leur application *in vivo* (Lv et al. 2006; Loney, Vandenbranden, et Ruyschaert 2012). Par ailleurs, plus la tête hydrophile du lipide contient des charges positives, plus la toxicité cellulaire est importante malgré une meilleure efficacité de transfection. Ainsi, les têtes hydrophiles composées d'un groupement ammonium quaternaire sont plus toxiques que les têtes hydrophiles composées d'un groupement primaire, secondaire ou tertiaire. Enfin, d'autres expériences confirment que l'utilisation de lipides cationiques portant un groupement quaternaire est corrélée avec la réduction du potentiel de la membrane mitochondriale ainsi que la libération d'espèces réactives à l'oxygène, à l'origine de l'apoptose des cellules (Cui et al. 2018). L'application en clinique des lipides cationiques reste encore

limitée (4% (Wiley 2019)) en raison de leur faible efficacité en présence de sérum de leur cytotoxicité mais également à cause du coût élevé de leur production à grande échelle (Barba et al. 2019). En effet, le coût élevé du traitement au Patisiran (450 000\$/an) (Kristen et al. 2018), une thérapie contre la polyneuropathie périphérique qui consiste à livrer un ARN interférant à l'aide de liposomes, serait en grande partie lié au coût de la production des liposomes (Barba et al. 2019).

#### **1.1.3.4 Peptides de pénétration**

Les peptides de pénétration sont des peptides cationiques ou amphiphiles de 9 à 35 acides aminés qui sont capables de s'associer à des molécules pour les transférer à l'intérieur des cellules (translocation). La caractéristique commune de tous les peptides de pénétration est leur forte concentration en acides aminés basiques. Il y a deux catégories principales de peptides de pénétration qui ont été utilisées pour la livraison intracellulaire de molécules thérapeutiques : les peptides cationiques et les peptides amphiphiles. Les peptides cationiques sont de courtes séquences d'acides aminés principalement composées d'arginine, de lysine et d'histidine. Ces acides aminés sont responsables de la charge cationique du peptide, lui permettant d'interagir avec les charges anioniques de la membrane plasmique. Les peptides amphiphiles sont composés d'une extrémité hydrophile et lipophile, responsable de la translocation du peptide à travers la membrane plasmique. Les mécanismes cellulaires utilisés par les peptides de pénétration sont mal connus et l'implication exclusive des voies classiques d'endocytoses semble controversée (Tripathi et al. 2018). La littérature rapporte que les vecteurs de livraison de gènes utilisant des peptides de pénétration pourraient remplir théoriquement tous les critères essentiels qui composent un vecteur idéal. Les peptides cationiques, riches en arginine et/ou en lysine, sont capables de condenser efficacement les acides nucléiques en petites particules compactes (Adami et Rice 1999; McKenzie, Kwok, et Rice 2000; Wadhwa et al. 1997). L'incorporation au polyplexe d'un peptide ligand peut permettre un ciblage cellulaire spécifique. Certaines séquences peptidiques dérivées de protéines de transduction peuvent permettre la libération du polyplexe dans le cytoplasme (Deshayes et al. 2005; Gupta, Levchenko, et Torchilin 2005). Enfin, des séquences de localisation nucléaire d'origine virale peuvent être utilisées pour diriger les polyplexes jusqu'au noyau (Bremner, Seymour, et Pouton 2001; Peters 2006). Bien que l'utilisation de certains peptides cationiques ait démontré des résultats prometteurs *in vivo* (Künnapuu et al. 2019; Kurrikoff et al. 2017; Pan et al. 2017; Tripathi et al. 2018) et fasse l'objet de plusieurs études cliniques (Xie et al. 2020; Staecker et al. 2019; Capron et al. 2019), aucun système de livraison à base de



peptides cationiques de pénétration n'a encore été approuvé par les instances réglementaires (Xie et al. 2020).

### **1.1.4 Vecteurs hybrides**

Le développement d'agents de livraison hybrides tente de réunir tous les avantages dans un seul système. Les vecteurs hybrides peuvent être composés de divers éléments tels que des virus, des protéines, des agents chimiques ou encore biochimiques.

#### **1.1.4.1 Hybrides d'origine virale**

Plusieurs publications décrivent des combinaisons entre des vecteurs viraux et non viraux afin d'obtenir des vecteurs hybrides ayant une efficacité de livraison améliorée et des effets secondaires minimisés (immunogénicité et toxicité). Quelques exemples de ces vecteurs hybrides ayant démontré une efficacité significative pour la livraison de gènes sont présentés dans le tableau 2. Parmi ces vecteurs viraux, l'adénovirus a été particulièrement utilisé pour développer des vecteurs hybrides fonctionnalisés avec des vecteurs non viraux tels que des billes d'alginate (H. Park et al. 2012), du chitosan (Y. Park, Kang, Kwon, Hwang, et al. 2010; Y. Park, Kang, Kwon, Park, et al. 2010) ou encore du PEI (C.-H. Lee et al. 2014; Choi et al. 2015). De manière similaire, le baculovirus a été hybridé avec du PEI pour améliorer son efficacité de livraison (Y.-K. Kim et al. 2009). Par ailleurs, des systèmes hybrides combinant des parties de virus à des vecteurs non viraux ont également prouvé leur efficacité. Par exemple, l'ajout de la protéine hexon de l'adénovirus à du PEI a permis d'améliorer la livraison de gènes (D. Luo et Saltzman 2000). De plus, des articles décrivent l'ajout de composants viraux pour attribuer un tropisme à des agents synthétiques de livraison. Ainsi des lipoplexes couplés avec la protéine L de l'enveloppe du virus de l'hépatite B sont capables de cibler spécifiquement les hépatocytes (Zhijun Wang, Yuan, et Jin 2008). De la même manière, une formulation composée de la glycoprotéine de surface du VSV (VSV-G) et de lipoplexes, améliore significativement la livraison de gènes (Abe, Miyanojara, et Friedmann 1998). Également, la protéine HA-2 du virus de la grippe, conjuguée aux complexes formés d'ADN et de poly-lysines, améliore l'efficacité de la transfection (Wagner et al. 1992). Les virosomes représentent, par ailleurs, une catégorie d'agents hybrides capables de livrer de l'ADN. Les virosomes sont des particules pseudo-virales fabriquées *in vitro* par l'assemblage de liposomes synthétiques avec des protéines virales ayant été obtenues à la suite du désassemblage de virus (Huckriede et al. 2005). Des virosomes construits à partir du virus Sendai, du virus de la grippe ou encore du VSV ont été utilisés avec succès pour livrer de l'ADN *in vitro* et *in vivo*

(Daemen et al. 2005; Kaneda et al. 2002; Shoji et al. 2004). L'une des méthodes pour préparer des virosomes consiste à solubiliser la membrane virale suivie de l'élimination de la nucléocapside par ultracentrifugation. Par la suite, la reconstitution de la membrane virale avec des lipides synthétiques est réalisée par suppression du détergent par dialyse (T. Uchida et al. 1979). Des virosomes ont pu être couplés à de l'ADN par l'intermédiaire de lipides cationiques (DODAC dioleoyldiméthylammonium chloride) incorporés dans la membrane des virosomes et capables de se lier aux plasmides (Schoen et al. 1999). Dans cette configuration, les ADN se situent à l'extérieur des virosomes. Par ailleurs, l'ajout d'ADN avant la reconstitution du virosome a abouti à son encapsulation (de Jonge et al. 2006). Enfin, des particules pseudo-virales du papillomavirus humain produites par culture cellulaire ont également démontré leur capacité à livrer *in vitro* et *in vivo* de l'ADN (Malboeuf et al. 2007). Les particules pseudo-virales ont été produites à la suite de l'expression de la protéine de la capsid L1 dans des cellules en culture, puis incubées avec des plasmides codant pour la protéine fluorescente GFP. Le mélange a ensuite été déposé sur des cellules en culture. Cette expérience suggère la formation d'un complexe grâce à la protéine de capsid L1. Néanmoins, ces particules pseudo-virales sont susceptibles de déclencher une forte réaction immunitaire.

Tableau 2 : Exemples de vecteurs viraux hybrides couplés à des nanomatériaux testés *in vitro* et *in vivo*. Adapté de (Mahato, Jayandharan, et Vemula 2018).

<b>Vecteurs</b>	<b>Nano matériel conjugué</b>	<b>Transgènes</b>	<b>Applications les plus avancées</b>	<b>Références</b>
<b>AdV</b>	PAMAM-G5	Sodium-iodide symporter	Radio-virothérapie	(Grünwald et al. 2013)
<b>LV</b>	Hydrogel de fibrine (+/- hydroxylapatite)	Luciférase	Bioluminescence	(Kidd, Shin, et Shea 2012)
<b>LV</b>	Hydrogel de collagène (+/-hydroxylapatite)	Luciférase	Bioluminescence	(Shin et Shea 2010)
<b>AAV</b>	Polypeptide élastine (ELP)	GFP	Transduction <i>in vitro</i>	(J.-S. Kim et al. 2012)
<b>AAV</b>	Oxyde de fer magnétique enrobé d'héparine	GFP	Transduction <i>in vitro</i>	(Hwang et al. 2011)
<b>AAV</b>	Étiquette Glycéraldéhyde	GFP	Transduction <i>in vitro</i>	(Y. Liu et al. 2013)
<b>AAV</b>	Polypeptide élastine + poly ( $\epsilon$ -caprolactone)	GFP	Transduction <i>in vitro</i>	(S. Lee et al. 2011)
<b>AAV</b>	Polyéthylène glycol (PEG)	GFP	Transduction <i>in vitro</i>	(W. Lee et al. 2005)

#### 1.1.4.2 Hybrides d'origine non virale

La structure des virus a inspiré la construction de systèmes hybrides synthétiques qui sont composés d'agents non viraux tels que des acides nucléiques, des protéines, des polymères et des lipides (Mastrobattista et al. 2006). Classiquement, les acides nucléiques sont condensés avec des polymères ou des protéines cationiques, puis enrobés avec d'autres éléments impliqués dans le ciblage des cellules ou encore dans la fuite des endosomes. Ainsi, la littérature rapporte par exemple des nanoparticules formées d'une combinaison de protamines ou de poly-lysines (compaction de l'ADN), de lipides (protection), de peptides (ciblage et pénétration membranaire) et de toxines (fuite des

endosomes) (Glover et al. 2009; Kogure et al. 2004). Les protéines cages telles que la ferritine et les protéines de choc thermique constituent également un outil intéressant pour créer des structures qui s'auto-assemblent autour du matériel à livrer (Bhaskar et Lim 2017; E. J. Lee, Lee, et Kim 2016; Murata et al. 2015). Des particules synthétiques peuvent également être générées par l'assemblage de chaînes de polymères contenant un domaine hydrophile et hydrophobe (Elsabahy et Wooley 2012). Aux cours de leur processus de formation, ces particules artificielles peuvent également encapsuler du matériel à livrer et incorporer des protéines de fonctionnalisation dans son enveloppe synthétique (Evers et al. 2016).

## **1.2 Voies cellulaires pour le transport de biomolécules**

La livraison d'acides nucléiques dans des cellules implique d'accomplir différentes étapes telles que la pénétration de la membrane plasmique, la libération du matériel génétique dans le cytoplasme et le transport intracellulaire jusqu'au lieu d'action (Figure 2). Hormis les méthodes mécaniques et physiques provoquant la rupture temporaire de l'intégrité cellulaire, les vecteurs de livraison de gènes peuvent entrer dans les cellules par l'intermédiaire de vésicules d'endocytose, par fusion ou encore par pénétration de la membrane. Après que la membrane plasmique a été franchie, certains vecteurs de livraison doivent encore libérer les acides nucléiques qu'ils transportent dans le cytoplasme. Ensuite, le matériel génétique importé doit cheminer jusqu'au lieu désiré de son activité. Qu'elles soient physiques, chimiques ou virales, les méthodes de livraison d'acides nucléiques exploitent, à un moment donné dans leur processus, les mécanismes naturels des cellules.

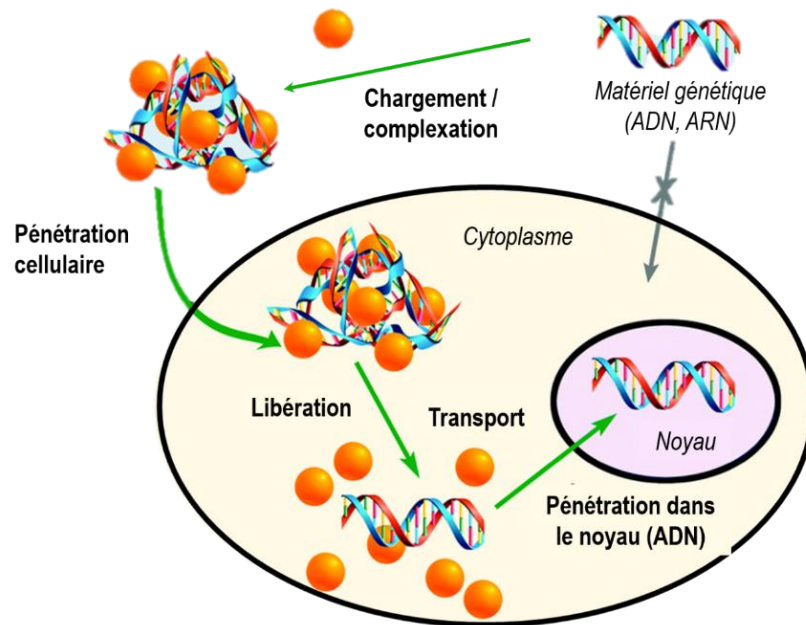


Figure 2: Principales étapes d'un processus de livraison d'acides nucléiques en cellules de mammifères. Adaptée de (Loh et al. 2015).

## 1.2.1 Mécanismes naturels du transport membranaire

### 1.2.1.1 Membranes cellulaires

Les membranes des cellules de mammifères sont des structures subcellulaires d'une épaisseur d'environ 10 nm, formant une barrière protectrice capable de réguler l'entrée et la sortie de molécules dans la cellule. Elles sont structurées par une bicouche de phospholipides possédant des groupements phosphates hydrophiles (têtes), faisant face à l'environnement aqueux, reliés à des groupements hydrophobes (queues), formant l'espace intermembranaire (Figure 3). Les phospholipides qui composent la membrane plasmique sont des phosphatidylcholines, des phosphatidylethanolamines, des phosphatidylserines, des sphingolipides, des glycolipides et du cholestérol. (Keren 2011). La couche interne est principalement constituée de phosphatidylcholines et de sphingolipides alors que la couche externe est essentiellement composée de phosphatidylethanolamine, de phosphatidylinositol et de phosphatidylsérine. Le cholestérol joue un rôle majeur dans la perméabilité de la membrane. À température élevée, le cholestérol réduit la perméabilité de la membrane alors qu'à basse température il augmente sa fluidité (Cooper 2000b). Les membranes cellulaires sont fonctionnalisées par des protéines telles que des récepteurs, des transporteurs, des protéines

d'adhésion et des enzymes. Certaines de ces protéines membranaires ont des domaines alpha-hélicoïdaux qui traversent la membrane (protéines transmembranaires) alors que d'autres sont associées en périphérie par des interactions avec les groupements hydrophiles de la membrane. Les membranes cellulaires contiennent également des glucides, sous la forme d'oligosaccharides, liés de manière covalente aux protéines membranaires (glycoprotéines) ou aux lipides (glycolipides). La nature fluide des membranes est liée aux mouvements de rotation ou latéraux des lipides et des protéines.

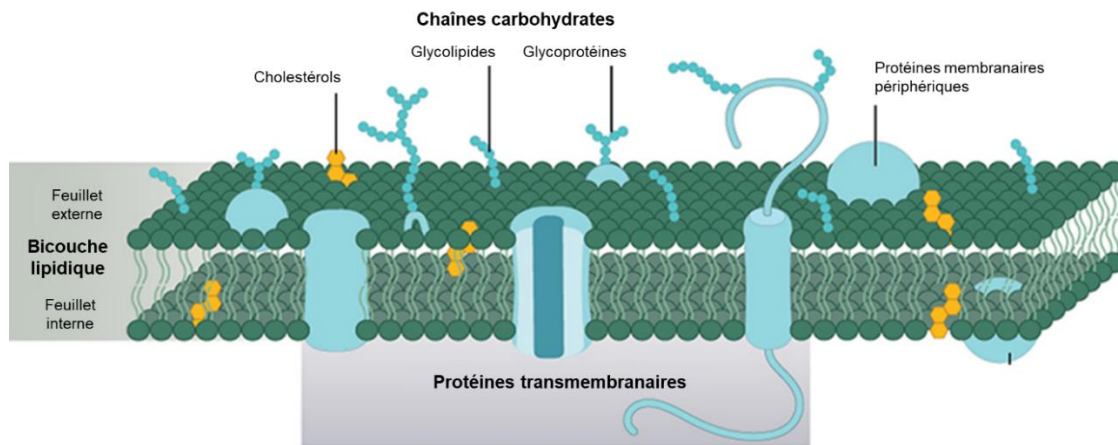


Figure 3 : Membrane des cellules eucaryotes. Adaptée de (MBinfo 2018b).

### 1.2.1.2 Bases du transport cellulaire

L'entrée de molécules dans les cellules est strictement contrôlée au niveau de la membrane plasmique. Au niveau moléculaire, les composés de petite taille, solubles avec les lipides membranaires peuvent facilement diffuser à travers la membrane alors que les molécules polaires nécessitent des processus qui dépendent de l'énergie cellulaire. Ce transport actif fait intervenir des transporteurs protéiques membranaires ou implique des déformations de la membrane aboutissant à la formation de vésicules. L'entrée d'éléments du milieu extérieur vers l'intérieur des cellules s'appelle : l'endocytose (Figure 4). Ce mécanisme est utilisé pour absorber des nutriments qui ne peuvent pas être synthétisés par la cellule, tels que les vitamines, le cholestérol ou encore le fer. Le processus commence par la formation de vésicules à partir de la membrane pour englober les nutriments. Par la suite, ces vésicules fusionnent avec d'autres vésicules intracellulaires, appelées endosomes permettant le recyclage ou la dégradation via la voie lysosomale (Tooze, Abada, et Elazar 2014). Les mécanismes de l'endocytose

sont détaillés dans le paragraphe suivant puisqu'ils constituent la voie d'entrée majeure pour de nombreux pathogènes et pour la livraison d'acides nucléiques.

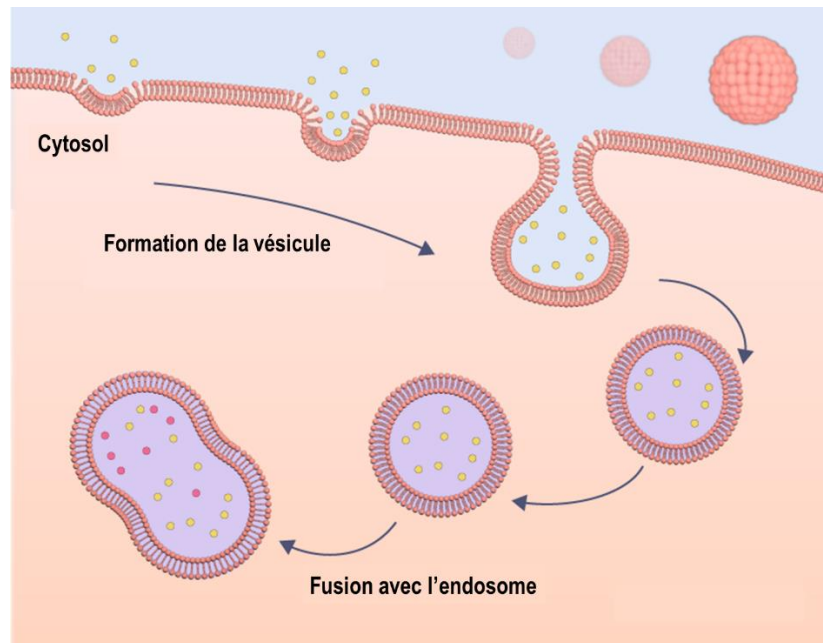
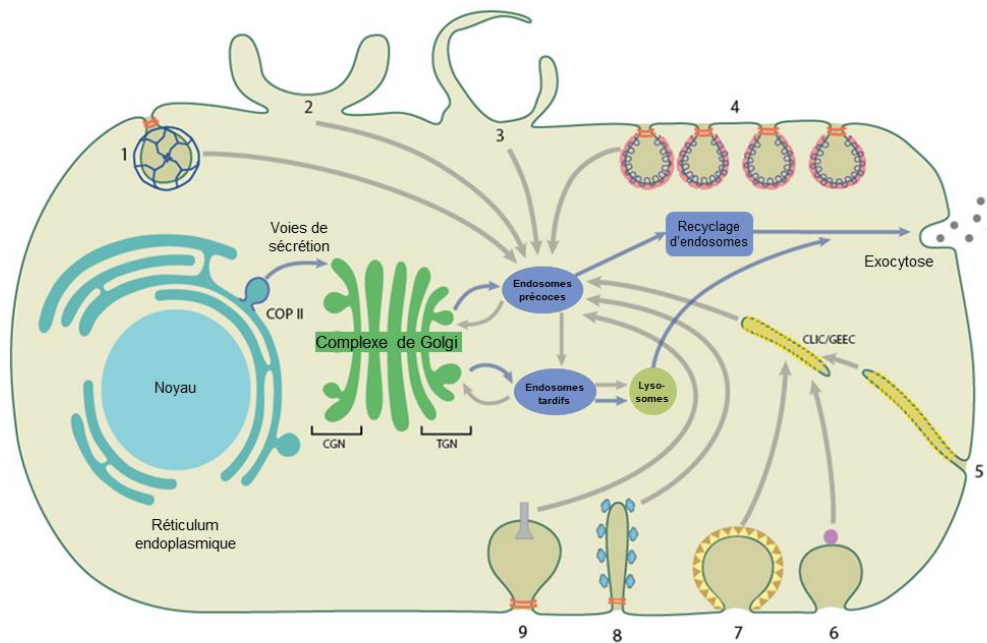


Figure 4 : Étapes simplifiées de l'endocytose. Adaptée de (« MBinfo » 2018a).

### 1.2.1.3 Voies d'endocytose

On distingue généralement deux grands groupes d'endocytose : la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose est un mécanisme découvert à l'origine dans les macrophages. La pinocytose est présente dans tous les types cellulaires et se décline sous plusieurs formes : la macropinocytose, l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante des cavéoles, et l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles (Figure 5).



### Voies d'endocytoses

- 1. Dépendante des clathrines    2. Phagocytose    3. Macropinocytose    4. Dépendante des cavéoles    5. CLIC/GEEC
- 6. Dépendante d'ARF 6    7. Dépendante des flotillines    8. FEME    9. Dépendante de Rho/IL-2R

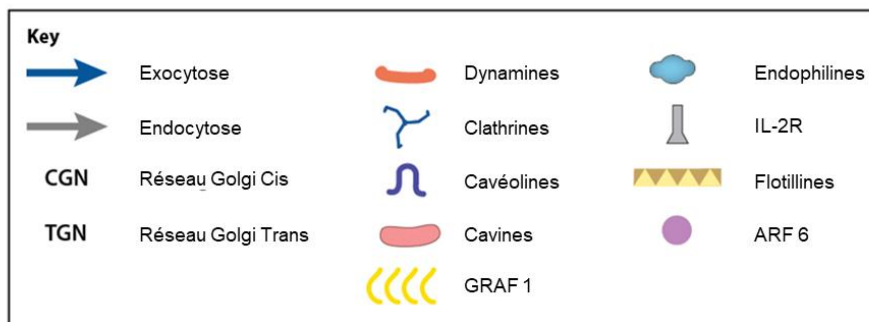


Figure 5 : Voies d'internalisation de biomolécules en cellules de mammifères. Adaptée de (« MBinfo » 2018a).

#### 1.2.1.3.1 Phagocytose

La phagocytose (Figure 5 – voie 2) est une voie particulière de l'endocytose ayant lieu dans les macrophages, les neutrophiles et les monocytes (Aderem et Underhill 1999). Pour pénétrer dans la cellule par cette voie, les biomolécules doivent au préalable être reconnues par les opsonines. Par la suite, les molécules couplées aux opsonines se lient à la surface des cellules par interaction avec ses récepteurs, induisant une extension de la membrane. Cette déformation englobe les molécules et les internalise dans des vésicules d'un diamètre de 0,5 à 10 µm, appelées phagosomes. Enfin, les phagosomes fusionnent avec les lysosomes (Aderem et Underhill 1999; S. Xiang et Zhang 2013) pour



être détruits par acidification et lyse enzymatique. Par conséquent, la livraison d'acides nucléiques dans des cellules capables de phagocytose doit contourner cette voie pour éviter la dégradation du matériel génétique à livrer.

#### 1.2.1.3.2 Pinocytose

La pinocytose est la voie cellulaire principale pour la pénétration des liquides, des solutés et des petites particules en suspension. La pinocytose est divisée en 4 catégories : l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante des cavéoles, la macropinocytose et l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles (Rappoport 2008; J. Wang et al. 2011).

##### *1.2.1.3.2.1 Endocytose dépendante des clathrines*

L'endocytose dépendante des clathrines est présente dans toutes les cellules de mammifères et occupe une part importante dans la pénétration de nanoparticules dans les cellules (Figure 5 – voie 1). La liaison des nanoparticules aux récepteurs déclenche une accumulation localisée de clathrines sur la face cytoplasmique de la membrane suivie de leur polymérisation sous forme de manteau pour produire une invagination donnant naissance à une vésicule membranaire (McMahon et Boucrot 2011; Rappoport 2008). Cette polymérisation est dépendante de protéines adaptatrices, comme AP2, qui font la connexion entre de nombreux récepteurs, les triskèles de clathrines et de nombreuses protéines accessoires (Edeling, Smith, et Owen 2006; Schmid et McMahon 2007). Par ailleurs, plusieurs autres protéines sont impliquées dans la formation des vésicules de clathrines en se liant, soit directement à la clathrine, soit à l'adaptateur AP2 (Edeling, Smith, et Owen 2006; Traub 2009). Le détachement des vésicules recouvertes de clathrines de la membrane plasmique requiert l'action GTPase de la dynamine aidée par différentes protéines effectrices qui induisent la fission à la base de la vésicule (Marks et al. 2001; Pucadyil et Schmid 2009). Par la suite, le manteau de clathrines est désassemblé par l'activité ATPase de la protéine Hsc70 recrutée par la protéine auxiline (Greene et Eisenberg 1990; Massol et al. 2006). Les études microscopiques révèlent que les vésicules entourées de clathrines peuvent atteindre un diamètre de 200 nm lors de l'endocytose du virus Semliki (McMahon et Boucrot 2011), de lipoplexes (Zuhorn, Kalicharan, et Hoekstra 2002) ou encore d'autres vecteurs non viraux (Rejman, Bragonzi, et Conese 2005). Les vésicules se déplacent ensuite à l'intérieur des cellules via le cytosquelette et l'énergie fournie par l'actine (Doherty et McMahon 2009). Elles fusionnent avec les endosomes précoces qui s'acidifient légèrement ( $\text{pH} \approx 6.0$ ) par l'action de pompes à protons dépendantes de l'ATP (Van Dyke 1996). À partir de cette étape, les vésicules sont transportées vers

différentes destinations en fonction du type de récepteur ou de la composition membranaire (Barysch et al. 2009; Madshus et Stang 2009). Les vésicules fusionnées aux endosomes précoces peuvent soit être dirigées vers la membrane cellulaire dans le cadre du processus de recyclage de la cellule, soit évoluer en endosomes tardifs par une acidification plus intense (pH 5.0). Finalement, ces derniers fusionnent avec les lysosomes, ce qui conduit à la dégradation enzymatique des molécules endocytées (Huotari et Helenius 2011). L'endocytose dépendante des clathrines est notamment impliquée dans l'internalisation et le recyclage des récepteurs impliqués dans divers processus, comme celui de la transduction du signal (récepteurs à protéine G et tyrosine kinase), de l'absorption de nutriments et de facteurs de croissance (Takei et Haucke 2001). Le recyclage de la transferrine liée au fer et l'absorption de lipoprotéines de basse densité (LDL) sont deux exemples classiques de cette voie d'endocytose. Cette dernière peut être bloquée par des inhibiteurs métaboliques et d'autres éléments tels que la chlorpromazine, un milieu hypertonique ou encore la suppression de potassium dans le milieu de culture (Delva et al. 2008; Richard et al. 2005). Dans une perspective d'utilisation pour la livraison d'acides nucléiques et d'autres molécules biologiques, la méthode utilisée doit permettre la libération du matériel biologique d'intérêt avant l'entrée des endosomes dans la voie de dégradation lysosomale.

#### *1.2.1.3.2.2 Endocytose dépendante des cavéoles*

L'endocytose dépendante des cavéoles est également une voie de pénétration communément retrouvée dans de nombreux types cellulaires (Figure 5 – voie 4). L'internalisation de particules par cette voie d'endocytose fait intervenir des vésicules d'un diamètre de 60 à 80 nm, appelées cavéoles (Smart et al. 1999). Ces vésicules sont formées à la suite de l'interaction de protéines appelées cavéolines avec la face interne de la membrane plasmique. Cela induit un enrichissement localisé de la membrane en cholestérols et sphingolipides (radeau lipidique) ce qui permet une invagination membranaire. Il existe trois isoformes de cavéolines chez les mammifères en fonction du type cellulaire. La cavéoline 3 est spécifique aux muscles, tandis que les cavéolines 1 et 2 sont abondantes dans la plupart des cellules non musculaires telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes, en étant, néanmoins absentes dans les neurones et les leucocytes (Lamaze et al. 2017). La formation des cavéoles commence par la polymérisation des cavéolines dans le réticulum endoplasmique suivie par la complexation avec des molécules de cholestérol et de sphingolipides dans l'appareil de Golgi pour former des précurseurs de radeaux lipidiques. Ces derniers fusionnent avec le feuillet interne de la membrane plasmique avant d'être enrichis par d'autres lipides et protéines provenant de la membrane. La cavine, l'une de ces protéines recrutées, aurait un rôle important dans

la stabilisation des cavéoles (Hill et al. 2008). L'interaction des nanoparticules avec les récepteurs membranaires présents au niveau des cavéoles déclenche la fermeture de ces dernières grâce à l'action de la dynamine (Oh, McIntosh, et Schnitzer 1998). Les cavéoles se déplacent par la suite au sein de la cellule par l'intermédiaire des microtubules et de l'actine. Initialement, il a été rapporté que les cavéoles fusionnent entre elles pour former des structures vésiculaires plus grandes appelées cavéosomes (Pelkmans, Kartenbeck, et Helenius 2001). Avec un pH intérieur neutre (Parton et Simons 2007), la cargaison contenue dans ces cavéosomes échappe à la voie de dégradation des lysosomes (Medina-Kauwe 2007) pour être livrée dans le réticulum endoplasmique (Khalil et al. 2006; Pelkmans, Kartenbeck, et Helenius 2001). La littérature propose que la cargaison soit ensuite libérée dans le cytosol et pénètre dans le noyau par les pores nucléaires (Kasamatsu et Nakanishi 1998). Néanmoins, d'autres informations remettent en question l'existence des cavéosomes qui seraient en réalité des endosomes matures dans lesquels les cavéolines s'accumulent en attendant leur dégradation (Hayer et al. 2010). L'efficacité d'une méthode de livraison empruntant cette voie dépend, également, de sa faculté à libérer le matériel endocyté avant sa dégradation par la voie lysosomale.

#### *1.2.1.3.2.3 Macropinocytose*

La macropinocytose (Figure 5 – voie 3) est un mécanisme d'endocytose que l'on retrouve dans presque tous les types cellulaires qui permet l'internalisation non spécifique de matériels extracellulaires (Bloomfield et Kay 2016). À la suite de l'interaction de la cargaison avec la membrane plasmique, les récepteurs tyrosines kinases déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire (Joel A. Swanson et King 2019). La macropinocytose se caractérise notamment par une déformation de la membrane plasmique vers l'extérieur (polymérisation de l'actine) pour former un anneau autour des molécules ou particules à internaliser. La fusion des deux extrémités membranaires permet de donner naissance à une vésicule d'un diamètre de 0,2 à 10  $\mu\text{m}$ , appelée macropinosome (Lim et Gleeson 2011; J. A. Swanson et Watts 1995). La macropinocytose implique plus particulièrement les protéines Ras et les lipides phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). Les protéines Ras activent les phosphoinositide 3-kinases de classe I qui produisent les lipides membranaires PIP3 (Rodriguez-Viciano et al. 1994). Ces lipides subissent plusieurs transformations dès la fermeture des vésicules et ce tout au long du transport intracellulaire (Egami et al. 2014; Maekawa et al. 2014). Le devenir des macropinosomes diffère en fonction du type cellulaire, néanmoins pour la majorité des cellules, les macropinosomes suivent la voie de maturation classique des endosomes (Mercer et Helenius 2012; Racoosin et Swanson 1993). Sans mécanismes de libération propres aux particules

ou molécules endocytées, les macropinosomes commencent par s'acidifier et acquérir les marqueurs des endosomes précoces Rab5 et/ou EEA1 suivi par le marqueur des endosomes tardifs Rab7 et enfin la fusion avec les lysosomes (Mercer et Helenius 2012). La macropinocytose est également une voie exploitée par différents micro-organismes pour pénétrer dans les cellules. En effet, il a été démontré que les bactéries intracellulaires *Legionella pneumophila* (Watarai et al. 2002), *Shigella flexneri* (Weiner et al. 2016) et certains protozoaires (de Carvalho, Barrias, et de Souza 2015), ainsi que l'adénovirus (Kälin et al. 2010), le VIH (Maréchal et al. 2001) ou encore le virus Ebola (Aleksandrowicz et al. 2011) pénètrent dans les cellules par macropinocytose. Par ailleurs, de nombreuses études décrivent l'implication de la macropinocytose dans la livraison de molécules thérapeutiques de grande taille ou chargées telles que des protéines, des acides nucléiques (Desai, Hunter, et Kapustin 2019; Reyes-Reyes, Teng, et Bates 2010), des peptides (Pang et al. 2014) ou encore des liposomes (Arwyn Tomos Jones 2007).

#### *1.2.1.3.2.4 Voies de pinocytoses alternatives*

La littérature rapporte l'existence de voies d'endocytose alternatives qui impliquent d'autres protéines spécifiques. Les GTPases jouent un rôle dans la régulation de certaines de ces voies d'entrées, classifiées comme dépendantes des protéines Arf6 (A. Venkataraman et al. 2012) (Figure 5 – voie 6), des protéines Cdc42 pour la voie CLIC/GEEC (Sabharanjak et al. 2002) (Figure 5 – voie 5) et des protéines RhoA pour la voie Rho/IL-2R (Grassart et al. 2008) (Figure 5 – voie 9). Enfin, d'autres voies impliquent des protéines telles que la flotiline (Figure 5 – voie 7) (Glebov, Bright, et Nichols 2006) et l'endophiline pour la voie FEME (Figure 5 – voie 8) (Boucrot et al. 2015) qui tapissent la face interne de la membrane plasmique pour induire la formation de vésicules, à l'image de ce qui peut être observé pour l'endocytose dépendante des cavéoles. À ce jour, les rapports démontrant l'implication de ces voies dans la livraison d'acides nucléiques sont assez rares et controversés (Rojek, Perez, et Kunz 2008; Martín et al. 2004; Glebov, Bright, et Nichols 2006; X. Chen et al. 2011; Vercauteren et al. 2011; Kasper et al. 2013; Nonnenmacher et Weber 2011; Heikkilä et al. 2010; Nishi et Saigo 2007). Cela s'explique par une découverte plus récente de ces voies et donc une connaissance moins détaillée de leur mécanisme, comparativement aux autres voies d'endocytoses.

#### **1.2.1.4 Facteurs déterminants les voies d'endocytoses utilisées**

Plusieurs publications démontrent que la pénétration cellulaire de nanoparticules par les voies d'endocytose est influencée par le type cellulaire et différents paramètres physico-chimiques tels que la taille, la charge, ou encore la forme (Rappoport 2008; J. Wang et al. 2011; S. Xiang et Zhang 2013).

##### **1.2.1.4.1 Taille**

De nombreuses publications caractérisent les différentes voies d'endocytose en fonction de la taille des particules pouvant être internalisées. La macropinocytose peut être exploitée pour livrer des particules de grandes tailles (jusqu'à 1  $\mu\text{m}$ ) (Joel A. Swanson 2008). L'endocytose dépendante des clathrines permet l'internalisation de particules ayant une taille de 10 à 300 nm (Ehrlich et al. 2004) alors que l'endocytose dépendante des cavéoles est capable d'internaliser des particules de taille variant entre 50 et 100 nm (Alexandre Benmerah et Lamaze 2007; Zhenjia Wang et al. 2009). Toutefois, la taille n'est pas le seul paramètre influençant les différents mécanismes d'endocytose (M. Huang et al. 2002; Massignani et al. 2009).

##### **1.2.1.4.2 Charges de surface**

La membrane plasmique est majoritairement composée de charges négatives (Cooper 2000b). Les nanoparticules cationiques sont donc susceptibles d'interagir plus fortement avec les cellules par des liaisons électrostatiques. Par ailleurs, il apparaît que les nanoparticules neutres ou anioniques sont internalisées dans les cellules de manière moins efficace (Asati et al. 2010). Des études ont rapporté que les nanoparticules anioniques entrent dans les cellules plus spécifiquement par endocytose dépendante des cavéoles tandis que les nanoparticules cationiques ou neutres pénètrent plus spécifiquement par endocytose dépendante des clathrines ou indépendantes des clathrines et des cavéoles. En ce qui concerne les particules neutres, aucune voie préférentielle n'a été mise en évidence pour pénétrer dans les cellules (Rejman, Bragonzi, et Conese 2005; Sahay et al. 2010; L. W. Zhang et Monteiro-Riviere 2009; Sahay, Batrakova, et Kabanov 2008).

##### **1.2.1.4.3 Hydrophobicité de surface**

La pénétration des polyplexes dans les cellules implique une étape d'adsorption à la membrane suivie par l'endocytose. L'adsorption désigne le phénomène de transfert de molécules d'un fluide sur une surface par l'intermédiaire de forces physiques et/ou chimiques. L'hydrophobicité est l'une de ces forces. Plusieurs publications décrivent l'utilisation de résidus hydrophobes greffés à des agents

chimiques en vue d'en améliorer l'efficacité de transfection via une affinité plus grande avec la membrane cellulaire. Cette stratégie a notamment été employée pour améliorer l'efficacité du PEI de très faible poids moléculaire (1,8 kDa). Ce type de PEI possède l'avantage d'être non toxique et de pouvoir être éliminé par l'organisme contrairement au PEI de 25 kDa. Toutefois, sa petite taille est responsable de son inefficacité en transfection à cause de sa faible charge cationique. Ainsi, l'ajout de résidus hydrophobes tels que du cholestérol ou de l'acide lipoïque au PEI de 1,8 kDa a permis d'égaliser le niveau de transfection du PEI de 25 kDa (Teo et al. 2013; B et al. 2016). De la même façon, le chitosan peut être modifié pour améliorer de 4 fois son efficacité de transfection (Cao et al. 2019; B. Wang et al. 2011). Néanmoins, la position des résidus sur le PEI ou le chitosan semble être un processus difficile à contrôler pour obtenir un produit homogène et ainsi garantir la reproductibilité de la transfection d'un lot à l'autre.

#### 1.2.1.4.4 Forme

La grande majorité des agents de livraison utilisée possède une forme sphérique, néanmoins quelques études tentent de comprendre l'impact de formes différentes sur la pénétration de la membrane et le transport intracellulaire (S. Venkataraman et al. 2011). À ce jour, les résultats obtenus sont contradictoires entre les différentes études. La capacité des formes cylindriques ou allongées à améliorer la pénétration cellulaire reste encore à déterminer (Gratton et al. 2008; X. Huang et al. 2010; J.-H. Park et al. 2008; Chithrani, Ghazani, et Chan 2006).

#### 1.2.1.4.5 Type cellulaire

Certaines protéines spécifiquement impliquées dans les différentes voies d'endocytose ne sont pas nécessairement présentes dans toutes les cellules. Par conséquent, des voies endocytaires peuvent être absentes de certains types cellulaires. C'est notamment le cas pour les cellules HepG2 qui n'expriment pas de cavéolines et qui sont donc incapables d'internaliser des nanoparticules par endocytose dépendante des cavéoles (Fujimoto et al. 2000).

## 1.2.2 Mécanismes du transport intracellulaire

### 1.2.2.1 Mécanismes de fuite des endosomes

À la suite de l'endocytose, les vésicules formées fusionnent généralement avec les lysosomes dont l'environnement conduit à la dégradation des molécules internalisées. Ce processus de dégradation est une étape normale et importante du métabolisme cellulaire où la rupture des endolysosomes est

le résultat d'un stress cellulaire. C'est la raison pour laquelle la libération de molécules bioactives de la voie lysosomale n'est pas une tâche facile lorsque l'on souhaite conserver la viabilité des cellules. Toutefois, diverses stratégies permettant la fuite des endosomes ont été mises à jour.

#### 1.2.2.1.1 Mécanismes viraux

Les virus et certaines bactéries pathogènes disposent de mécanismes extrêmement efficaces pour s'échapper des vésicules d'endocytose avant leur engagement dans la voie de dégradation lysosomale. Les virus, par exemple, libèrent leur matériel génétique dans les cellules en utilisant différentes stratégies de fuite des endosomes (Figure 6) qui dépendent de la nature de leur enveloppe (Mercer, Schelhaas, et Helenius 2010; White et Whittaker 2016). La diminution du pH à l'intérieur de l'endosome déclenche l'activation des mécanismes de fuite des endosomes du virus tels que la formation de pores, la fusion membranaire ou encore la déstabilisation de la membrane.

La fusion membranaire est la stratégie principalement utilisée par les virus enveloppés afin de fuir les endosomes et de libérer leurs composants viraux dans le cytoplasme (White et Whittaker 2016). On attribue généralement la responsabilité de ce processus au domaine de fusion des protéines d'enveloppes (Staring, Raaben, et Brummelkamp 2018). Sous l'environnement acide de l'endosome, la protéine de fusion subit un changement de conformation conduisant à l'insertion du domaine fusogénique hydrophobe dans la membrane de l'endosome. Cela aboutit à la fusion des membranes et la libération du matériel génétique du virus.

La formation des pores membranaires est une autre stratégie virale utilisée spécialement chez les virus non enveloppés pour fuir efficacement les endosomes. Les virus non enveloppés, ne possèdent pas, par définition de membrane phospholipidique mais une capsid de nature protéique. Il existe deux modèles (Yang et al. 2001) de formation des pores. Ces pores sont la conséquence de l'interaction de résidus hydrophobes ou amphiphiles de la capsid virale qui fusionnent avec la membrane de l'endosome (B. Tsai 2007; Wiethoff et al. 2005).

La déstabilisation membranaire implique des protéines spécifiques telles que le facteur de transcription du VIH nommé Tat (Torchilin et al. 2001) ou encore le peptide L2 du papillomavirus (Kämper et al. 2006). Les résidus arginine et lysine, chargés positivement, interagissent avec les charges négatives de la membrane de l'endosome conduisant à la pénétration des lipides membranaires et à la déstabilisation de la membrane ce qui facilite la livraison de gènes dans le cytoplasme.

Des nanoparticules ont été conçues en s'inspirant de peptides naturels provenant de bactéries (Akin et al. 2007; Mastrobattista et al. 2002) ou de virus (Joanne, Nicolas, et El Amri 2009). Ces développements s'inspirent notamment du peptide HGP (Ester J. Kwon, Liong, et Pun 2010) et du peptide Tat dérivés du VIH (Wadia, Stan, et Dowdy 2004), du peptide fusogénique de la protéine hémagglutinine du virus de la grippe (Wagner et al. 1992) ou encore du peptide L240 du papillomavirus (E. J. Kwon et al. 2008). Ces peptides naturels de pénétration ont également inspiré l'élaboration de peptides synthétiques pour améliorer la livraison cellulaire (Del'Guidice et al. 2018; Arwyn T. Jones et Sayers 2012; Stayton et al. 2000).

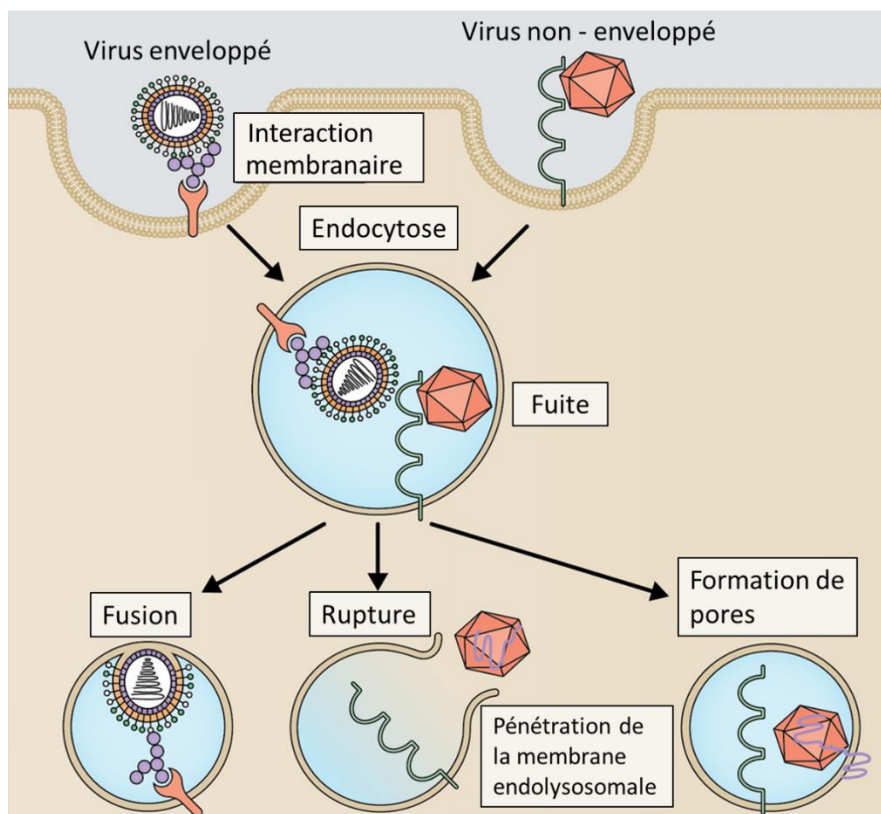


Figure 6 : Mécanismes de fuite des endosomes des virus. Adaptée de (Somiya, Liu, et Kuroda 2017).

#### 1.2.2.1.2 Mécanisme des polymères cationiques

Les vecteurs de livraison non viraux conventionnels font appel à d'autres types de mécanismes de fuite des endosomes. Ainsi, l'induction du phénomène dit d'éponge à protons a été mis en évidence lors de l'utilisation de certains polymères cationiques tels que le PEI, les dendrimères ou encore les polyamidoamines (Behr 1997; Boussif et al. 1995; Pack et al. 2005). À la suite de l'endocytose des polyplexes (Figure 7-A), les résidus amines du polymère cationique subissent une réaction de



protonation avec les protons présents dans l'endosome. Pour compenser cette perte de protons, les pompes à protons (ATPase) s'activent, ce qui conduit à une entrée massive de protons permettant l'acidification de l'endosome (Figure 7-B). Le pompage de protons est accompagné par l'entrée passive d'ions chlorures et de molécules d'eau dans l'endosome. La pression osmotique qui en résulte provoque le gonflement puis la rupture de la membrane endosomale, libérant ainsi les molécules endocytées (Figure 7-C). Ce mécanisme a été démontré expérimentalement (Sonawane, Szoka, et Verkman 2003).

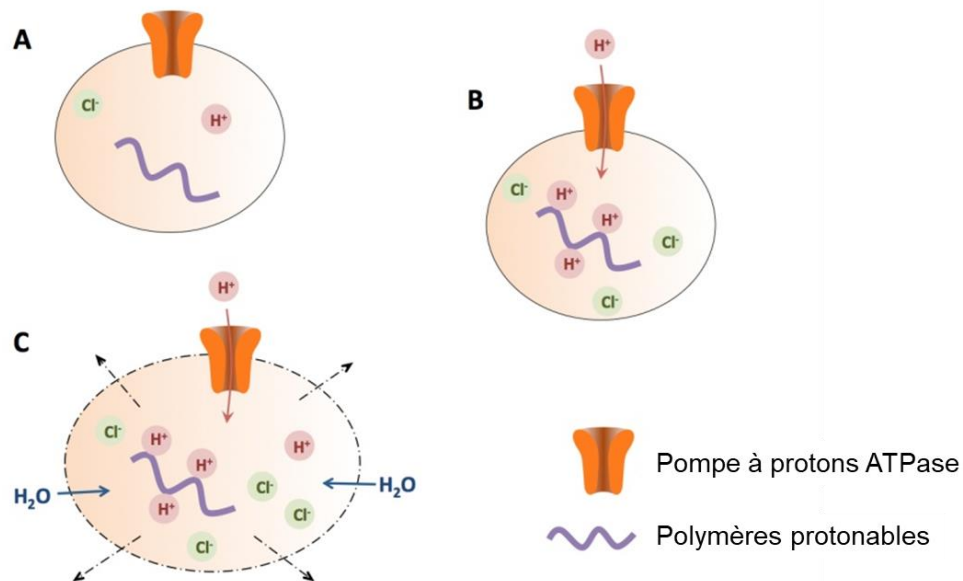


Figure 7 : Mécanisme : effet éponge à protons. Adaptée de (Liang et Lam 2012).

#### 1.2.2.1.3 Mécanisme des lipides cationiques

Un autre mécanisme appelé « flip flop », caractéristique des lipides cationiques permet aux complexes formés à partir de ces derniers, d'échapper à la dégradation de la voie endolysosomale. Il s'agit plus exactement d'un mécanisme de translocation latérale de lipides transmembranaires (Gurtovenko et Vattulainen 2007; Liang et Lam 2012). Les lipoplexes endocytés se retrouvent piégés dans les endosomes. (Figure 8-A). Des interactions électrostatiques entre les lipoplexes cationiques et les lipides anioniques de la membrane des endosomes conduisent à la diffusion latérale de la membrane des lipoplexes avec celle de l'endosome (Figure 8-B). Ainsi, les acides nucléiques sont relâchés dans le cytoplasme (Figure 8-C).

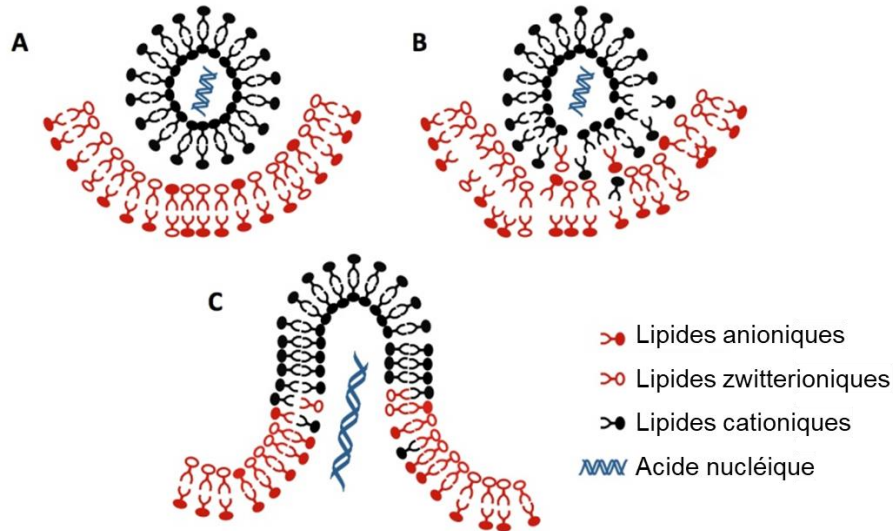


Figure 8 : Mécanisme 'flip flop' suggéré. Adaptée de (Liang et Lam 2012).

### 1.2.3.2 Transport cytoplasmique de l'ADN

Le cytoplasme est décrit comme une solution aqueuse gélifiée riche en protéines (100 mg/mL) et dont la concentration totale en macromolécules (protéines, lipides, acides nucléiques et sucres) est de 400 mg/mL (Zeskind et al. 2007). Même si la viscosité de la phase liquide du cytoplasme est légèrement plus dense que celle de l'eau (1,1 à 1,4 cP) (Fushimi et Verkman 1991), des expériences ont démontré que des ADN supérieurs à 2 000 pb ne pouvaient s'y déplacer par simple diffusion (Lukacs et al. 2000). Cela s'explique par la présence du cytosquelette constitué d'un enchevêtrement des filaments d'actines, de microtubules et de filaments intermédiaires qui forment un réseau de mailles complexes (Luby-Phelps 2000). Les fragments d'ADN incapables de diffuser dans le cytoplasme sont donc soumis à un transport actif jusqu'au noyau faisant intervenir la formation de complexes entre l'ADN et des protéines cytoplasmiques (Mesika et al. 2005; Salman et al. 2005; Vaughan, DeGiulio, et Dean 2006). Plus de 600 protéines différentes ont pu être retrouvées complexées à des plasmides seulement 15 minutes après leur transfection (Melissa A. Badding et al. 2013; Miller et al. 2009; Munkonge et al. 2009). Certaines de ces protéines se sont révélées être impliquées dans le transport via les microtubules (kinésine et dynéine), l'importation au noyau (importine, Crm1, RAN) ou encore des facteurs de transcriptions. De plus, d'autres études ont révélé que la formation de ces complexes ADN-protéines était dynamique, puisque certaines protéines s'associent temporairement tout au long du transport dans la cellule alors que d'autres peuvent y rester liées au moins 4 heures (Melissa A. Badding et al. 2013). Par ailleurs, l'interaction des plasmides avec les microtubules nécessite la présence de séquences nucléiques spécifiques reconnues par des facteurs de transcription. Par

exemple, les promoteurs du cytomégalo­virus (CMV) et du virus Simien 40 (SV40), couramment utilisés dans les plasmides d'expression, possèdent une séquence de liaison au facteur de transcription CREB, indispensable pour l'acheminement jusqu'au noyau (M. A. Badding, Vaughan, et Dean 2012).

### **1.2.3.3 Passage de la membrane nucléaire**

Des publications montrent que seulement 1 à 10 % des plasmides livrés par des méthodes non virales atteignent le noyau (Cohen et al. 2009; Glover et al. 2010). Il a été démontré que la livraison d'ADN plasmidique dans le noyau pouvait être grandement améliorée par l'ajout de séquences de localisation nucléaires (Dean 1997; Lam et Dean 2010). Ces séquences de localisation d'origine virale telles que la séquence DTS (DNA nuclear targeting sequence) du virus SV40 (Lange et al. 2007) sont reconnues par des protéines spécifiques (importines) dont le rôle est l'acheminement des ADN contenant ces séquences spécifiques, jusqu'au noyau de la cellule (Bai et al. 2017). Il existe également des séquences de signalisation cellulaire spécifiques des cellules musculaires (Young, Zimmer, et Dean 2008), des cellules-souches embryonnaires (Funabashi et al. 2010) ou encore des cellules épithéliales alvéolaires (Degiulio, Kaufman, et Dean 2010). D'autres méthodes pour améliorer l'importation nucléaire ont été développées et consistent à complexer, de manières covalentes ou électrostatiques, l'ADN avec des peptides de localisation nucléaire, des protéines nucléaires ou encore des importines (Bai et al. 2017). Par ailleurs, la pénétration nucléaire peut être effectuée par l'augmentation du diamètre des pores du noyau à l'aide d'un composé chimique : le transcyclohexane-1,2-diol (TCHD) (Griesenbach et al. 2012; Vanden Broeck et De Wolf 2006).

## **1.3 Gésicules**

Le terme « gésicule » est apparu pour la première fois pour décrire des nanovésicules cellulaires contenant dans leur membrane la protéine VSV-G (Mangeot et al. 2011). Ces gésicules sont produites à la suite de la surexpression des protéines VSV-G dans des cellules HEK293 et récoltées par ultracentrifugation du surnageant de culture. En présence de bromure d'hexadiméthrine, les nanovésicules générées sont capables de livrer efficacement de l'ADN plasmidique dans des cellules en culture (Okimoto, Friedmann, et Miyano­hara 2001).

### **1.3.1 Virus de la stomatite vésiculaire**

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus enveloppé appartenant au genre des vésiculovirus de la famille des Rhabdovirus. Son génome est un ARN de sens négatif codant

l'expression de 5 protéines structurales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine (G) et l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (L). Les extrémités 3' et 5' du génome sont des séquences reconnues par la polymérase du virus : 3' Leader (Le) et 5' Trailer (Tr) (Figure 9).

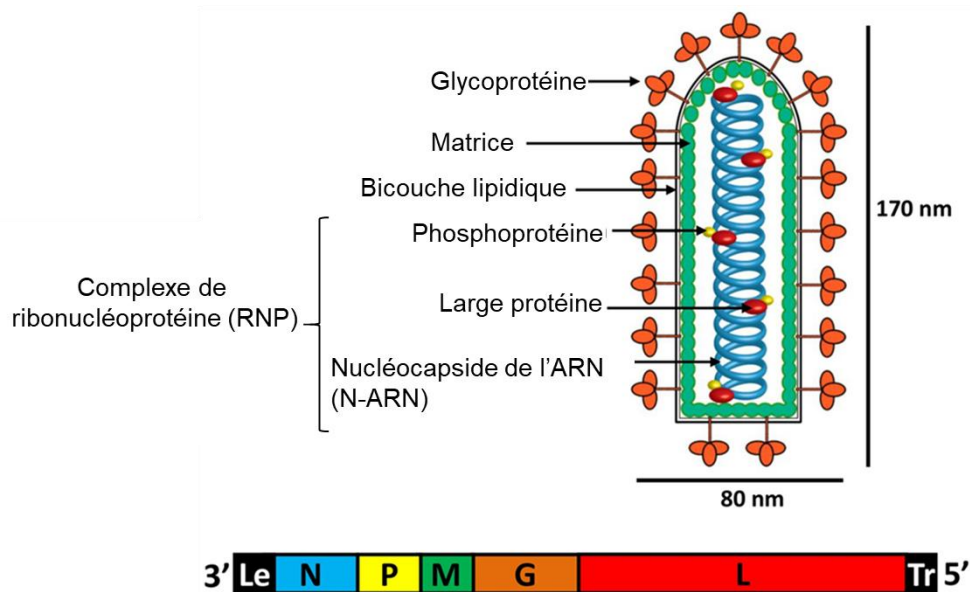


Figure 9 : Structure du VSV et organisation de son génome. Adaptée de (J. Li et Zhang 2012).

Ce virus est capable d'infecter les cellules de différents organismes tels que les mammifères ou encore les insectes. Chez l'homme, le VSV est considéré comme non pathogène. Le cycle de vie du virus est présenté à la figure 10. Brièvement, à la suite de l'interaction du VSV avec les récepteurs cellulaires (Figure 10 – Étape 1), le virus pénètre dans les cellules par endocytose (Figure 10 – Étape 2). Activée par le pH acide des endosomes, la protéine VSV-G permet à la membrane du virus de fusionner avec la membrane des endosomes, conduisant à la libération du complexe ribonucléoprotéique dans le cytoplasme (Figure 10 – Étape 3). Ce complexe contient tous les éléments pour permettre la réplication du virus. Le génome viral (ARN 3'-5') est dans un premier temps transcrit en six ARN 5'-3' : un ARN antigénomique complémentaire (Figure 10 – Étape 4) et 5 ARN messagers (Figure 10 – Étape 5) permettant chacun l'expression d'une protéine structurale (Figure 10 – Étape 6). Alors que la protéine G est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE), les autres protéines structurales sont synthétisées dans le cytoplasme. L'ARN antigénomique servira de matrice pour la synthèse de nombreuses copies de génomes viraux (Figure 10 – Étape 7) qui pourront être utilisés pour une

transcription secondaire (Figure 10 – Étape 8) ou être assemblés avec les protéines virales pour former de nouveaux VSV (Figure 10 – Étape 9). Ces virus sortiront de la cellule par bourgeonnement (Figure 10 – Étape 10).

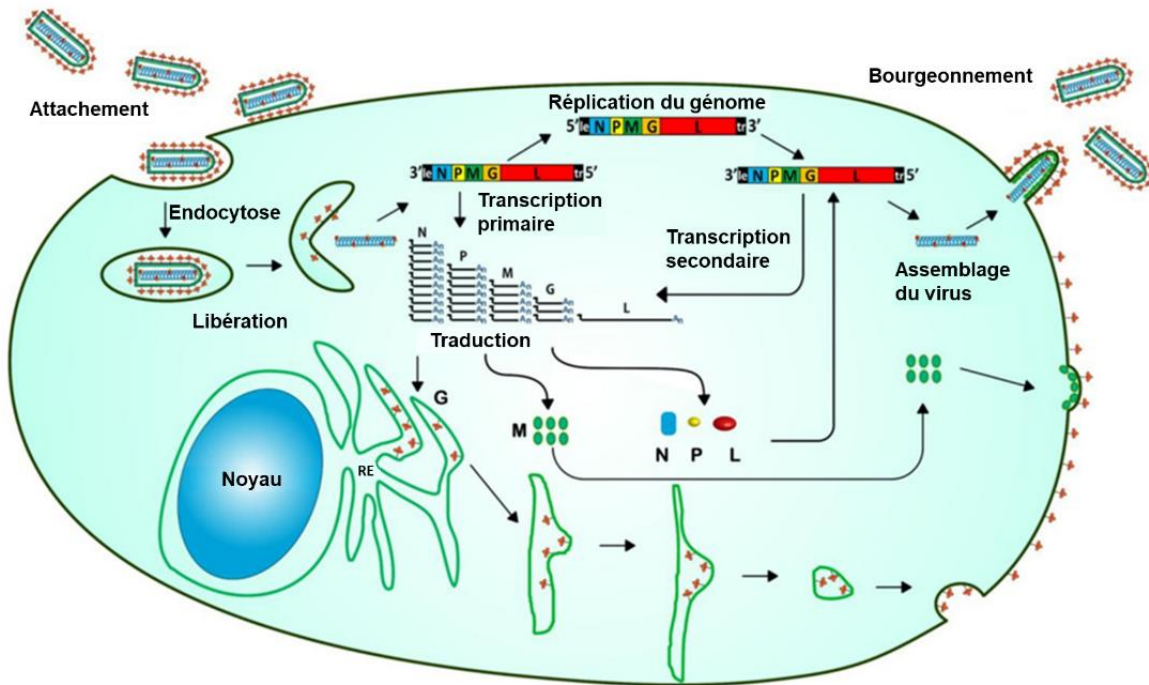


Figure 10 : Cycle de vie du VSV. Adaptée de (J. Li et Zhang 2012).

En raison de sa capacité à infecter l'homme et de son innocuité, le VSV est utilisé comme vecteur viral pour développer des traitements oncolytiques (Melzer et al. 2019; Bishnoi et al. 2018) et des vaccins comme par exemple contre la grippe (Furuyama et al. 2020) ou encore le VIH (Annexe C). Plusieurs essais cliniques sont en cours, concernant l'utilisation de vecteurs VSV contre les cancers ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Trial ID : NCT03865212 (2019), NCT03647163 (2018), NCT03865212 (2019), NCT03120624 (2017), NCT03017820 (2017)). Par ailleurs, un vaccin contre le virus Ebola à base de VSV a également été approuvé récemment par les autorités sanitaires américaines et européennes (Commissioner 2020; FRANCISCO 2019).

### 1.3.1.1 Structure du VSV-G

La protéine VSV-G est une protéine trimérique c'est-à-dire formée de trois séquences protéiques identiques (protomère) liées par des liaisons non covalentes. Chaque protomère est une séquence de 495 acides aminés avec une masse moléculaire de 56,8 kDa (souche Indiana). La majorité de la masse

de la glycoprotéine (extrémité N-terminale) est située à l'extérieure de la membrane du virus. La protéine VSV-G possède une conformation faisant apparaître quatre domaines (Figure 11) : un domaine riche en feuillet  $\beta$  (domaine I en rouge), un domaine central impliqué dans la trimérisation de la protéine (domaine II en bleu), un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine III en orange) et un domaine de fusion membranaire (domaine IV en jaune) inséré dans une boucle du domaine III. Les sites antigéniques majeurs sont situés dans le domaine I et III (Stéphane Roche et al. 2007) et constituent la cible pour les anticorps neutralisants. Au cours du processus de pénétration du VSV dans les cellules, la protéine VSV-G présente au moins deux conformations différentes (Clague et al. 1990; Gaudin et al. 1993). La conformation native (pré-fusion) qui est présente à la surface du virus lorsque le pH est supérieur à 7 et la conformation post-fusion à l'issue de la fusion avec les endosomes (Stéphane Roche et Gaudin 2002).

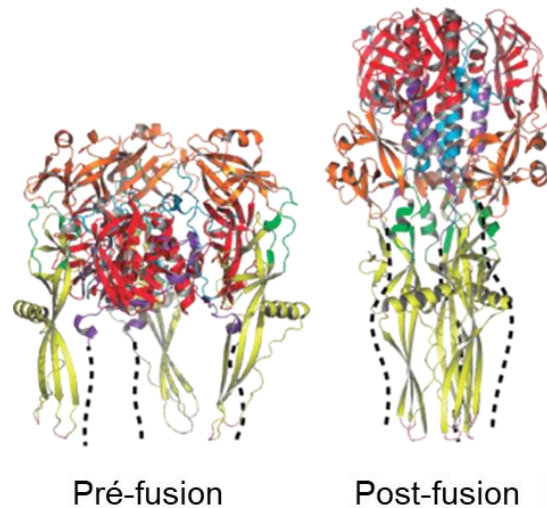


Figure 11 : Structure de la partie extracellulaire de la protéine VSV-G (trimère). Adaptée de (Stéphane Roche et al. 2007).

### 1.3.1.2 Tropisme et pseudotypage

Les principaux sérotypes de VSV, Indiana et New Jersey, sont endémiques des États-Unis et de l'Amérique Centrale et du Sud. Ces différentes souches de VSV possèdent un large tropisme puisqu'elles sont capables d'infecter différents organismes tels que les bovins, les porcs, les chevaux et autres mammifères alors que ses vecteurs de diffusion sont les insectes (Drolet et al. 2005; Hansen, Thurmond, et Thorburn 1985). Les preuves d'infection humaine au VSV avec une pathologie sont rares même si quelques cas ont été documentés chez des employés agricoles et de laboratoires (Reif et al.

1987). Dans la nature, le VSV peut être transmis aux mammifères par des vecteurs arthropodes tels que les mouches domestiques et les moustiques ou par contact direct avec des animaux infectés (Drolet, Stuart, et Demer 2009; Drolet et al. 2005; Mead et al. 2004). La protéine VSV-G joue un rôle fondamental lors de l'attachement du virus aux cellules et de la fuite des endosomes. (S. Roche et al. 2008; Albertini et al. 2012). Concernant l'attachement, des études ont démontré que les récepteurs lipoprotéines de faible densité (R-LDL) et d'autres membres de cette famille sont utilisés comme récepteurs par le VSV pour se fixer sur les cellules hôtes (Finkelshtein et al. 2013). La présence répandue de ces récepteurs dans les cellules du règne animal explique le large tropisme du VSV. C'est également la raison pour laquelle la protéine VSV-G est communément utilisée pour pseudotyper différents types de vecteurs viraux enveloppés destinés à la livraison de gènes tels que les rétrovirus (Ui et al. 1999), les lentivirus (Naldini, Blömer, Gallay, et al. 1996) ou encore les baculovirus (Kolangath et al. 2014). En effet, la plupart des vecteurs viraux enveloppés utilisés dans des études cliniques sont pseudotypés avec la protéine VSV-G (Biffi et al. 2013; Sessa et al. 2016). Les vecteurs pseudotypés avec cette protéine ont démontré une bonne capacité de transduction dans divers tissus tels que la rétine, l'épithélium respiratoire, le muscle, le cerveau ou encore le foie (Grüter et al. 2005; Kafri et al. 1997; Naldini, Blömer, Gallay, et al. 1996; Naldini, Blömer, Gage, et al. 1996). Enfin, des études montrent que les vecteurs viraux pseudotypés avec la protéine VSV-G sont généralement plus stables lors de la purification par ultracentrifugation (Ichim et Wells 2011) et donnent des titres plus élevés (Burns et al. 1993). Les avantages apportés grâce au pseudotypage par la protéine VSV-G sont d'ailleurs rapportés dans l'article de revue (Annexe A) sur les nouveaux développements des vecteurs lentiviraux (M. M. Segura et al. 2013).

#### **1.3.1.3 Mécanisme de fusion membranaire**

La protéine VSV-G est une protéine de fusion de type III (Florkiewicz et Rose 1984). À la suite de l'internalisation des VSV dans les endosomes précoces, la membrane virale et la membrane endosomale fusionnent rapidement, permettant ainsi au matériel génétique d'échapper à la dégradation de la voie lysosomale (Johannsdottir et al. 2009). Cette fusion se déroule en plusieurs étapes dans lesquelles la protéine VSV-G change plusieurs fois de conformation (Figure 12) sous l'influence des changements de pH pour retrouver son état initial dans des conditions de pH neutre (Stéphane Roche et Gaudin 2002). Immédiatement après l'endocytose, les monomères de la protéine VSV-G (bleu, jaune et vert) sont associés en trimères, enchassés dans la membrane du virus (Figure 12 – Étape 1). L'acidification naturelle de l'endosome provoque la protonation de chaque monomère



conduisant à un premier changement de conformation par le balancement vers l'extérieur des domaines III et IV de chaque monomère (Figure 12 – Étape 2). À la suite d'un mouvement de rotation du domaine d'homologie à la pleckstrine et des domaines III et IV, le domaine de fusion pénètre dans la membrane de l'endosome. À cette étape, les monomères sont dissociés les uns des autres (Figure 12 – Étape 3). Le retour à une structure trimérique s'en suit (Figure 12 – Étape 4). Les extrémités C-terminales du trimère, enchassées dans la membrane du virus, et les extrémités N-terminales fusionnées avec la membrane de l'endosome, se rejoignent (Figure 12 – Étape 5) pour aboutir à la fusion complète des deux membranes permettant la libération du contenu viral dans le cytoplasme (Figure 12 – Étape 6).

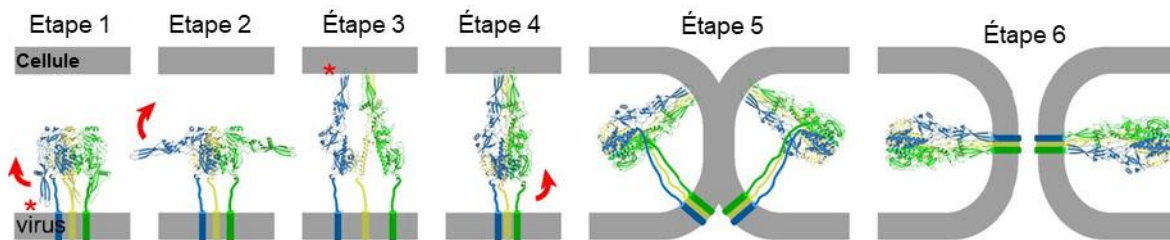


Figure 12 : Changement de conformation du VSV-G lors de la fusion membranaire. Adaptée de (I. S. Kim et al. 2017).

### 1.3.2 Capacités de livraison des gésicules

Plusieurs publications rapportent l'utilisation de gésicules pour livrer des protéines et des acides nucléiques. Comme mentionné précédemment, les gésicules sont formées par surexpression de la protéine VSV-G dans des cellules de mammifères et récupérées dans le surnageant de culture. Dans la grande majorité des cas, le matériel biologique à livrer est empaqueté à l'intérieur des gésicules. Pour ce faire, la littérature rapporte essentiellement deux méthodes, l'une consistant à utiliser une fusion avec une protéine structurale des gésicules (Kaczmarczyk et al. 2011; Robert, Lytvyn, et al. 2017; Zhitnyuk et al. 2018), l'autre misant sur l'incorporation aléatoire des molécules dans les gésicules (Mangeot et al. 2011). Classiquement, la protéine VSV-G ou la protéine Gag sont utilisées pour réaliser une fusion avec la protéine d'intérêt. Zhitnyuk et al. décrivent la production de gésicules capables d'incorporer de l'ARN codant pour la EGFP ainsi que le succès de sa livraison et de son expression dans des cellules-souches pluripotentes induites (Zhitnyuk et al. 2018). Le chargement des gésicules avec l'ARN est rendu possible par la présence d'une protéine ribosomale fusionnée à l'extrémité



cytoplasmique du VSV-G. Ainsi, les gésicules ont été obtenues par co-transfection de cellules HEK293T avec des plasmides codants pour une protéine ribosomale fusionnée au VSV-G et des plasmides permettant de fournir l'ARN messager de la protéine EGFP. La protéine Gag a également été utilisée pour réaliser une fusion avec des protéines d'intérêts afin d'incorporer ces dernières dans les gésicules. À la suite de son expression dans les cellules, la protéine Gag tapisse la face interne de la membrane plasmique au niveau des zones de bourgeonnement. Il a été rapporté qu'un seul lentivirus contient environ 5 000 copies de la protéine Gag (Aoki et al. 2011). Ce mécanisme a été exploité pour incorporer efficacement de nombreuses copies d'une protéine d'intérêt dans des gésicules en co-exprimant les protéines VSV-G, les protéines Gag fusionnées (Kaczmarczyk et al. 2011; Robert, Lytvyn, et al. 2017). Par ailleurs, la possibilité d'incorporer des protéines nucléaires dans les gésicules sans protéine de fusion a également été démontrée et rendue possible par l'ajout d'un signal de farnésylation dans la protéine d'intérêt (Mangeot et al. 2011). Actuellement, une trousse de production de gésicules incorporant un complexe ribonucléoprotéique CRISPR/Cas9 pour réaliser des expériences d'édition du génome est commercialisée par l'entreprise Takara (Campbell et al. 2019). Enfin, un article décrit l'utilisation de gésicules pour livrer de l'ADN sans incorporation préalable du matériel génétique au sein des nanovésicules. La méthode consiste à mélanger des gésicules et de l'ADN en présence de bromure d'hexaméthrine avant de déposer ce mélange sur les cellules à transfecter (Okimoto, Friedmann, et Miyano-hara 2001). Cette publication révèle que l'ajout de gésicules dans un mélange contenant des plasmides d'expression pour la luciférase et du bromure d'hexadiméthrine, permet de multiplier par 100 l'activité luciférase de cellules fibroblastiques de hamster (BHK) et de rat (208F) qui ont été mises en contact avec ce mélange. Cet effet a été spécifiquement attribué à la présence des gésicules puisque l'ajout, dans le milieu de culture, d'anticorps neutralisants dirigés contre la protéine VSV-G a permis de réduire considérablement l'activité luciférase des cellules incubées avec ce mélange. De plus, une expérience comparative à la méthode de transfection par précipitation au phosphate de calcium, révèle que cette méthode de livraison d'ADN utilisant des gésicules et du bromure d'hexadiméthrine est significativement plus efficace pour transfecter différents types cellulaires. Parmi ces cellules, on retrouve les lignées 3T3, HT1080 et 208F, connues pour être relativement difficiles à transfecter avec des lipides cationiques. Malgré le fait que la littérature rapporte encore peu d'informations sur leur utilisation et leur caractérisation, les gésicules apparaissent comme un outil très intéressant pour livrer efficacement divers types de biomolécules dans différents types cellulaires.

## 1.4 Conclusion de la revue de littérature

La livraison d'acides nucléiques est un procédé devenu essentiel en recherche biomédicale et est une approche qui gagne de plus en plus d'intérêt pour le traitement de plusieurs pathologies dont les maladies monogéniques et les cancers. Plusieurs méthodes de livraison existent déjà mais beaucoup d'autres sont en cours de développement ou d'optimisation. Qu'elles soient biologiques, physiques ou chimiques, ces méthodes de livraison exploitent les propriétés biochimiques des cellules et des acides nucléiques. La méthode de livraison idéale doit être efficace, non toxique, biocompatible, biodégradable et non immunogène. Malheureusement, chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients en raison de la diversité et de la complexité des applications et des types cellulaires. L'optimisation et le développement de nouveaux outils de livraison passent notamment par la compréhension des mécanismes entourant le transfert de gènes. La mise au point de méthodes de livraison toujours plus performantes constitue un enjeu majeur pour accélérer la recherche et le développement de traitements thérapeutiques. Dans ce sens, l'élaboration de vecteurs hybrides s'inspirant notamment des virus et combinant les avantages de plusieurs autres méthodes de livraison existantes est une solution très prometteuse pour élaborer des procédés de livraison plus performants. Les particules pseudo-virales figurent parmi les éléments particulièrement intéressants pouvant être intégrés dans la conception de méthodes hybrides. En effet, ces particules peuvent être générées pour mimer la structure et la composition de divers virus afin d'utiliser certaines propriétés qui ont été naturellement optimisées avec l'évolution, telles que le tropisme, la pénétration cellulaire, la fuite des endosomes ou encore le cheminement jusqu'au noyau de la cellule. Par ailleurs, ces particules pseudo-virales peuvent être couplées avec des polymères, des peptides et lipides pour former des structures plus complexes en vue d'améliorer leurs fonctionnalités. Parmi ces particules pseudo-virales on retrouve les gésicules, qui ont démontré un potentiel très intéressant pour livrer des acides nucléiques dans différents types cellulaires et ce, de deux manières différentes. La première consiste à charger le matériel génétique à livrer, à l'intérieur des gésicules pendant ou après leur production. Néanmoins cette méthodologie complique la mise en œuvre du procédé de livraison. La seconde consiste à former des complexes entre les gésicules et les acides nucléiques en présence de bromure d'hexadiméthrine. C'est cette dernière méthode qui a retenu notre attention car, pour des applications *in vitro et ex vivo*, elle apparaît plus facile à mettre en œuvre, versatile et permet de contrôler facilement la quantité d'acides nucléiques à livrer.

## 1.5 Objectifs de la thèse

Cette thèse de doctorat, s'intéresse à l'utilisation des gésicules pour la livraison d'acides nucléiques ou gésification. En présence de bromure d'hexadiméthrine, les gésicules sont capables de livrer des plasmides d'expression plus efficacement que la méthode de transfection par précipitation au phosphate de calcium. Par ailleurs, la gésification s'est montrée efficace sur plusieurs types cellulaires connus pour être difficiles à transfecter. Cette thèse s'articule autour de trois objectifs spécifiques dans le but global de développer et de caractériser l'utilisation des gésicules pour la livraison d'acides nucléiques dans les cellules de mammifères.

**Objectif 1 : Identification des conditions optimisées pour produire et utiliser les gésicules afin de livrer des acides nucléiques.** Les résultats obtenus ont permis d'aboutir à l'élaboration d'un protocole simplifié garantissant une production de gésicules efficaces pour livrer des acides nucléiques. Par ailleurs, la capacité de la gésification à livrer des plasmides dans des cellules primaires (cellules réfractaires) a été démontrée. Enfin, les expériences ont permis de mettre en évidence la versatilité de la gésification en étant capable de livrer également de l'ARN. L'ensemble de ces résultats ont abouti à la rédaction d'un article scientifique qui a été soumis dans le journal « Molecular Biotechnology ».

**Objectif 2 : Caractérisation des gésicules.** Ces expériences ont permis de confirmer la formation d'un complexe de transfection entre les gésicules, le bromure d'hexadiméthrine et les plasmides. Par ailleurs, les analyses protéomiques ont révélé la présence de nombreuses et diverses protéines associées aux gésicules dont trois d'entre elles sont de nature oncogénique. La connaissance du contenu des gésicules pourrait permettre d'orienter les futures optimisations du mode de production en matière de type cellulaire et d'ingénierie des cellules pour diminuer les facteurs de risques en vue d'applications thérapeutiques futures.

**Objectif 3 : Identification des mécanismes impliqués dans la pénétration et le transport intracellulaire.** Les cellules possèdent différentes barrières qui freinent et empêchent le passage et le cheminement des acides nucléiques. La compréhension des mécanismes de la gésification aidera à identifier les facteurs limitants pour améliorer la méthode. Par exemple, l'amélioration de la liaison des complexes de transfection et des vecteurs viraux aux microtubules ou l'utilisation de protéines spécifiques pour contourner les facteurs de restriction cellulaires, sont des stratégies qui ont permis d'améliorer l'efficacité de la livraison d'autres agents de livraison (Anderson et Hope 2005; Khalil et al. 2006;

Pichon, Billiet, et Midoux 2010). À ce jour, aucun mécanisme cellulaire n'a été décrit concernant le processus de livraison d'acides nucléiques utilisant la gésifection. L'objectif est donc d'identifier les mécanismes impliqués dans le processus de gésifection pour faciliter l'optimisation de la méthode.

## **Chapitre 2 : Production and use of vesicles for nucleic acid delivery**

Mathias Mangion<sup>1,2,3</sup>, Marc-André Robert <sup>1,2,3,4</sup>, Igor Slivac<sup>1,2,3</sup>, Rénaud Gilbert<sup>3,4</sup>, Bruno Gaillet<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Chemical Engineering Department, Laval University, Québec, Canada

<sup>2</sup>-PROTEO : The Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering

<sup>3</sup> ThéCell : FRQS Cell and Tissue Therapy Network

<sup>4</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

## 2.1 Résumé

La surexpression de la glycoprotéine de surface du virus de la stomatite vésicules (VSV-G) dans les cellules de mammifères peut induire la formation de particule pseudo-virales pseudotypées par le VSV-G (appelées gésicules). Son utilisation en tant qu'outil de livraison d'acides nucléiques est encore peu documentée. Un plasmide peut être complexé avec les gésicules grâce à du bromure d'hexadiméthrine et être livré dans des cellules animales (gésification) pour obtenir une expression protéique ectopique. Cependant, peu d'informations sont connues concernant les paramètres de production de gésicules, leur condition de complexation avec l'ADN et leur efficacité pour livrer des acides nucléiques. Dans cette étude, la production de gésicules en cellules HEK293 a été optimisée en définissant la concentration du plasmide VSV-G, le ratio massique ADN:PEI et le temps de récolte des particules. De plus, un ensemble de paramètres impliqués dans la formation du complexe de gésification a été évalué pour définir un protocole d'utilisation simple et efficace. Les cycles de congélation / décongélation et la conservation à + 4 °C, - 20 °C, - 80 °C n'ont pas diminué la capacité des gésicules à livrer des plasmides. Des efficacités de transfection de 55% et 22% ont été obtenues pour les cellules HeLa et pour des cellules difficiles à transfectées telles que des myoblastes humains, respectivement. Pour la première fois, les gésicules ont été utilisées pour livrer un large plasmide (18 kb) avec une efficacité de 42% et un ARN interférant pour éteindre l'expression du gène de la protéine eGFP (60% d'inhibition). En conclusion, les gésicules sont des agents bio-actifs attrayant, ayant un grand potentiel pour améliorer la livraison d'acides nucléiques en recherche biomédicale.

## 2.2 Abstract

Over-expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVG) in mammalian cells can induce the formation of VSVG-pseudotyped vesicles (named “gesicles”) from membrane budding. Its use as a nucleic acid delivery tool is still poorly documented. Naked-plasmid DNA can be delivered in animal cells with gesicles in presence of Hexadimethrine bromide (polybrene). However, little is known about gesicle manufacturing process and conditions to obtain successful nucleic acid delivery. In this study, gesicles production process using PEI transfected HEK293 cells was developed by defining the VSVG-plasmid concentration, the DNA:PEI mass ratio, and the time of gesicle harvest. Furthermore parameters described in the literature relevant for nucleic acid delivery such as : i) component concentrations in assembly mixture, ii) component addition order, iii) incubation time and iv) polybrene concentration, were tested by assessing the transfection capacity of the gesicles complexed with a GFP-coding plasmid. Interestingly, freezing/thawing cycles and storage at +4 °C, -20 °C and -80 °C did not reduce gesicles’ ability to transfer plasmid DNA. Transfections efficiency of 55% and 22% was obtained for HeLa cells and for hard-to-transfect cells such as human myoblasts, respectively. For the first time, gesicles were used for delivery of a large plasmid (18-kb) with 42% of efficiency and for eGFP gene silencing with siRNA (up to 60%). In conclusion, gesicles represent attractive bioreagents with great potential to deliver nucleic acids in mammalian cells.

## 2.3 Introduction

Nucleic acid delivery (NAD) technologies [1-4] can be separated into three groups namely viral methods, non-viral methods and hybrid methods using virus mimicry [5]. NAD applications concern all fields of biomedical research including cell reprogramming, genome editing and gene expression. Evolution made viruses very efficient for NAD in cells and their engineering eventually led to therapeutic products approval [6-8]. However, viral vector application still suffers from limitations related mostly to high safety requirements [9, 10]. Hence, non-viral methods using metallic-particles, cationic and lipid polymers as well as electroporation are routinely used for NAD [11]. Despite their ability to transfer DNA and RNA with relatively high efficiency into many cell lines [12], these methods were shown inadequate for some cells, including primary cells and induced Pluripotent Stem cells [13]. Nevertheless, non-viral NAD treatments are better characterized and free of potentially harmful contaminants that may induce adverse reactions in clinical applications.

An alternative approach comprises development of hybrid gene delivery agents with complementing properties from both viral and non-viral NAD strategies. In this way, mimicking the viral ability of cell penetration and endosomal escape has been exploited. For example, the envelope glycoprotein G (VSVG) of the vesicular stomatitis virus (VSV) is commonly used for pseudotyping retroviral (Rv) and lentiviral (Lv) vectors [14], conferring wide tropism [15] and better stability. VSV is an enveloped RNA virus that buds from its host cells after the virion component assembles on the inner side of cell membrane at the activating budding site [16-19]. Each VSV particle contains approximately 1,200 molecules of VSVG across the viral envelope [19]. VSVG plays a critical role during the early steps of virus infection by binding specific cellular receptors and inducing endocytosis [15, 20-22]. In late endosomes, VSVG triggers the endosomal escape of viral content by the viral envelope fusion with the endosomal membrane. [23-25]. In the last twenty years, there have been few reports on transfection and overexpression of VSVG coding gene in cell culture where vesicles containing VSVG (called “gesicles”) were released in culture media by outward budding of the cell membrane [26-32].

It has been shown previously that gesicles could incorporate different proteins from their producing cells [28, 33, 34] and as such be used for genome editing [35, 36] and modification of gene expression [28] in their target cells. Previous works reported also gesicles capacity to associate with lipids and with pre-formed liposomes [37-39]. These results led researchers to use gesicles for improved lipofection [26]. Moreover, gesicle complexation with naked DNA in presence of cationic polymer Hexadimethrine



bromide better known as polybrene (commercial brand) has resulted in greater cell transfection efficacy compared to the calcium-phosphate based method [29].

However, conditions to achieve efficient vesicle production and nucleic acid delivery using these particles are largely unknown. In this study, we have developed a vesicle production process by transient transfection of adherent HEK293 cells using polyethylenimine (PEI) as transfection reagent, which is the most widely used for large scale manufacturing of several viral vectors (Lv and adeno-associated vectors). Different parameters known to be critical in nucleic acid delivery were also tested i) DNA and vesicles concentration, ii) incubation time of components, iii) polybrene concentration and iv) order of component addition. Vesicle bioactivity for NAD was also assessed once the vesicles had undergone several freeze/thaw cycles or long storage at +4 °C, -20 °C and -80 °C. Transfection assays using DNA, vesicles and polybrene were carried out on human myoblasts, known to be hard-to-transfect cells with conventional transfection reagents [40-42]. Finally, an efficient vesicle based delivery of large plasmid (18-kb) and siRNA was demonstrated for the first time.

## **2.4 Materials and methods**

### **2.4.1 Construction of plasmids used in this study**

All restriction enzymes were from New England Biolabs. The pKCMV5/GFP plasmid expressing the green fluorescent protein (GFP) regulated by the cytomegalovirus (CMV5) promoter [43, 44] was constructed as follows. The expression cassette CR5/B43 containing the polyadenylation (polyA) signal was removed by sequential digestion using BamHI and Ascl enzymes from pKCR5/B43 [45]. The expression cassette CMV5/GFP containing polyA was isolated from pMPG/CMV5/GFP [44] after PacI digestion. Following a blunt reaction, the pK vector backbone and the GFP cassette expression were ligated. The pKCMV5/VSV-G plasmid expressing the vesicular stomatitis glycoprotein (VSV-G) was generated as follows. The GFP sequence was removed from pKCMV5/GFP by BamHI digestion. The VSV-G sequence was isolated by BglII digestion of pKCR5/VSV-G (gift from Dr. Bernard Massie, National Research Council Canada, Montréal, Canada). The VSV-G sequence and the pKCMV5 backbone vector were ligated by cohesive ends. The large plasmid of 18-kb pCGB/GFP contains an expression cassette consisting in the CAG promoter, the GFP sequence, the rabbit  $\beta$ -globin poly and the human dystrophin cDNA sequence used as stuffer DNA [46].

## 2.4.2 Cell culture

HEK293 and HeLa cells were obtained from the American Type Cell Culture (CRL-1573<sup>TM</sup> and CCL-2<sup>TM</sup>, respectively). They were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all purchased from Hyclone<sup>TM</sup>). The human adult myoblast cells (gift from Pr. Jacques-P. Tremblay, Laboratory of human genetic unit, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada) were grown in a home-made medium supplemented with 10% FBS. All cells were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell density and cell viability were determined by direct counting of cell samples with microscope using the trypan blue exclusion method except for myoblasts, where the viability was assessed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay described below.

## 2.4.3 PEI transfection

The 25 kDa linear PEI were obtained from Polysciences. A stock solution (1 mg/mL) was prepared in double-distilled water (ddH<sub>2</sub>O). The day before the transfection, 24-well plates or 150 mm culture dishes were seeded at 8x10<sup>4</sup> per well or 6x10<sup>6</sup> cells, respectively. Two hours before transfection, cells were around 70% of confluence and the medium was replaced by fresh medium. DNA and PEI, prepared in separate tubes, were mixed in 10% of the final culture volume. The mix was vortexed then incubated for 10 min at room temperature before addition to the cells.

## 2.4.4 Harvest and concentration of gesicles

The day before transfection, 150 mm cell culture dishes were seeded at 6x10<sup>6</sup> of HEK293 cells. The cells were transfected as described in the section *PEI transfection* using 1.5 µg/mL of pKCMV5/VSV-G and a DNA:PEI mass ratio of 1:2. Two and three days post-transfection, the culture media containing the released gesicles were centrifuged at 3 500 g for 15 min at 4 °C and filtered through a 0.45 µm low binding protein filter to remove cell debris. Then, gesicles were concentrated by ultracentrifugation at 28,000 rpm for 3 h at 4 °C on a 25% sucrose cushion. The supernatant was removed and the pelleted material (containing gesicles) was incubated overnight in PBS at 4 °C. The following day, the gesicle pellet was gently suspended by shaking the tube and ultracentrifuged again using the same conditions described above (washing step). Finally, the gesicle pellet was incubated overnight in fresh PBS at 4 °C. Concentration of total proteins was determined using DC<sup>TM</sup> protein assay (Bio-Rad) then adjusted

to 1 µg/µL before aliquoting for storage at -80 °C. Note that the concentrations or quantities of gesicles notified in the text correspond to total proteins.

#### **2.4.5 Western blot analysis**

Equal volumes of suspended gesicles were mixed with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) loading buffer at 1X final concentration and heated for 3 min at 95 °C. Proteins were resolved on 4-20% Tris-glycine NuPAGE® gradient gels (Invitrogen – Thermo Fisher). Then, the proteins were electro-transferred to a nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare Life Sciences). A HRP-conjugated monoclonal antibody specific to VSVG ([P5D4], Abcam) was used at 1/1 000 dilution, and Amersham™ ECL reagent (GE Healthcare Life Sciences) was used for revelation. The chemiluminescent signal was acquired using an ImageQuant LAS 4000 instrument (GE Healthcare Life Sciences).

#### **2.4.6 DNA delivery cell assay using gesicles**

The day before transfection, HEK293 cells were seeded in 24-well plates at  $8 \times 10^4$  cells per well. Two hours before DNA delivery, the medium was replaced by 200 µL of fresh medium in each well. A polybrene solution (Sigma-Aldrich) was prepared in ddH<sub>2</sub>O at 1 mg/mL. In the standard protocol, the mixtures composed of gesicles, pKCMV5/GFP and polybrene at the standard concentration of 2.5 µg/mL, 1 µg/mL and 8 µg/mL, respectively were prepared in 200 µL of DMEM and incubated for 30 min. The mixtures were added to the HEK293 cells making the final volume of 400 µL per well. The GFP expression of transfected cells was analyzed 24 h post-transfection by flow cytometry.

#### **2.4.7 siRNA-gesicle delivery assay**

The day before transfection, 24-well plate were seeded at  $8 \times 10^4$  HEK293 cells per well. To generate reporter cells, 0.75 µg/mL of pCMV/eGFP (Clontech) plasmid was transfected with a DNA:PEI mass ratio of 1:2 as described above. Three hours after DNA-PEI complexes addition, the culture medium was removed and the cells washed with fresh medium. Incubation of cells in 200 µL of fresh medium took another 2 hours. During that time, the gesicles were mixed with the Silencer® eGFP siRNA or the negative control siRNA (Invitrogen Life Technologies) in 200 µL of OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) and 8 µg/mL of polybrene. After 1 h incubation at room temperature, the mixtures were added to the cells. GFP expression was detected 24 h later by flow cytometry. The % of inhibition was calculated as follows =  $100\% - 100 * (\text{transfection efficiency with eGFP siRNA} / \text{transfection efficiency with negative control siRNA})$ .

### **2.4.8 GFP analysis by flow cytometry**

Cells were harvested 24 h post-transfection by trypsin treatment and filtered through 310 µm mesh Nitex tissue (Sefar Group) to remove aggregates. GFP expression was detected by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 50-mW argon-ion laser and a 90% attenuated 530/30 bypass filter. At least 10 000 viable cells were analyzed. Two parameters were used to analyze the transfection efficiency: the percentage (%) of GFP-positive cells and the fluorescence index calculated as follows: [% of cells expressing GFP] x [the mean fluorescence intensity of the cells]. Data are representative of two independent experiments performed in duplicate.

### **2.4.9 Cell Viability assay**

For myoblast cells, viability was measured by the MTT reduction assay. The experiment was done 24 h after vesicle-mediated transfection. The medium was replaced by 200 µL of complete medium containing 0.45 mg/ml of MTT solution. Following a 2 h incubation at 37 °C, 200 µL of solubilization solution (dilute 40% (v/v) DMF in 2% (v/v) glacial acetic acid, add 16% (w/v) SDS, pH 7.4) were added to the cells. Proper homogenization was made to completely dissolve formazan crystals. 100 µL were transferred in 96-well plate for reading absorbance at 570 nm. For HeLa cells, viability was determined by direct counting of cell samples with microscope using the trypan blue exclusion method. Data are representative of at least two independent experiments done in duplicate.

### **2.4.10 Statistical analysis**

The probability of significance between two groups or multiple groups was determined using Student's t-test or analysis of variance, respectively. P-value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

## **2.5 Results**

### **2.5.1 Optimization of HEK293 cell transfection with PEI**

To optimize the transfection conditions, four different pKCMV5/GFP concentrations (0.5, 1, 1.5, 2 µg/mL) at four different DNA:PEI mass ratios (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) were evaluated. One day after transfection, HEK293 cells were analyzed for GFP expression by flow cytometry. The results showed that the best transfection efficiency was achieved with pKCMV5/GFP concentration of 1.5 µg/mL, with no significant benefit from higher plasmid concentration (2 µg/mL). Of four tested DNA:PEI ratios, the

last three gave the best efficiency. Overall, the transfection conditions considered optimal were 1.5 µg/mL of plasmid complexed with PEI at mass ratios of 1:2 or 1:3. These conditions gave 71 and 76% of GFP-positive cells, respectively (Fig 13-A).

### **2.5.2 Optimization of gesicle production**

Based on the data obtained from GFP expression described above, gesicle batches were produced using 1.5 µg/mL of pKCMV5/VSVG and DNA:PEI mass ratios of 1:2 and 1:3. The empty plasmid pKCMV5 was used as negative control. Gesicles were concentrated and re-suspended in identical volume of PBS. Samples taken from these solutions were analyzed by western blot with anti-VSVG antibody. A specific band corresponding to VSVG size (57 kDa) in both transfection conditions with pKCMV5/VSVG was observed. As expected, no band was detected in the negative control samples (Fig 13-B). Moreover, the highest band intensity was observed for DNA:PEI mass ratio 1:2, suggesting that more gesicles were produced at this condition, and/or more VSVG molecules were integrated per gesicle. Then, DNA transfection capacity of gesicles produced by polyfection was tested. Concentrated gesicles were incubated with pKCMV5/GFP and polybrene for 30 min before addition to HEK293 cells. Transfection efficacy using gesicles produced from 1.5 µg/mL of pKCMV5/VSVG with the 1:2, 1:3 and 1:4 DNA:PEI mass ratio was efficient demonstrating the bioactivity of these particles. (Fig 13-C). Kinetics of production were performed in order to identify the optimal time for gesicle harvest after transfection. Gesicle production was carried out in a batch-replacement cell cultivation mode by harvesting and replacing culture media every day for four consecutive days (starting 24 hours post-transfection). This mode was chosen because media replacement has a positive effect on recombinant protein and VSVG-pseudotyped Lv productivity [47-48]. The gesicles were concentrated from supernatant and diluted in the same volume of PBS. Equal volumes of concentrated gesicles were analyzed by western blot using an anti-VSVG-antibody. A single band corresponding to VSVG (57 kDa) was observed in all conditions. The bands with the highest intensity were observed on day 2 and 3 indicating the highest VSVG production and suggesting the best timing for gesicle harvest (Fig 13-D). In addition, syncytia were observed with the microscope due to VSVG fusogenic activity [49]. Cells started to detach from the plate on the fourth day post-transfection, suggesting increased cell mortality (data not shown).

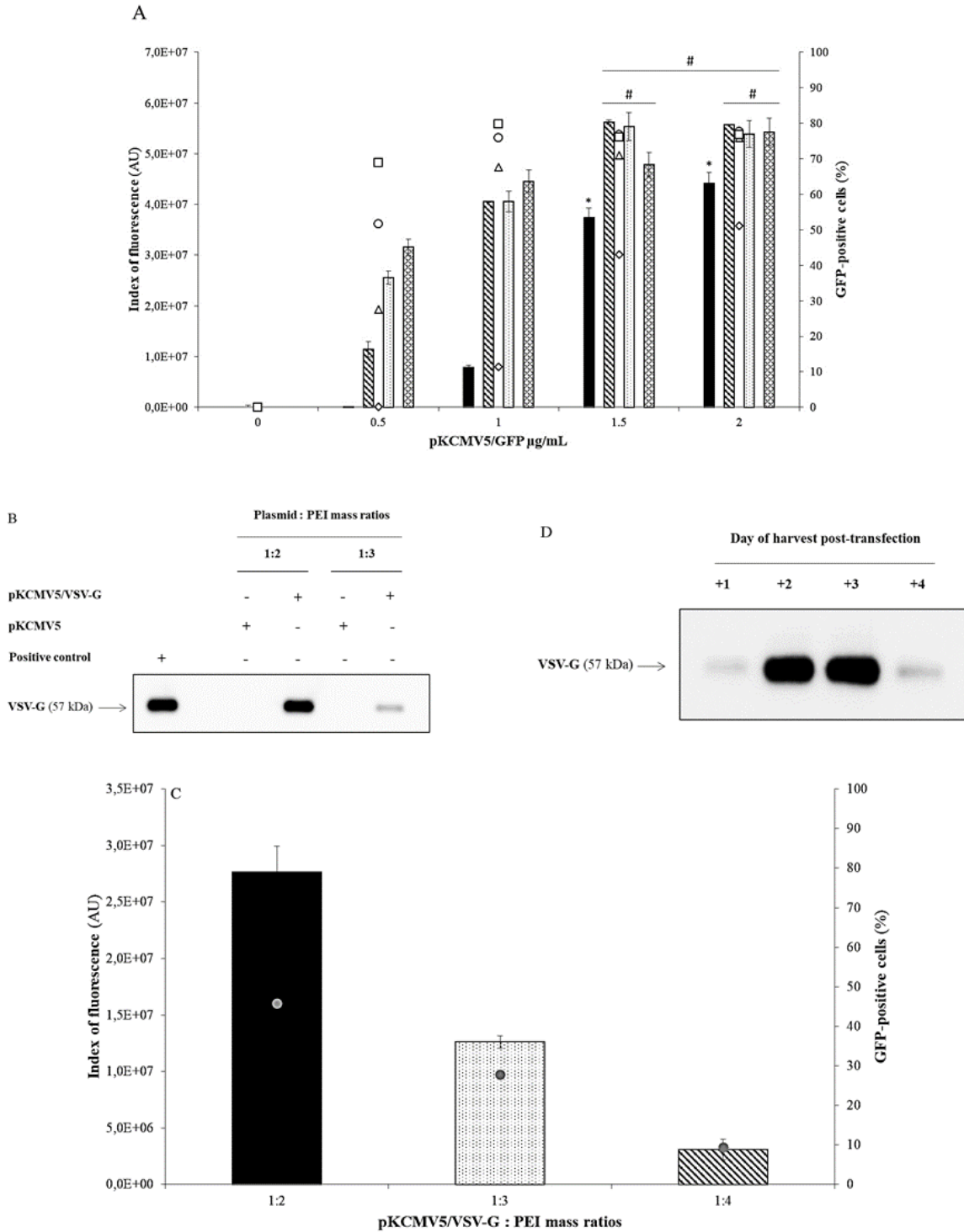


Figure 13 : Optimization of parameters for vesicle production.

(A) Transfection optimization of HEK293 cell with pKCMV5/GFP using PEI. Different concentrations of pKCMV5/GFP (x axis) as well as different DNA:PEI mass ratios = 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 were evaluated. Fluorescence index: 1:1 (■), 1:2 (▨), 1:3 (▩) and 1:4 (▧); GFP positive cells: 1:1 (◇), 1:2 (△),

1:3 (○) and 1:4 (□). (B) Analysis of VSVG produced using the best transfection conditions determined previously (pKCMV5/GFP = 1.5 μg/mL, DNA:PEI mass ratios = 1:2 and 1:3). Gesicles produced in different conditions were isolated from culture media and analyzed by western blot. The backbone vector (pKCMV5) was used as negative control. (C) Transfection efficiency using standard conditions with gesicles produced from different DNA:PEI mass ratios. Fluorescence index (bars), GFP positive cells (circles) (D) Kinetics of gesicle production. Cells were transfected with 1.5 μg/mL of pKCMV5/VSVG complexed with PEI at DNA:PEI mass ratio 1:2. The gesicles were harvested and concentrated to the same final volume each of the four days of cell cultivation. The samples of gesicle were analyzed by western blot. \*Statistically different ( $p < 0.05$ ). # not statistically different.

### **2.5.3 Gesicle transfection properties**

Different concentrations of gesicles produced by polyfection were used to transfer pKCMV5/GFP into HEK293 cells in presence of polybrene. Flow cytometry analysis revealed that the gesicles were successful in DNA delivery reaching 70% efficiency (Fig 14-A). In addition, we confirmed that gene transfer occurs only when gesicles are incubated with DNA in the presence of polybrene [29] (Fig 14-B).

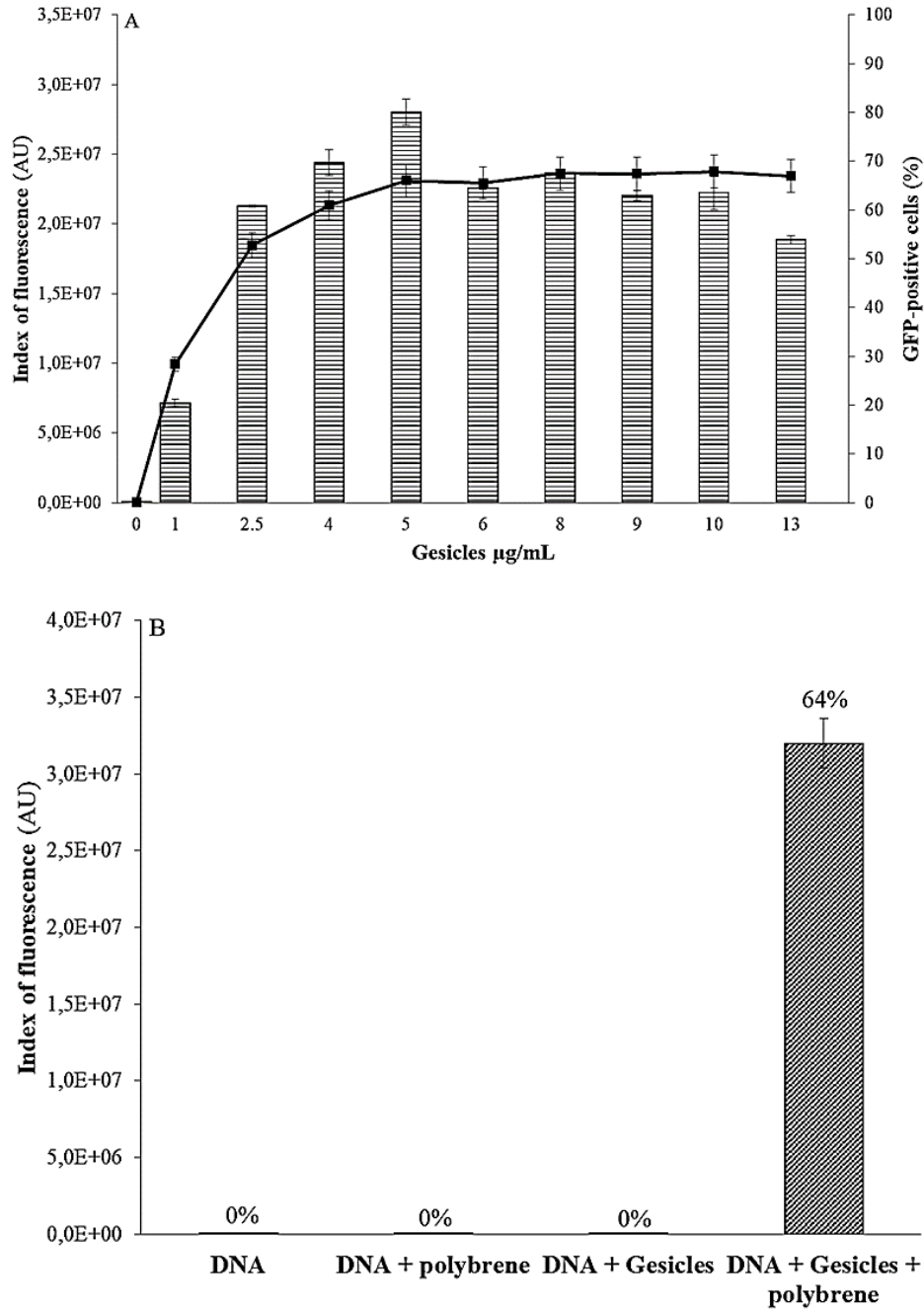


Figure 14 : DNA delivery in HEK293 cells using gesicles.

(A) Different concentrations of gesicles were incubated with fixed concentration of polybrene (8  $\mu\text{g/mL}$ ) and pKCMV5/GFP (1  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) Mixtures composed of standard concentrations of gesicles and/or polybrene and/or pKCMV5/GFP were incubated before their addition to the cells. Fluorescence indexes (bars) and % of GFP positive cells (squares or indicated on the top of the bars).



## 2.5.4 Identification of optimal conditions for cell transfection using gesicles

Several factors known to influence nucleic acid delivery efficiency in animal cells were investigated on HEK293 cells.

*Volume of transfection mixtures.* DNA, gesicles and polybrene were mixed together and incubated in 50% (1X) and 10% (5X) of their final volume. After 30 min of incubation they were completed with media to the defined volume (400  $\mu$ L) and added to the cells for transfection. Flow cytometry results revealed two times more GFP positive cells and 2.5-fold higher fluorescence index for standard condition (1X), compared to the mixture prepared in 5X reduced volume (Fig 15-A).

*Incubation time of mixtures.* Here, mixtures composed of DNA, gesicles and polybrene were either immediately added to the cells or incubated for 10, 15 or 30 min at room temperature prior to the addition. The results revealed slightly higher fluorescence index only when the incubation time was 10 min. Moreover, the value of fluorescence indexes appeared to stay stable for the rest of tested incubation times. The portion of transfected cells was not affected by the duration of incubation (Fig 15-B).

*Assembling order.* The effect of the order of compound association (pKCMV5/GFP, polybrene and gesicles) on transfection efficiency was studied. Five different mixtures were generated in DMEM as indicated in Fig 15-C. There is no difference between the five tested combinations (Fig 15-C).

*Effects of media and serum.* The following solutions were evaluated as media for complexation of gesicles with DNA in presence of polybrene: PBS, OptiMEM and DMEM with or without 5% FBS. Results revealed no significant difference in fluorescence indexes between formulations. However, mixtures formed in OptiMEM achieved higher percentage of transfected cells (70%) compared to DMEM (57%) and PBS (64%). The presence of FBS in DMEM significantly decreased the fluorescence index (Fig 15-D).

*Polybrene concentration.* Five mixtures of standard concentrations of DNA and gesicles in OptiMEM were prepared with increasing concentration of polybrene (2, 4, 8, 16 and 32  $\mu$ g/mL). Transfection of HEK293 using these formulations revealed that polybrene is an important parameter: 8  $\mu$ g/mL of

polybrene in the mixture gave the best fluorescence index. Higher and lower polybrene concentration decreased transfection efficiency (Fig 15-E).

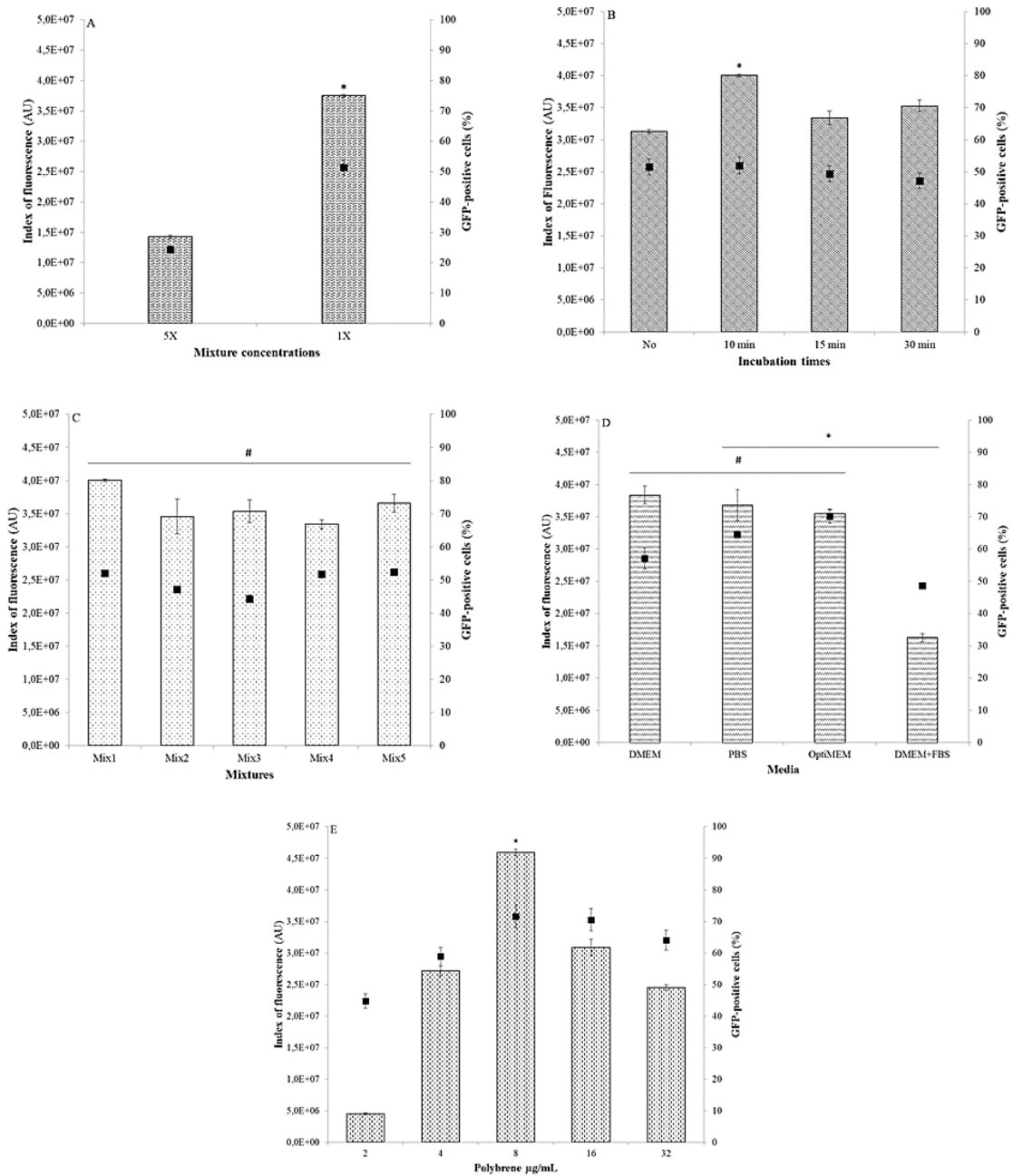


Figure 15 : Identification of optimal conditions for cell transfection using vesicles.

polybrene, following the standard protocol, were mixed in 50% (1X concentrated) and 10% (5X concentrated) of the final volume before addition to HEK293 cells. (B) Effect of incubation time. Components at 1X concentration were mixed and incubated for the indicated time periods (x axis) before addition to cells. (C) Effects of the order of component addition. Mix1 = pKCMV5/GFP +

*polybrene + gesicles, 10 min incubation time; Mix2 = pKCMV5/GFP + polybrene, 10 min incubation time, + gesicles, 10 min incubation time; Mix3 = pKCMV5/GFP + polybrene, 30 min incubation time, + gesicles, 10 min incubation time; Mix4 = gesicles + polybrene, 10 min incubation time, + pKCMV5/GFP, 10 min incubation time; Mix5 = gesicles + polybrene, 30 min incubation time, + pKCMV5/GFP, 10 min incubation time. (D) Effects of media and serum. Mixtures were prepared in different solutions using Mix1 condition (1X concentrated mixture and 10 min incubation) before addition to cells. (E) Effects of polybrene concentration. Mixtures were prepared using different concentrations of polybrene following Mix1 conditions in OptiMEM. \* Statistically different ( $P$ -value $<0.05$ ); # not statistically different. Fluorescence indexes (bars) and GFP positive cells % (squares).*

### **2.5.6 Storage temperature and gesifection efficacy**

Gesicles preparations were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  or undergone freeze/thaw cycles before investigating their ability of DNA delivery. Gesicles were then complexed with pKCMV5/GFP using the standard protocol before addition to the cells. The next day, GFP expression analysis demonstrated that the transfection efficiency remained stable for at least 4 weeks at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  achieving around 70% of GFP-positive cells (Figs 16-A-C). Moreover, transfection efficiency did not decrease even after 10 freeze/thaw cycles (Fig 16-D). These results demonstrated that gesicle bioactivity (i.e. NAD potential) is rather robust and not affected by storage temperature nor its fluctuation.

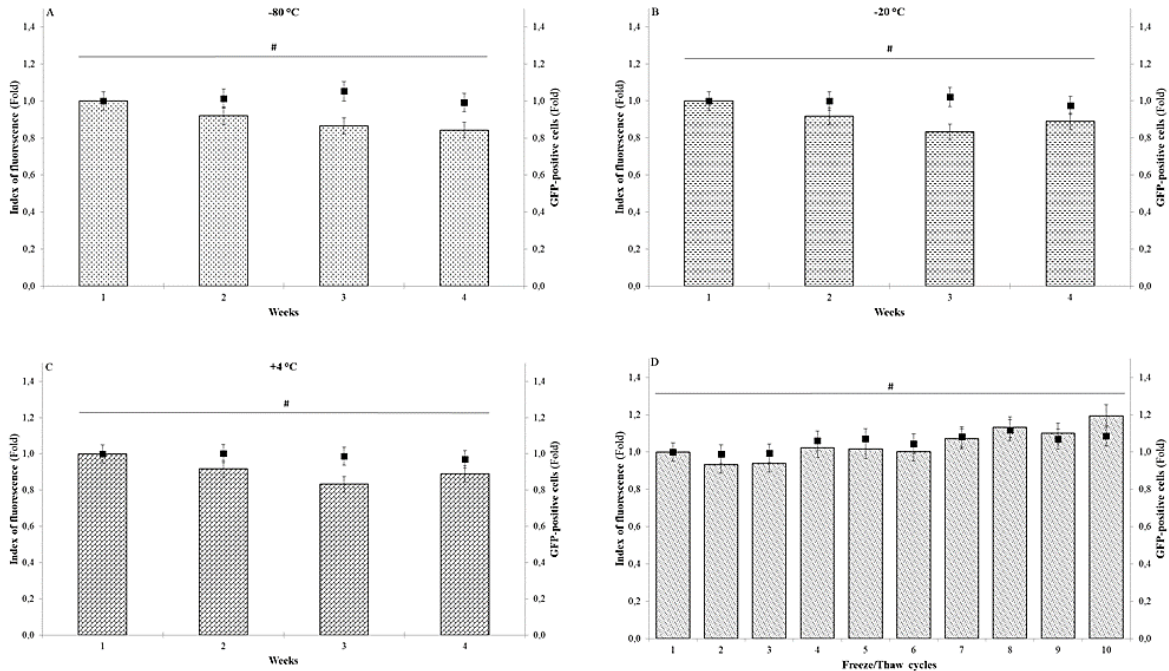


Figure 16 : Effect of storage conditions and freeze/thaw cycles on vesicle bioactivity.

Immediately after production, fresh samples of vesicles were stored at -80 °C (A), -20 °C (B) and +4 °C (C) for 4 weeks or undergone several freeze/thaw cycles (D). The vesicles were complexed with pKCMV5/GFP and polybrene using the standard protocol before being added to the cells. \* Statistically different ( $P < 0.05$ ); # not statistically different. Fluorescence indexes (bars) and % of GFP positive cells (squares).

### 2.5.7 Vesicle-based transfection of different cell types and effects of plasmid size on cell transfection

HeLa cells and human myoblasts were transfected with DNA-vesicle complexes using mixtures prepared in OptiMEM at 50% of the final volume and incubated 10 mn at room temperature with 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polybrene. Since this was the first time these cells were used for transfection with vesicles, different concentrations of pKCMV5/GFP and vesicles were applied to identify the optimal transfection conditions. GFP positive cells made 44% and 22% of HeLa (Fig 17-A) and myoblast (Fig 17-B) cell count, respectively. The best transfection efficiency was achieved at a plasmid concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 2.5 and 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of vesicles for HeLa and myoblasts, respectively. We also observed that the transfection efficiency decreased with the increasing vesicle concentration. The vesicle cytotoxicity for these transfected cells was also tested since the VSVG can be highly toxic to both producer cells and the transduced cells [49, 50]. Direct microscopic analysis of the best transfection

efficiency for HeLa cells using the trypan blue exclusion method, revealed no cytotoxicity (Data not shown). Furthermore, a colorimetric MTT assay of transfected myoblast cells using an increasing gesicle concentration demonstrated no cytotoxic effect (Fig 17-C). Cell transfection with large plasmids is known to be less efficient than transfection with small plasmids, mostly because large plasmids have reduced mobility while being transferred from cellular cytoplasm into nucleus [51, 52]. Therefore, the potential of gesicles to deliver (and transfect) a large plasmid (pCBG/GFP, 18-kb) was studied in HEK293 cells. For that purpose, two different concentrations of pCBG/GFP (2 and 4  $\mu\text{g/mL}$ ) were combined with four different concentrations of gesicles. Standard complexation protocol was used. The best transfection efficiency of 42% was achieved (Fig 17-D) with 2  $\mu\text{g/mL}$  of plasmid and 6  $\mu\text{g/mL}$  of gesicles.

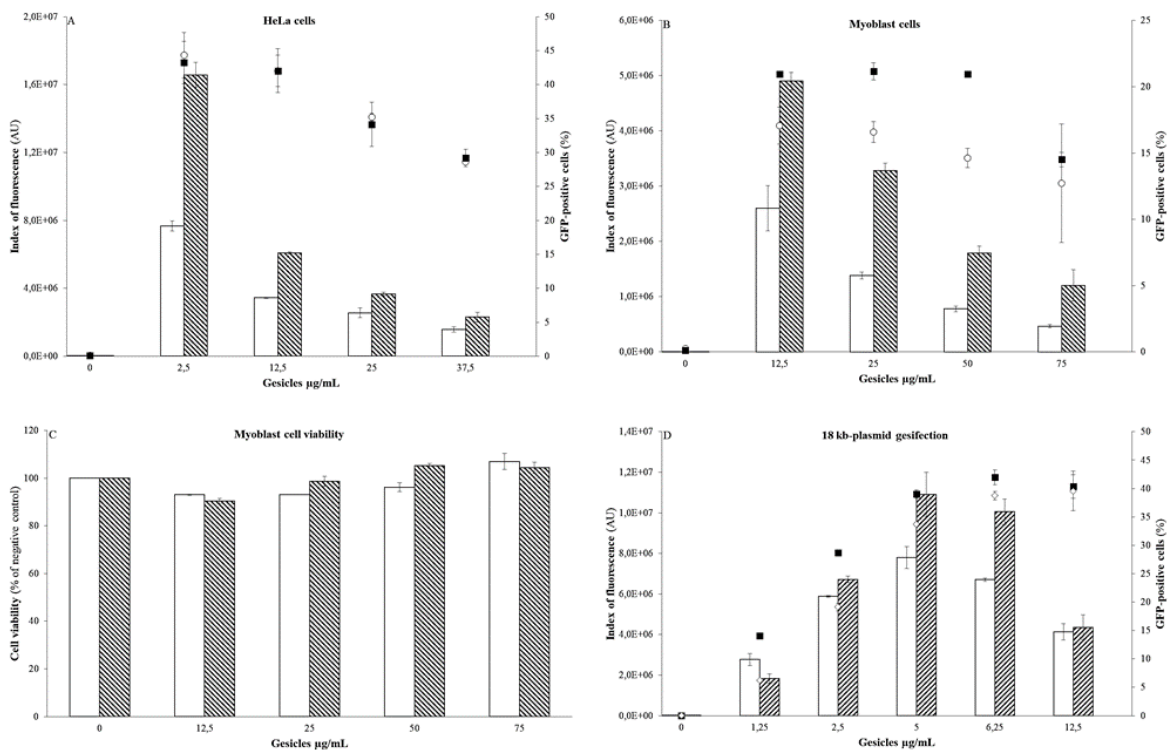


Figure 17 : Gesicle-based transfection of different cell types and effects of plasmid size on cell transfection.

HeLa cells (A) and human myoblasts (B) were transfected using increasing gesicle concentrations. Two pKCMV5/GFP concentrations of 1  $\mu\text{g/mL}$  (empty bars and circles) and 2  $\mu\text{g/mL}$  (hatched bars and squares) were evaluated for complexation with increasing amount of gesicles in presence of polybrene. (C) MTT cell viability of myoblast cells using increasing gesicle concentrations. Two pKCMV5/GFP concentrations of 1  $\mu\text{g/mL}$  (empty bars) and 2  $\mu\text{g/mL}$  (hatched bars) were evaluated.

*(D) HEK293 transfection efficiency with large pCBG/GFP plasmid (18-kb) at 2 µg/mL (empty bar and squares) and 4 µg/mL (hatched bars and diamonds) using increasing concentrations of gesicles and 8 µg/mL of polybrene. Fluorescence indexes (bars) and % of GFP positive cells (circles, squares and diamonds).*

### **2.5.8 siRNA delivery using gesicles**

To evaluate their potential for gene silencing, gesicles were complexed with 100 nmol/mL of siRNA targeting the eGFP sequence, or with a non-related sequence (negative control). Increasing concentrations of gesicles were tested (5, 10, 20, 40 and 80 µg/mL). The siRNA-gesicle mixtures were prepared using 8 µg/mL polybrene before addition to HEK293 cells expressing eGFP. The effects of eGFP inhibition by RNA silencing were analyzed using flow cytometry. The results obtained revealed 40-60% of GFP inhibition, indicating gesicle concentration at 20 µg/mL is the most efficient (Fig 18-A). In another experiment we tried to improve the silencing effect by testing different siRNA concentration (50, 100, 200 and 400 nmol/mL), while keeping the gesicle concentration at 20 µg/mL and polybrene at 8 µg/mL. Expression of GFP was again analyzed by flow cytometry, however, no significantly improvement of gene silencing was detected (Fig 18-B).

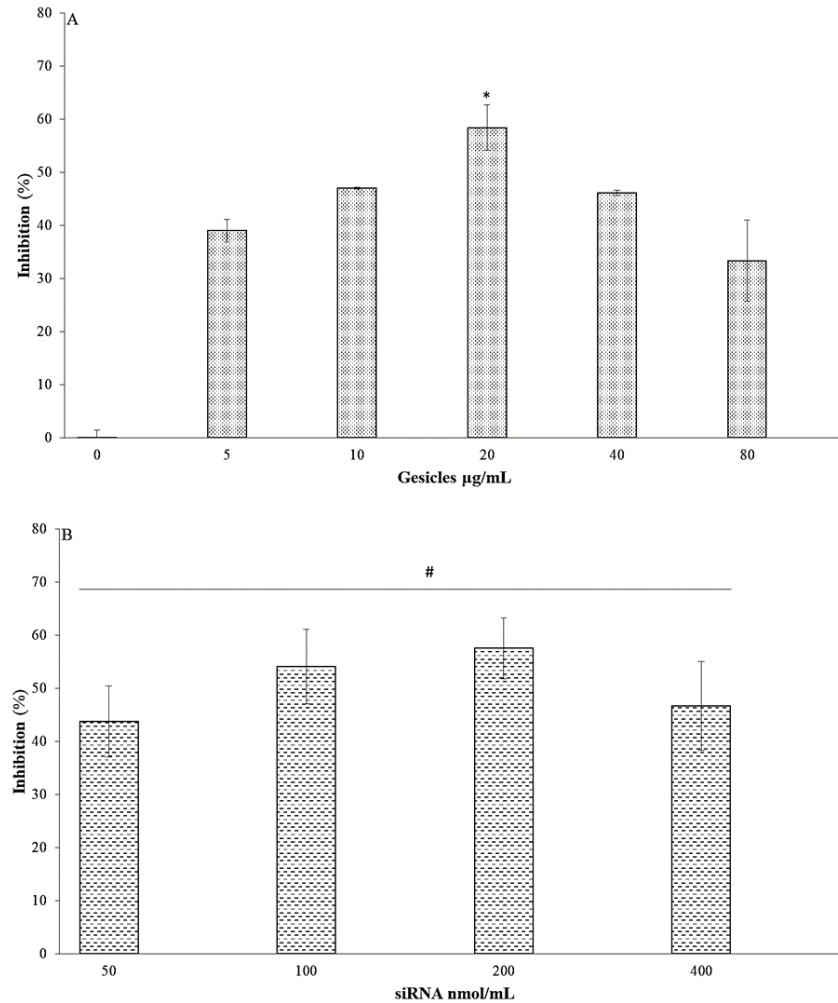


Figure 18 : siRNA-gesicles mediated gene interference.

(A) Increasing concentrations of gesicles were mixed with 100 nmol/mL of siRNA specific to eGFP nucleotide sequence and 8 µg/mL polybrene. (B) Four increasing concentrations of siRNA were used for complexation with 20 µg/mL gesicles and 8 µg/mL polybrene. \*Statistically different ( $P$ -value<0.05); # not statistically different.

## 2.6 Discussion and conclusion

Current gesicle production methods using exclusively calcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) mediated transfection [28, 29] have been described as inexpensive and very efficient method for cell transfection in several research reports [53-56]. However, in comparison to the polyfection, PEI-based transfection requires less handling and provides better reproducibility between production batches [57]. In addition, PEI is a low-cost transfection agent, very easy to use, and rather efficient in transfection of important

cell types such as HEK293 and CHO cells [58]. Consequently, the application of PEI as transfection agent appears to be less cumbersome than  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  when transient production of biological molecule has to be performed [59-64].

In this article, PEI was used as transfection agent for gesicle production in HEK293 cells. Optimal conditions were identified to be 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of pKCMV5/VSVG with a DNA:PEI mass ratio of 1:2 (Fig 13-A-E). The kinetics of production suggested an optimal harvest of gesicles on day 2 and 3 post transfection (Fig 13-D). These results are supported by literature on VSVG-pseudotyped Lv production using adherent HEK293 cells [65-67]. In general, methods developed for production of viral vectors could be applied for gesicle production processes at large scale [6-8, 68]. The scale-up of gesicle production could be investigated using a process based on suspension culture of stable cell lines, with inducible VSVG gene expression [69], grown in optimized serum-free media and bioreactors operating in perfusion mode [47, 48, 70].

We have confirmed that gesicles can deliver DNA into different cell types (Fig 14-A, Figs 17-A and B) and that polybrene is essential for obtaining an efficient transfection process (Fig 14-B), as previously demonstrated [29]. Electrostatic interactions between the cationic polybrene, gesicles and anionic nucleic acids may play an important role in attachment and penetration of DNA/gesicles/polybrene complexes into animal cells as described for VSV-G pseudotyped retroviral and lentiviral vectors [71].

Various conditions were tested to formulate efficient transfection mixtures. Our results revealed that the transfection efficiency can be affected by the concentration of components during the possible complexation process. The same quantities of gesicles, plasmid DNA and polybrene were added in 10% and 50% of the final formulation volume (5X and 1X concentrated, respectively) to undergo the complex formation. Complexes formed at 1X concentration demonstrated better cell transfection efficiency (Fig 15-A). No preferential assembling order for complex formation was required to form an efficient transfection complex (Fig 15-C), while 10 min incubation for DNA-gesicle in the presence of polybrene proved to be the optimal complexation time (Fig 15-B).

Polybrene concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was the best to deliver DNA using gesicles (Fig 15-E) in agreement with the concentration used for Lv [72, 73]. Efficient transfections were achieved in different buffers i.e. DMEM, Opti-MEM and PBS, even in the presence of FBS (Fig 15-D). In comparison, commercial transfection agents such as PEI and Lipofectamine are strongly impaired by serum [74-76]. It has been



suggested that polybrene reduces the negative charge of serum proteins, resulting in increased DNA-liposome particle transfection efficiency [77].

Furthermore, stability studies demonstrated that gesicles keep their standard transfection properties for at least 4 weeks at -80 °C, -20 °C, +4 °C and after several freeze/thaw cycles (Figs 16-A-D). Although they were once washed while being harvested, some residual serum proteins and remaining sucrose could contribute to the gesicle stability. It was reported that FBS improved VSV stability at 4 °C [78]. Interestingly, an advanced purification process and serum-free medium production resulted in a reduced VSV-G pseudotyped baculovirus vectors stability requiring the addition of preservative agents such as glycerol, DMSO or sucrose [79].

In this report, we showed that gesicles can deliver DNA into hard and very hard-to-transfect cells such as HeLa (55%) (Fig 17-A) and human primary cells (myoblasts 22%) (Fig 17-B). The observed transfection efficiencies are similar to other methods using PEI developed for rat heart myoblasts and primary human skeletal myoblasts [80, 81]. A recent study reported that gesicles could deliver CRISPR-CAS9 system for genome editing into patient's myoblasts and thus could be an interesting tool in cell therapy [82].

It has been shown that plasmids of 12 kb and larger are not efficiently transfected using non-viral transfection protocols [42]. In our work however we have proved that gesicles were able to deliver efficiently (42%) a large 18-kb plasmid (Fig 17-C). Hence gesicles can be used as an efficient transfection reagents to successfully deliver long transgenes (e.g. dystrophin cDNA of 12-kb) or small regions of genome for various applications. Most importantly, we have shown, for the first time, that gesicles can be used to silence gene with efficiency up to 60% (Fig 18-A and 18-B). These results highlight the versatility of gesicles since they can transfer DNA and RNA.

In conclusion, this paper presents data indicating that gesicles have a with great potential for NAD. The results described here serve for further development of gesicle-based transfection protocols.

## **2.7 Acknowledgments**

Mathias Mangion was supported by grants from ThéCell and PROTÉO networks. The authors would like to thank Juliette Champeil for her technical assistance. The authors declare no conflict of interests.

## 2.8 References

1. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* 2012;1:27.
2. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(7):521-35.
3. Erdal Cevher ADSaESeCal. *Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy* Pinte; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/gene-delivery-systems-recent-progress-in-viral-and-non-viral-therapy>.
4. Draghici B, Ilies MA. Synthetic nucleic acid delivery systems: present and perspectives. *J Med Chem.* 2015;58(10):4091-130.
5. Ni R, Zhou J, Hossain N, Chau Y. Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;106(Pt A):3-26.
6. Yla-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther.* 2012;20(10):1831-2.
7. Yla-Herttuala S. ADA-SCID Gene Therapy Endorsed By European Medicines Agency For Marketing Authorization. *Mol Ther.* 2016;24(6):1013-4.
8. Fong Y. Oncolytic treatment for cancer recommended for approval. *Mol Ther.* 2015;23:1131.
9. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-58.
10. Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):249-55.
11. Slivac I, Guay D, Mangion M, Champeil J, Gaillet B. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin Biol Ther.* 2016:1-14.
12. Silva AC, Lopes CM, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Nucleic Acids Delivery Systems: A Challenge for Pharmaceutical Technologists. *Curr Drug Metab.* 2015;16(1):3-16.
13. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol.* 2010;10:9.1472-6750-10-9 [pii].
14. Segura MM, Mangion M, Gaillet B, Garnier A. New developments in lentiviral vector design, production and purification. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(7):987-1011.
15. Hastie E, Cataldi M, Marriott I, Grdzlishvili VZ. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 2013;176(1-2):16-32.
16. Rose J.K. WMA. *Rhabdoviridae: The viruses and their replication.* 4 ed: Lippincott-Raven; 2001.
17. Robison CS, Whitt MA. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol.* 2000;74(5):2239-46.
18. Brown EL, Lyles DS. Organization of the vesicular stomatitis virus glycoprotein into membrane microdomains occurs independently of intracellular viral components. *J Virol.* 2003;77(7):3985-92.
19. Thomas D, Newcomb WW, Brown JC, Wall JS, Hainfeld JF, Trus BL, et al. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *J Virol.* 1985;54(2):598-607.
20. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(18):7306-11.
21. Roche S, Albertini AA, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1716-28.

22. Albertini AA, Baquero E, Ferlin A, Gaudin Y. Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses*. 2012;4(1):117-39.
23. Clague MJ, Schoch C, Zech L, Blumenthal R. Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry*. 1990;29(5):1303-8.
24. Gaudin Y, de Kinkelin P, Benmansour A. Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J Gen Virol*. 1999;80 ( Pt 5):1221-9.
25. Roche S, Gaudin Y. Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion. *J Virol*. 2004;78(16):8746-52.
26. Abe A, Miyanochara A, Friedmann T. Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *J Virol*. 1998;72(7):6159-63.
27. Miyanochara A. Preparation of vesicular stomatitis virus-G (VSV-G) conjugate and its use in gene transfer. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012;2012(4):453-6.
28. Mangeot PE, Dollet S, Girard M, Ciancia C, Joly S, Peschanski M, et al. Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles. *Mol Ther*. 2011;19(9):1656-66.
29. Okimoto T, Friedmann T, Miyanochara A. VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Mol Ther*. 2001;4(3):232-8.
30. Hung ME, Leonard JN. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31027.
31. Breakefield XO, Frederickson RM, Simpson RJ. Gesicles: Microvesicle "cookies" for transient information transfer between cells. *Mol Ther*.
32. Estelles A, Sperinde J, Roulon T, Aguilar B, Bonner C, LePecq JB, et al. Exosome nanovesicles displaying G protein-coupled receptors for drug discovery. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):751-60.
33. Muratori C, Bona R, Federico M. Lentivirus-based virus-like particles as a new protein delivery tool. *Methods Mol Biol*. 2010;614:111-24.
34. Schmidt U, Gunther C, Rudolph R, Bohm G. Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB J*. 2001;15(9):1646-8.
35. Clontech. Cre recombinase gesicles. Available from: [http://www.clontech.com/US/Products/Genome\\_Editing/Cre\\_Recombinase/Resources/About\\_Gesicles](http://www.clontech.com/US/Products/Genome_Editing/Cre_Recombinase/Resources/About_Gesicles).
36. Clontech. CRISPR/Cas9 gesicles. Available from: [http://www.clontech.com/US/Products/Genome\\_Editing/CRISPR\\_Cas9/Resources/CRISPR\\_Cas9\\_Gesicles\\_Overview](http://www.clontech.com/US/Products/Genome_Editing/CRISPR_Cas9/Resources/CRISPR_Cas9_Gesicles_Overview).
37. Petri WA, Jr., Wagner RR. Reconstitution into liposomes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by detergent dialysis. *J Biol Chem*. 1979;254(11):4313-6.
38. Metsikko K, van Meer G, Simons K. Reconstitution of the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus. *EMBO J*. 1986;5(13):3429-35.
39. Hug P, Sleight RG. Fusogenic virosomes prepared by partitioning of vesicular stomatitis virus G protein into preformed vesicles. *J Biol Chem*. 1994;269(6):4050-6. Epub 1994/02/11. PubMed PMID: 8307962.
40. Arnold AS, Laporte V, Dumont S, Appert-Collin A, Erbacher P, Coupin G, et al. Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006;20(1):81-9.

41. Neuhuber B, Huang DI, Daniels MP, Torgan CE. High efficiency transfection of primary skeletal muscle cells with lipid-based reagents. *Muscle Nerve*. 2002;26(1):136-40.
42. Campeau P, Chapdelaine P, Seigneurin-Venin S, Massie B, Tremblay JP. Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther*. 2001;8(18):1387-94.
43. Massie B, Couture F, Lamoureux L, Mosser DD, Guilbault C, Jolicoeur P, et al. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol*. 1998;72(3):2289-96.
44. Massie B, Mosser DD, Koutroumanis M, Vitte-Mony I, Lamoureux L, Couture F, et al. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology*. 1998;28(1-3):53-64.
45. Gaillet B, Gilbert R, Broussau S, Pilote A, Malenfant F, Mullick A, et al. High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(2):203-15.
46. Robert MA, Zeng Y, Raymond B, Desfosse L, Mairey E, Tremblay JP, et al. Efficacy and site-specificity of adenoviral vector integration mediated by the phage phiC31 integrase. *Hum Gene Ther Methods*. 2012;23(6):393-407.
47. Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):466-79.
48. Warnock JN, Merten OW, Al-Rubeai M. Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes. *Cytotechnology*. 2006;50(1-3):141-62.
49. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8033-7.
50. Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9564-8.
51. McLenachan S, Sarsero JP, Ioannou PA. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics*. 2007;89(6):708-20.
52. Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*. 2000;275(3):1625-9.
53. Qureshi HY, Ahmad R, Zafarullah M. High-efficiency transfection of nucleic acids by the modified calcium phosphate precipitation method in chondrocytes. *Anal Biochem*. 2008;382(2):138-40.
54. Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013;1018:107-10.
55. Sambrook J, Russell DW. Calcium-phosphate-mediated Transfection of Eukaryotic Cells with Plasmid DNAs. *CSH Protoc*. 2006;2006(1).
56. Wang S, Cho YK. An Optimized Calcium-Phosphate Transfection Method for Characterizing Genetically Encoded Tools in Primary Neurons. *Methods Mol Biol*. 2016;1408:243-9.
57. Kuroda H, Kutner RH, Bazan NG, Reiser J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods*. 2009;157(2):113-21.
58. Delafosse L, Xu P, Durocher Y. Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells. *J Biotechnol*. 2016;227:103-11.
59. Zustiak MP, Jose L, Xie Y, Zhu J, Betenbaugh MJ. Enhanced transient recombinant protein production in CHO cells through the co-transfection of the product gene with Bcl-xL. *Biotechnol J*. 2014;9(9):1164-74.
60. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1158-70.

61. Jager V, Bussow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13(1):52.
62. Backliwal G, Hildinger M, Chenuet S, Wulhfard S, De Jesus M, Wurm FM. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(15):e96.
63. Vishal Agrawal BY, Rene Pagila, Billy Yang, Chris Simonsen, Oren Beske. A High-Yielding, CHO-K1–Based Transient Transfection System. *BioProcess International.* 2013;11(1):pp. 28-35.
64. Crowell CK, Qin Q, Grampp GE, Radcliffe RA, Rogers GN, Scheinman RI. Sodium butyrate alters erythropoietin glycosylation via multiple mechanisms. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(1):201-13.
65. Cockrell AS, Ma H, Fu K, McCown TJ, Kafri T. A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther.* 2006;14(2):276-84.
66. Lee CL, Chou M, Dai B, Xiao L, Wang P. Construction of stable producer cells to make high-titer lentiviral vectors for dendritic cell-based vaccination. *Biotechnol Bioeng.* 2011.
67. Kutner RH, Puthli S, Marino MP, Reiser J. Simplified production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors using HYPERFlask vessels and anion exchange membrane chromatography. *BMC Biotechnol.* 2009;9:10.
68. Merten OW, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16017.
69. Broussau S, Jabbour N, Lachapelle G, Durocher Y, Tom R, Transfiguracion J, et al. Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. *Mol Ther.* 2008;16(3):500-7.
70. Sheu J, Beltzer J, Fury B, Wilczek K, Tobin S, Falconer D, et al. Large-scale production of lentiviral vector in a closed system hollow fiber bioreactor. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development.* 2015;2:15020.
71. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem.* 2002;97(2-3):159-72.
72. Kutner RH, Zhang XY, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 2009;4(4):495-505.
73. Froelich S, Tai A, Kennedy K, Zubair A, Wang P. Pseudotyping lentiviral vectors with aura virus envelope glycoproteins for DC-SIGN-mediated transduction of dendritic cells. *Hum Gene Ther.* 2011;22(10):1281-91.
74. Yang JP, Huang L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther.* 1997;4(9):950-60.
75. Zelphati O, Uychi LS, Barron LG, Szoka FC, Jr. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1390(2):119-33.
76. Audouy S, Molema G, de Leij L, Hoekstra D. Serum as a modulator of lipoplex-mediated gene transfection: dependence of amphiphile, cell type and complex stability. *J Gene Med.* 2000;2(6):465-76.
77. Abe A, Miyanochara A, Friedmann T. Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Ther.* 1998;5(5):708-11.
78. Zimmer B, Summermatter K, Zimmer G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype rhabdovirus. *Vet Microbiol.* 2013;162(1):78-84.
79. Jorio H, Tran R, Kamen A. Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):319-25.

80. Ye L, Haider H, Esa WB, Law PK, Zhang W, Su L, et al. Nonviral vector-based gene transfection of primary human skeletal myoblasts. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(11):1477-87.
81. Liu YC, Lin WY, Jhang YR, Huang SH, Wu CP, Wu HT. Efficiency of DNA transfection of rat heart myoblast cells H9c2(2-1) by either polyethyleneimine or electroporation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;164(7):1172-82.
82. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther*. 2016;24(3):430-46.

# Chapitre 3 : Caractérisation des gésicules

## 3.1 Introduction

À ce jour, de nombreux aspects de la biologie des gésicules restent inconnus. C'est le cas par exemple de la composition protéique des gésicules. La littérature rapporte l'incorporation de protéines des cellules hôtes dans des virus enveloppés (M. M. Segura et al. 2008; Venereo-Sánchez et al. 2019). Ces protéines peuvent être incorporées dans les particules virales soit de manière aléatoire (présence aux sites de bourgeonnement) ou de manière spécifique (interaction avec les composants viraux). Par ailleurs, certaines des molécules incorporées dans les particules virales restent fonctionnelles et contribuent à leur virulence (Liao, Roos, et Hildreth 2000; Burnie et Guzzo 2019; Ott 2008). La caractérisation du contenu des gésicules pourrait permettre d'orienter les futures optimisations afin de diminuer les facteurs de risques en vue d'applications thérapeutiques.

## 3.2 Matériel et méthodes

### 3.2.1 Retard sur gel

Les différentes combinaisons entre les plasmides, les gésicules et le bromure d'hexadiméthrine ont été réalisées dans du PBS 1X avec une concentration fixe de 1 µg/mL de plasmide pKCMV5. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les mélanges ont été déposés et analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium. La migration a été réalisée dans une solution de tris-acetate-EDTA 0,5X. Les bandes d'ADN ont été visualisées avec le système d'acquisition d'image GE imager (GE Healthcare Life Science).

### 3.2.2 Purification par gradient d'iodixanol

Les gésicules ont été produites par transfection transitoire telle que décrit au paragraphe 2.4.3 du chapitre 2. Le surnageant de production contenant les gésicules a été récolté 2 et 3 jours après la transfection et concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose selon le protocole décrit au paragraphe 2.4.4 du chapitre 2. Le culot contenant les gésicules a été suspendu dans du PBS contenant 5% d'iodixanol et incubé à 4 °C pendant 18 heures. Par la suite, la solution de gésicules a été déposée sur un gradient de concentration discontinu d'iodixanol (OptiPrep StemCell Technologies) (10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40%) préparé dans du PBS 1X (v/v), puis centrifugée à 28 000 rpm pendant 18 h à 4 °C. Des fractions de 0,5 mL ont été récoltées et conservées à 4 °C. Les

fractions ont été analysées par immunobuvardage de type dot blot et western blot (paragraphe 3.2.3) ainsi que par microscopie électronique (paragraphe 3.2.4) et par analyse de la diffusion dynamique de la lumière (paragraphe 3.2.5).

### **3.2.3 Immunobuvardage de type dot blot et western blot**

Pour l'immunobuvardage de type dot blot, les échantillons ont été préparés en les dénaturant à 95°C pendant 3 minutes, suivi par l'ajout de 100 mM de DTT et 30 minutes d'incubation à température ambiante. Un  $\mu\text{L}$  d'échantillon dénaturé a été déposé sur une membrane de nitrocellulose avant une période de séchage de 45 minutes à température ambiante. Pour l'immunobuvardage de type western blot, les gésicules sont préparées avec du tampon de charge à une concentration finale de 1X (tris-HCl à 50 mM pH 6,8, SDS à 2%, glycérol à 6%, bleu de bromophénol à 0,004%) puis dénaturées à 95°C pendant 3 minutes, suivis par l'ajout de 100 mM de DTT et de 30 minutes d'incubation à température ambiante. Les protéines des échantillons sont ensuite séparées sur un gel contenant un gradient de 10-20% NuPAGE® Tris-glycine (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON). Ensuite, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45  $\mu\text{m}$  Amersham™ Protan™ premium (GE Healthcare Life Sciences, Germany). Les membranes de dot blot et de western blot sont incubées pendant 3 heures à température ambiante dans une solution de blocage (15 mM NaCl, 1 mM Tris pH 8,0, 0,01% (v/v) Tween-20) contenant 5% de lait sans matière grasse. La membrane est incubée pendant 1 heure avec un anticorps dirigé contre la protéine VSV-G et couplé à l'enzyme HRP ([P5D4], Abcam, MA), dilué au 1/1000. Après 3 lavages de 15 minutes chacun, la membrane est incubée avec le réactif de révélation Amersham™ ECL reagent (GE Healthcare Life Sciences, UK) suivi par la révélation à l'aide du système d'acquisition d'image GE imager. La quantification des signaux obtenus a été effectuée avec le logiciel ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, UK).

### **3.2.4 Microscopie électronique à transmission**

Les images ont été obtenues avec un microscope électronique à transmission de marque Philips TECNAI Spirit G2 Biotwin. L'appareil a été utilisé avec un contraste élevé, un voltage de 80 kV et un agrandissement entre 20 000x et 200 000x. Brièvement, 10  $\mu\text{L}$  de solution d'échantillon ont été déposés sur une grille de cuivre couverte de carbone (Cu-300HD, Pacific Grid-Tech, CA). Par la suite, les échantillons ont été colorés avec 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acétate uranyl à 2% déposée directement



sur la grille. Après 10 secondes d'incubation, le colorant a été retiré par capillarité. La grille a été séchée à température ambiante avant l'observation.

### **3.2.5 Diffusion dynamique de la lumière**

Les gésicules ont été préalablement purifiées par ultracentrifugation sur gradient d'iodixanol, puis dialysées avec une solution de PBS 1X. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) équipé avec un laser He-Ne (633 nm) et un angle de 173°. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel DTS (version 7.10). Les résultats ont été calculés en faisant la moyenne de 3 séries consécutives de 12 mesures à 25°C. La viscosité (1,0 cP) et l'index de réfraction (1,332) du PBS ont été utilisés. Les données sont représentatives de deux lots de production de gésicules.

### **3.2.6 Analyse protéomique**

La composition des gésicules a été analysée par spectrométrie de masse pour identifier la composition protéique. Brièvement, 20 µg de gésicules purifiées ont été déposées sur un gel SDS-PAGE de 10-20% pour séparer les protéines. Le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie R-250 (BioShop) pendant 40 minutes et les bandes ont été révélées à la suite d'une décoloration de 2 heures avec une solution composée de 50% d'eau pure, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique. Les bandes ont été coupées, réduites et alkylées avant d'être digérées avec de la trypsine pour obtenir des fragments peptidiques. Les échantillons de peptides ont été injectés et séparés par LC-MS/MS avec un spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Les peptides ont été élués avec une colonne de séparation C18 3 µm pepmap de 50 cm x 75 µm (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 minutes à 300 nL/min. Le spectre de masse a été obtenu en utilisant un mode d'acquisition de données indépendantes avec le logiciel Thermo XCalibur version 4.1.50. Les fichiers de la liste de pic MGF ont été créés en utilisant le logiciel Proteome Discoverer (Thermo). Les fichiers d'échantillons MGF ont ensuite été analysés en utilisant le logiciel Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Le logiciel Mascot a été paramétré selon une digestion par la trypsine pour effectuer une recherche dans une base de données du proteome de référence Uniprot Homo sapiens (75069 entrées), Bos taurus (37512 entrées) ainsi qu'en incluant la séquence de la protéine virale VSV-G.

## 3.3 Résultats et discussion

### 3.3.1 Mise en évidence des complexes de gésifaction

Okimoto et *al.* ont démontré que le mélange de gésicules avec du bromure d'hexadiméthrine et des plasmides d'expression de la luciférase, améliorait très significativement l'activité luciférase dans les cellules incubées avec cette combinaison (Okimoto, Friedmann, et Miyano-hara 2001). En prenant en considération la nature électrochimique des différents composants, il est facile de suggérer la formation d'un complexe entre ces trois éléments. En effet, l'ADN est chargé négativement et les gésicules, composées de membranes cellulaires, sont également chargées négativement. Le bromure d'hexadiméthrine, quant à lui, est composé de charges positives. Le bromure d'hexadiméthrine pourrait donc interagir avec l'ADN et les gésicules pour former des complexes de gésifaction. Afin de vérifier cette hypothèse des expériences de retard sur gel ont été réalisées. Cette technique est communément utilisée pour mettre en évidence l'interaction d'acides nucléiques (Plianwong et al. 2013) avec d'autres molécules telles que des protéines (C. Tsai et al. 2012) ou encore des agents de transfection. La méthode consiste à mélanger des molécules ayant le potentiel d'interagir avec de l'ADN, puis de faire migrer l'ensemble par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium afin de révéler l'ADN sous lumière ultraviolette. Pour valider la bonne réalisation de chacune des expériences de retard sur gel, des témoins positifs sous forme de complexes ADN-PEI ont été analysés en parallèle des différents mélanges étudiés. Toutes les expériences réalisées ont été validées puisque des retards ont été observés avec ces témoins (Figure 19-A, B et C). Dans un premier temps, les expériences ont consisté à étudier l'interaction de l'ADN avec du bromure d'hexadiméthrine. Pour ce faire, des mélanges ont été réalisés entre une concentration de plasmides ayant préalablement démontré son efficacité lors de la gésifaction (2 µg/mL) et des concentrations croissantes de bromure d'hexadiméthrine. Après 10 minutes d'incubation, les mélanges ont été analysés par électrophorèse. Les résultats sont présentés à la figure 19-A. Comparativement à la condition sans bromure d'hexadiméthrine (0 µg/mL = plasmide seul), on observe un retard de migration des plasmides à partir d'une concentration de bromure d'hexadiméthrine de 0,25 µg/mL (bandes entre 3 000 et 4 000 pb). À partir de 1 µg/mL de bromure d'hexadiméthrine, l'ADN peut à peine pénétrer dans le gel (flèche). À des concentrations égales à 4 et 8 µg/mL, aucune bande d'ADN ne peut être visualisée car les complexes formés sont trop larges pour pénétrer dans le gel. Ces résultats confirment donc la formation de complexes entre les plasmides et le bromure d'hexadiméthrine, et ce pour une

concentration de bromure d'hexadiméthrine optimale (8 µg/mL) selon les conditions de gésiffection définies au paragraphe 2.5.4 du chapitre 2.

Par la suite, l'interaction de l'ADN avec les gésicules a été étudiée. De la même façon que précédemment, des mélanges ont été réalisés avec une concentration de plasmides de 2 µg/mL et des concentrations croissantes de gésicules. Après 10 minutes d'incubation, les mélanges ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du BET. La figure 19-B montre que les bandes d'ADN comprises entre 3 000 et 4 000 pb ne sont pas retardées par l'ajout des gésicules, comparativement à la condition sans gésicule. Néanmoins, l'apparition d'une légère bande d'ADN au niveau des puits du gel (flèche), à partir de 4 µg de gésicules, indique un retard de la migration d'une petite partie des plasmides. Cela suggère qu'une faible quantité d'ADN et des gésicules sont capables de s'associer pour former des complexes. Cependant, cela est contradictoire avec l'hypothèse que ces deux éléments devraient se repousser en raison de leur charge globale négative. Par ailleurs, les expériences réalisées précédemment ont démontré l'inefficacité d'un mélange entre des plasmides et des gésicules pour aboutir à l'expression d'un gène d'intérêt. Par la suite, l'ajout des gésicules aux complexes formés par le bromure d'hexadiméthrine et l'ADN a été étudié (Figure 19-C). La concentration de bromure d'hexadiméthrine pour obtenir une gésiffection efficace (8 µg/mL) n'a pu être utilisée dans cette expérience puisque les complexes formés dans ces conditions sont incapables de pénétrer dans le gel d'agarose, tel que présenté à la figure 19-A. Par conséquent, une concentration efficace de plasmides pour la gésiffection (2 µg/mL) a été mélangée avec une concentration de bromure d'hexadiméthrine permettant d'obtenir un retard modéré (0,5 µg/mL) de manière à pouvoir observer un retard supplémentaire dans le cas d'une interaction avec les gésicules. L'analyse sur gel révèle la présence d'un retard de la migration des plasmides dès l'ajout de 0,25 µg de gésicules, comparativement au mélange sans gésicule (bandes entre 3000 et 4000 pbs). Par ailleurs, le gel montre, au niveau des puits, une augmentation de l'intensité de la bande d'ADN en fonction de la quantité de gésicules ajoutées au mélange (flèche). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le bromure d'hexadiméthrine constitue un élément déterminant pour la formation de complexes entre l'ADN et les gésicules.

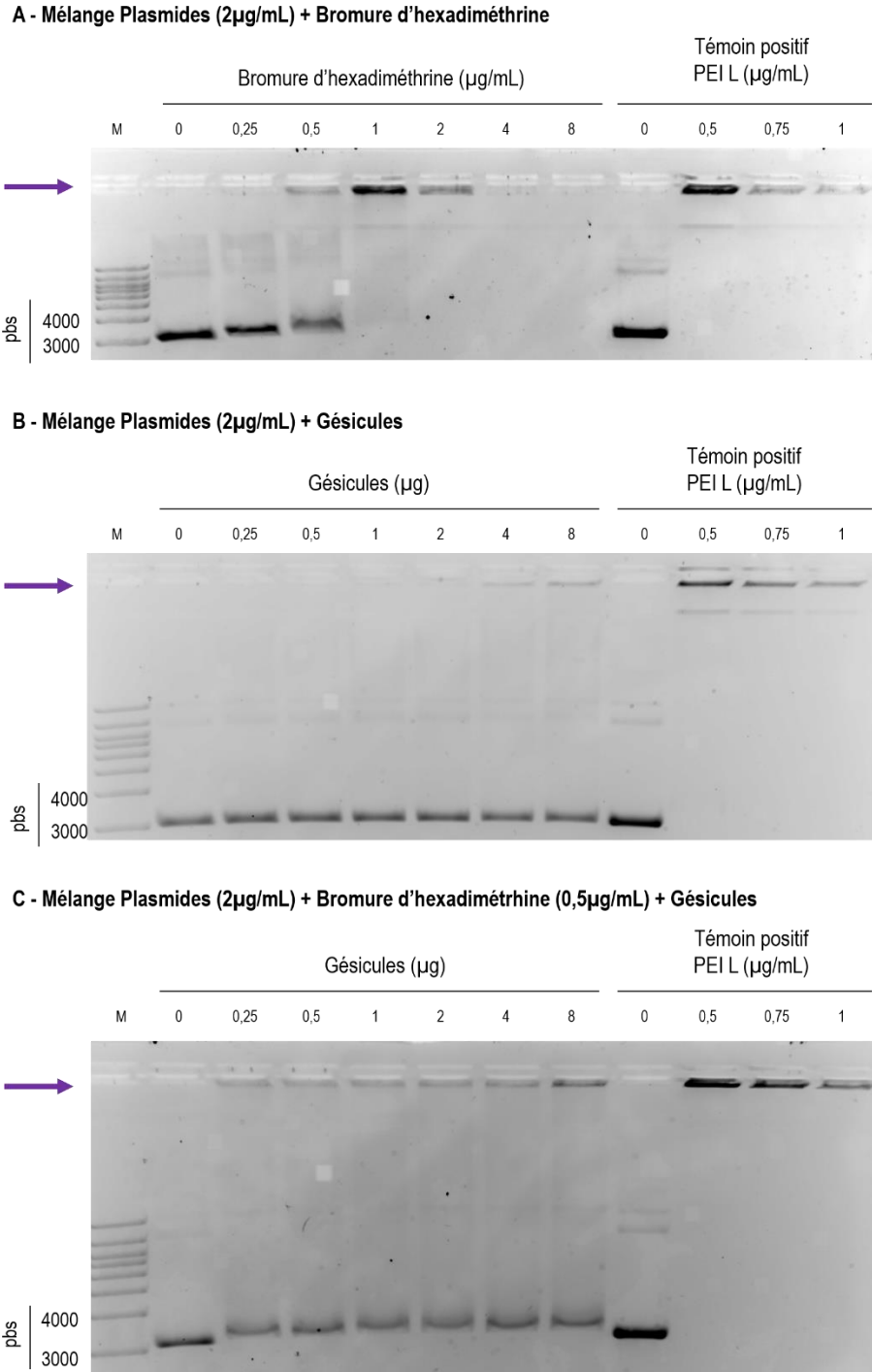


Figure 19 : Mise en évidence de la formation des complexes de gésification par gel retard.

(A)-Expérience de gel retard sur des mélanges composés d'une concentration fixe d'ADN et de concentrations croissantes de bromure d'hexadiméthrine. (B)-Expérience de gel retard sur des mélanges composés d'une concentration fixe d'ADN et de concentrations croissantes de gésicules.

*(C)-Expérience de gel retard sur des mélanges composés d'une concentration fixe d'ADN et de bromure d'hexadiméthrine, et des quantités croissantes de gésicules. Des complexes entre l'ADN et une concentration croissante de PEI linéaire ont été réalisés pour chaque expérience et servent de témoins positifs pour la visualisation du retard sur gel.*

### **3.3.2 Purification analytique des gésicules**

Certaines expériences de caractérisation des gésicules telles que l'analyse protéomique et la microscopie électronique nécessite d'utiliser de matériel purifié. L'iodixanol est un composé couramment utilisé pour purifier divers virus tels que le VIH (Dettenhofer et Yu 1999), les AAV (Hermens et al. 1999) les rétrovirus (M. de las M. Segura, Garnier, et Kamen 2006) ou encore le virus de l'hépatite C (Nielsen et al. 2006). La méthode de purification choisie, consiste à réaliser une ultracentrifugation sur un gradient de concentration d'iodixanol. Le surnageant de production contenant les gésicules a été filtré puis concentré sur coussin de sucrose par ultracentrifugation. Le culot contenant les gésicules a ensuite été purifié par ultracentrifugation à travers un gradient d'iodixanol discontinu et préalablement formé. Plusieurs fractions ont été récoltées, puis analysées par immunobuvardage de type dot blot et western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine VSV-G.

Le résultat de l'analyse par dot blot révèle la présence d'un signal dans les fractions 5 puis de 10 à 25 (Figure 20-A). L'analyse par western blot montre la présence de bandes correspondant à la taille de la protéine VSV-G (57 kDa) pour les fractions 12 à 21 (Figure 20B). Toutefois, les fractions 10, 11, 22 et 23 obtiennent un signal en dot blot mais pas en western blot. En l'absence de séparation, les échantillons protéiques sont plus concentrés en dot blot ce qui pourrait améliorer la sensibilité de l'anticorps anti-VSV-G et expliquer l'observation précédente. Dans cette expérience, le dot blot permet d'identifier rapidement les fractions dans lesquelles les gésicules sont susceptibles de se retrouver. Par la suite, le western blot permet de faire une identification plus précise (taille) parmi les fractions sélectionnées en dot blot. La quantification du signal obtenu par dot blot fait apparaître un seul pic centré autour de la fraction 16 (Figure 21). Par ailleurs, un volume défini de chaque fraction a été mélangé avec des plasmides codant pour la GFP et du bromure d'hexadiméthrine avant d'être déposé sur des cellules en culture. La figure 21 présente également les résultats de l'analyse par cytométrie de l'expression cellulaire de la GFP 24 heures après le dépôt. Ces résultats démontrent que pour l'ensemble des fractions, le profil du signal en dot blot est corrélé avec le profil de gésification des

cellules. La fraction 16 permet d'obtenir le maximum d'efficacité de livraison avec plus de 70% de cellules transfectées. Cette fraction a été récoltée à une densité d'iodixanol comprises entre 1,185 et 1,058 g/mL.

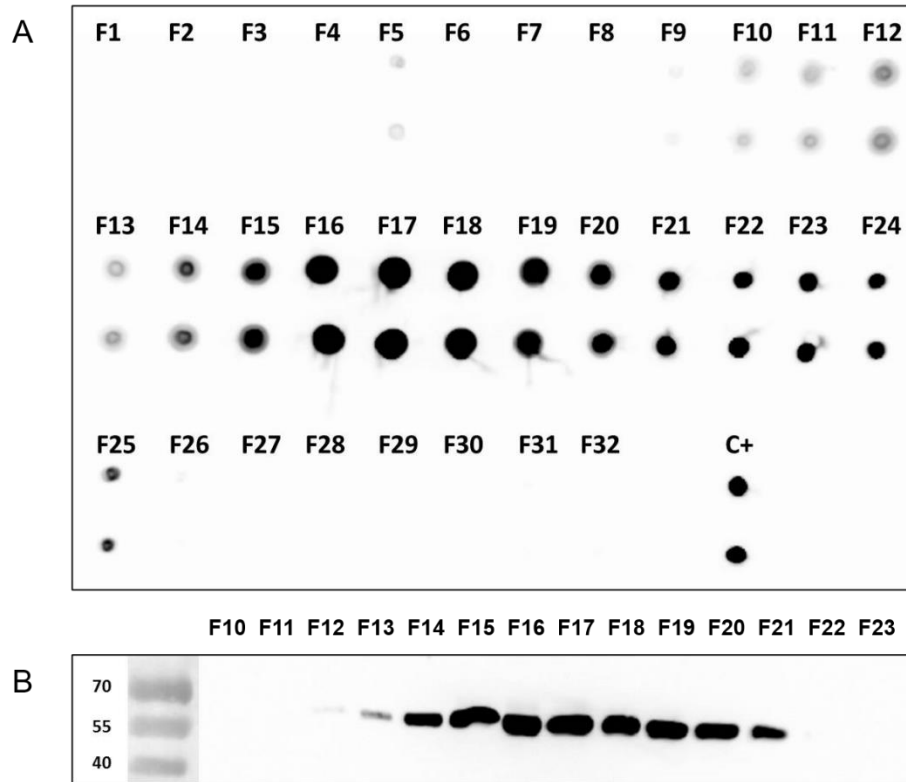


Figure 20 : Analyse par immunobuvardage des fractions issues de la purification par gradient d'iodixanol.

(A)-Immuno-détection de type dot blot et (B)-Immuno-détection de type western blot. Après dénaturation, 1  $\mu$ L (A) et 10  $\mu$ L (B) de chaque fraction, récoltée du gradient d'iodixanol, sont déposés sur la membrane. Après 1 heure de séchage, la membrane est incubée avec une solution contenant des anticorps dirigés contre la protéine VSV-G.

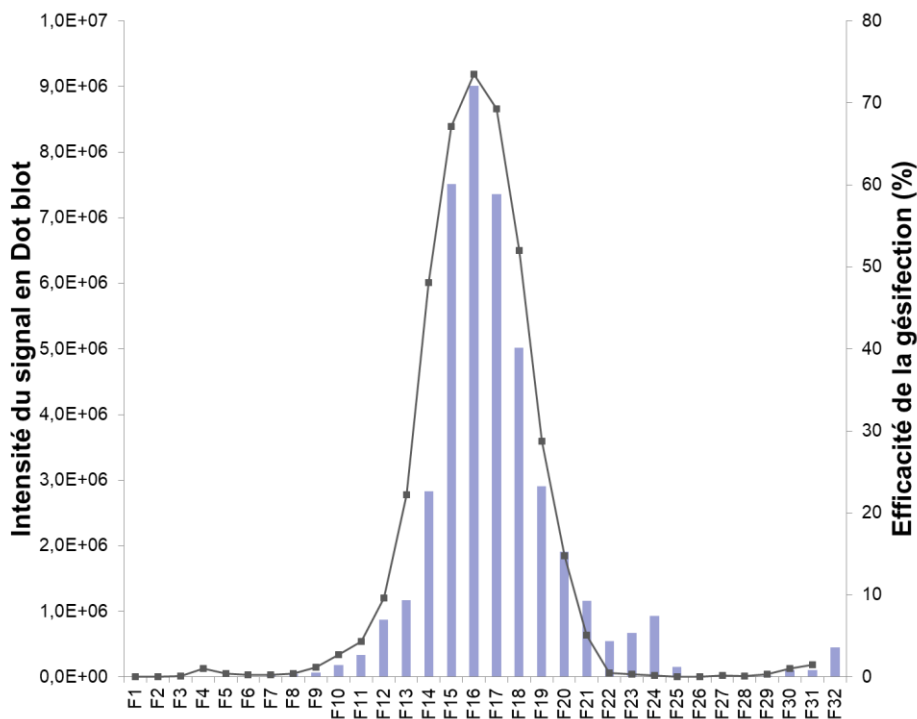


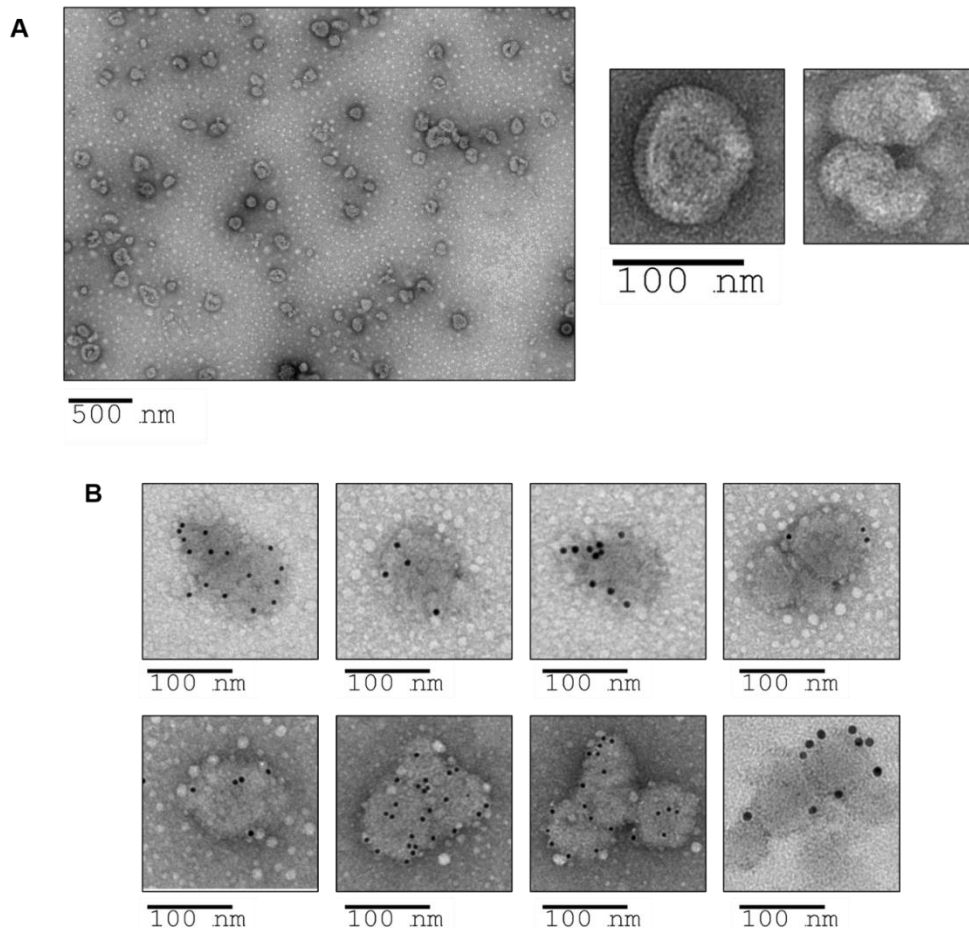
Figure 21 : Quantification par densitométrie des signaux obtenus par immunobuvardage de type dot blot et efficacité de transfection des fractions recueillies à l'issue du gradient d'iodixanol.

La quantification des signaux obtenus a été effectuée avec le logiciel ImageQuant LAS 4000. L'efficacité de gésiffection de chaque fraction a été évaluée en formant un complexe avec 10  $\mu$ L de fraction, 1  $\mu$ g/mL de plasmide codant pour la GFP et 8  $\mu$ g/mL de bromure d'hexadiméthrine. À la suite d'une incubation de 10 minutes à température ambiante, les complexes sont déposés sur des cellules. Le lendemain, les cellules sont analysées en cytométrie de flux pour détecter la fluorescence de la GFP.

### 3.3.3 Analyse morphologique

La fraction 16 (F16) récoltée à l'issue du gradient d'iodixanol, ayant démontré la meilleure efficacité de livraison d'ADN, a été dialysée contre une solution aqueuse contenant 10 mM de Tris-HCl et 1 mM d'EDTA. Ensuite, l'échantillon a été visualisé en microscopie électronique avec une coloration négative (Figure 22). Les images révèlent la présence de particules sphériques entourées d'une corolle correspondant aux protéines transmembranaires. Par ailleurs, les images révèlent peu de débris et des vésicules de tailles relativement homogènes avoisinant 100 nm. Les gésicules produites dans le cadre de cette thèse sont similaires à celles visualisées par Mangeot et al., en termes de taille et de

forme (Mangeot et al. 2011). De manière générale, la forme et la taille des gésicules observées (Figure 22-A) sont similaires à celles des particules pseudo-virales et de virus enveloppés tels que le virus de la grippe (C.-Y. Wu et al. 2010). Par ailleurs, à la suite d'un marquage avec un anticorps couplé à des billes d'or, la figure 22-B confirme la présence de la protéine VSV-G à la surface des gésicules.



*Figure 22 : Détermination de la morphologie des gésicules et de la présence de la protéine VSV-G. La fraction 16 du gradient d'iodixanol a été dialysée. (A)- Gésicules observées par microscopie électronique en coloration négative. (B) Gésicules marquées avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine VSV-G et un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 10 nm.*

La taille des gésicules a également été analysée par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). La DLS est une technique non destructive, ne nécessitant aucun marquage et permettant d'analyser les particules en solution, proche de leur état naturel. Le principe est basé sur la détection des changements dans le mouvement Brownien des particules en solution,



permettant d'en évaluer la taille moyenne et la distribution. L'analyse par DLS de l'échantillon (F16) de gésicules purifiées et dialysées révèle un diamètre moyen des particules de 143,5 nm avec un indice de polydispersité moyen de 0,291 et un coefficient de diffusion moyen de  $3.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . (Figure 23-A et 23-B).

La taille obtenue par DLS apparaît supérieure à celle obtenue par microscopie électronique. Cette différence peut s'expliquer par la présence de gésicules agrégées en solution telles qu'observées pour d'autres particules pseudo-virales (Lopez et al. 2017). L'état hydraté en DLS versus déshydraté en microscopie électronique peut également être une explication (Nikitin et al. 2015). L'indice de polydispersité représente la distribution de la population en termes de taille dans l'échantillon analysé. La valeur obtenue est contenue dans une gamme de 0 (uniformité parfaite des particules) à 1 (grande hétérogénéité de tailles des particules). Bien qu'aucune recommandation n'existe pour les particules pseudo-virales, la littérature décrit qu'une population de vésicules lipidiques destinées à livrer des médicaments est homogène avec un index de polydispersité  $\geq 0,3$  (Badran et Arabia 2014; M. Chen, Liu, et Fahr 2011). Au regard de ces critères, les solutions de gésicules préparées dans ces expériences peuvent donc être considérées comme homogènes.

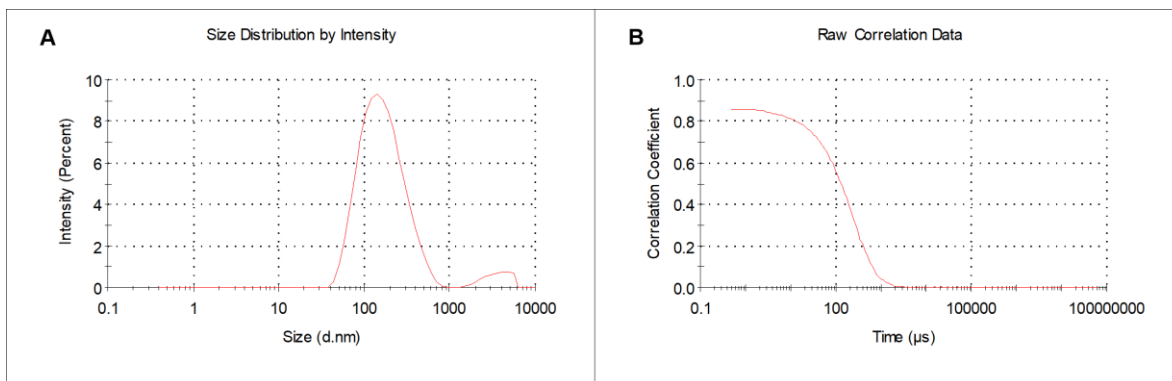


Figure 23 : Analyse des gésicules par DLS.

La fraction 16 du gradient d'iodixanol a été dialysée. Analyse du diamètre moyen des gésicules dans une solution composée de 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) et 1 mM d'EDTA, à 25 °C. (A) Courbe de la distribution de taille. (B) Courbe de corrélation. Les résultats obtenus représentent la moyenne de 3 séries consécutives de 12 mesures pour trois différents lots de gésicules.

### 3.3.4 Analyse de la composition protéique

Plusieurs études contenant des analyses protéomiques ont démontré que les virus et les particules pseudo-virales incorporent de nombreuses protéines provenant des cellules qui les produisent (Cantin, Méthot, et Tremblay 2005; Maxwell et Frappier 2007; Song et al. 2011). Toutefois, à ce jour, aucune information n'est disponible sur la composition protéique des gésicules produites en cellules HEK293. Ces renseignements permettront d'évaluer si les gésicules contiennent des éléments susceptibles d'entraîner des modifications indésirables dans les mécanismes des cellules à transfecter tels que des molécules de régulation, des oncogènes ou encore des éléments cytotoxiques. Pour ce faire, 20 µg de gésicules purifiées par ultracentrifugation sur gradient d'iodixanol et dialysées, ont été séparées sur un gel gradient de polyacrylamide de 10-20% puis colorées avec du bleu de Coomassie. Afin d'identifier le profil protéique des gésicules, le gel a été découpé en 11 fragments (Figure 24-A), puis traité par digestion à la trypsine pour être analysé par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). L'analyse protéomique a permis d'identifier 692 protéines d'origine humaine. Ces protéines ont ensuite été regroupées en fonction de leur propriété biologique. Les principales catégories (Figure 24-B) sont : les enzymes (51,6%), les protéines du cytosquelette (18,6%), les protéines impliquées dans la transduction de signaux cellulaires (14,7%), les protéines ribosomales (12%), et les protéines de choc thermique (3,1%). Parmi les enzymes, 9 classes ont pu être identifiées (Figure 24-C). Les enzymes le plus représentées sont les kinases (35,3%), les phosphatases (12%) et les ATPases (11,3%). Les protéines du cytosquelette (Figure 24-D) sont représentées par l'actine (47,9%), les protéines du transport vésiculaire (25%), la myosine (14,6%) et la tubuline (12,5%). Notons également la présence de 877 protéines d'origine bovine qui proviennent du sérum contenu dans le milieu de culture lors de la production. La présence de ces protéines peut suggérer que le procédé de purification utilisé n'est pas assez résolutif dans la séparation des différents éléments. Ainsi, certaines protéines du sérum pourraient rester liées aux gésicules.

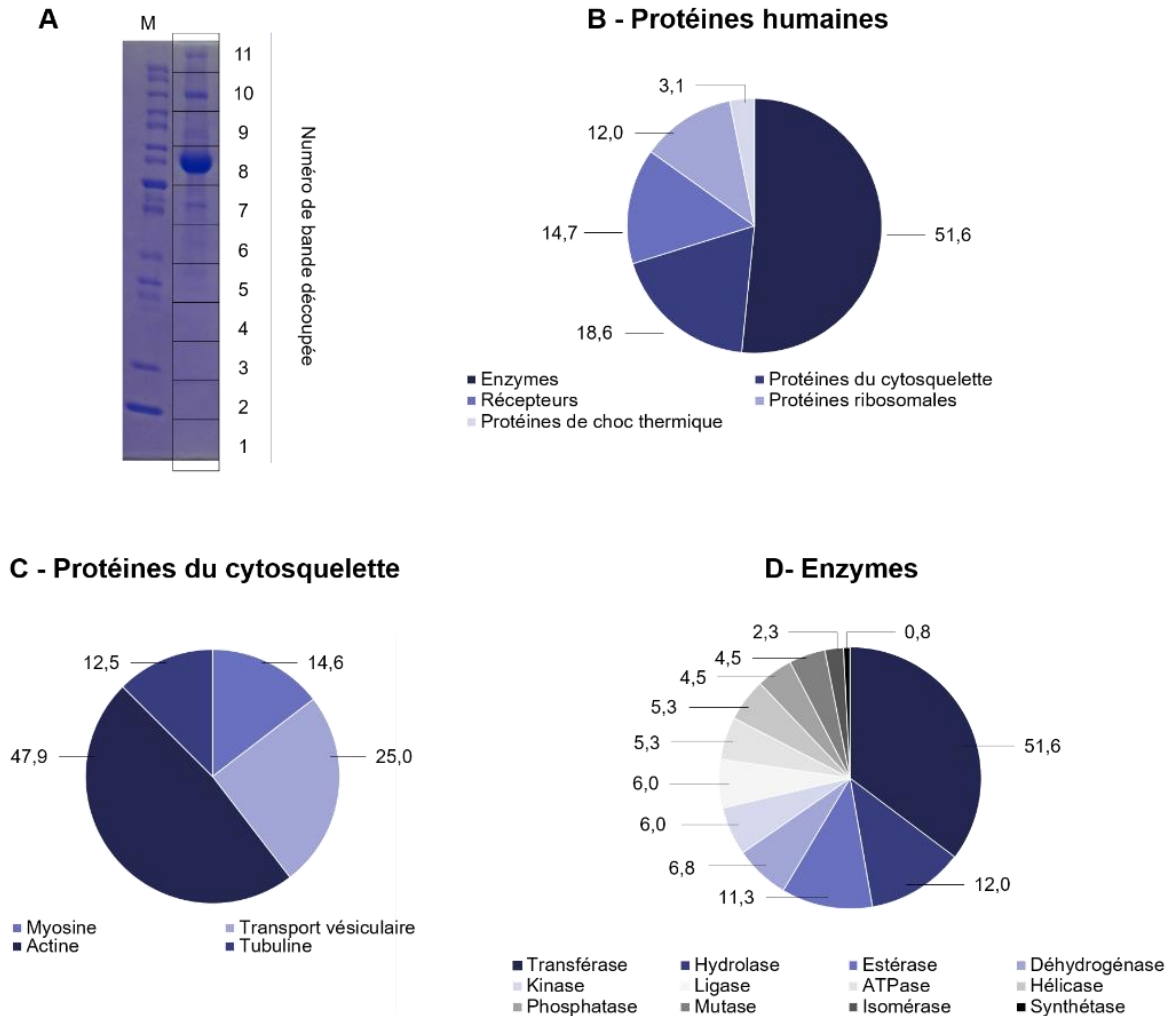


Figure 24 : Analyse protéomique de la composition des gésicules purifiées.

(A)-Séparation des protéines des gésicules par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (B)- Principales catégories de protéines humaines identifiées. (C)- Classement des principales protéines du cytosquelette. (D)- Classement des enzymes identifiées.

Parmi toutes ces protéines contenues dans les gésicules, on peut également mettre en évidence la présence de protéines de choc thermique (HSP 70, HSP 71 et HSP 90) qui sont impliquées dans la synthèse, le repliement, la translocation et la prévention de l'agrégation des protéines. Les protéines de choc thermiques de haut poids moléculaires sont particulièrement surexprimées en cas de stress de la cellule et notamment dans le cas des infections virales (Santoro, Amici, et Rossi 2010). Par ailleurs, leur présence a également été mise en évidence dans la composition des exosomes, du VIH

ainsi que des particules pseudo-virales et du virus de la grippe (C.-Y. Wu et al. 2010; Ha, Yang, et Nadithe 2016; Venereo-Sánchez et al. 2019).

De plus, l'analyse protéomique permet de mettre en évidence la présence de trois protéines oncogènes. Deux d'entre elles (sp|P12931-2 et sp|Q99816-2) proviennent du génome d'origine des cellules HEK293 (avant transformation) alors que la troisième (E1B) est exprimée par les cellules HEK293 mais provient du génome de l'adénovirus. Les cellules HEK293 ont été développées, il y a plus de 40 ans, à la suite de l'insertion d'une séquence de l'adénovirus de type 5 codant pour l'expression des protéines oncogènes E1A et E1B (Graham et Van Der Eb 1973) dans le chromosome 19 (Louis, Eveleigh, et Graham 1997). Dans les cellules, la protéine E1B est localisée dans le noyau mais également dans le cytoplasme, ce qui explique sa présence dans les gésicules (Harada et al. 2002; Querido et al. 2001). En revanche, aucune trace de la protéine E1A n'a été détectée dans les gésicules ce qui est cohérent avec le fait que cette protéine est localisée exclusivement dans le noyau cellulaire (Bayley et Mymryk 1994). De manière générale, la lignée HEK293 est très intéressante pour la production de gésicules puisqu'elle est très facile à transfecter, les procédés de culture sont bien connus et certaines lignées se cultivent en suspension et sans sérum (Chin et al. 2019; Robert, Chahal, et al. 2017). Toutefois, il existe encore des inquiétudes concernant l'utilisation de cette lignée cellulaire pour des applications thérapeutiques, en raison de leur susceptibilité à de nombreux virus et l'expression de ces deux oncogènes. (Shen et al. 2008; Stepanenko et Dmitrenko 2015; J. Hu et al. 2018). Toutefois, plusieurs produits biopharmaceutiques fabriqués à partir de cellules HEK293 ont été approuvés par les autorités réglementaires américaines (Food and Drug Administration) pour un usage thérapeutique (Dumont et al. 2016). Des études plus poussées sur le potentiel oncogène des gésicules devront donc être réalisées afin d'envisager une utilisation *ex vivo* et *in vivo*. Enfin, et ce sans surprise, l'analyse protéomique révèle la présence de la protéine VSV-G dans les gésicules. Ces résultats suggèrent qu'une grande diversité de protéines provenant des cellules productrices se retrouve incorporée dans les gésicules pendant leur formation.

### **3.4 Conclusion**

Ce chapitre permet d'apporter des informations importantes sur la caractérisation des gésicules. Tout d'abord, la formation de complexes entre les gésicules, le bromure d'hexadiméthrine et l'ADN a été clairement mis en évidence par la technique de retard sur gel. Par la suite, des gésicules purifiées ont été visualisées par microscopie électronique, révélant leur forme sphérique enveloppée d'une

membrane plasmique contenant des protéines VSV-G. Les gésicules produites dans cette thèse possèdent une taille d'environ 100 nm en microscopie électronique alors que l'analyse en solution, par la technique de diffusion dynamique de la lumière, indique un diamètre de 143,5 nm. L'hydratation des gésicules est une hypothèse déjà rapportée mais la présence de gésicules agrégées en solution peut également expliquer cette différence. Enfin, l'analyse de la composition protéique des gésicules produites en cellules HEK293 a été rapportée pour la première fois. En effet, de nombreuses protéines provenant des cellules productrices ont été identifiées, avec des fonctions biologiques variées (cytosquelette, protéines de choc thermiques, enzymes, signalisation...). Il est également important de noter la présence de protéines oncogènes dans la composition des gésicules. Toutefois, cela ne constitue pas nécessairement un frein à l'utilisation des gésicules pour de futures applications thérapeutiques puisque des bioproduits issus de cellules HEK293 ont déjà été approuvés (Dumont et al. 2016).

# **Chapitre 4 : Analyse des mécanismes de la gésifection**

## **4.1 Introduction**

Plusieurs barrières biologiques doivent être franchies pour livrer efficacement des acides nucléiques. Ces barrières regroupent la fixation à la surface des cellules, le passage de la membrane plasmique, la fuite des endosomes, le transport au noyau et le passage de l'enveloppe nucléaire. Comme décrit au paragraphe 1.1.3, il existe différents agents non viraux pour livrer des acides nucléiques tels que les lipides cationiques, les polymères cationiques, les peptides, les gésicules ou encore des combinaisons avec ces différents éléments. Par ailleurs, des éléments de fonctionnalisation peuvent être ajoutés à ces agents afin d'en améliorer l'efficacité. Il s'agit par exemple, de l'utilisation de ligands pour cibler la membrane plasmique et augmenter la pénétration cellulaire, de peptides avec un rôle dans la fuite des endosomes ou encore de molécules de localisation nucléaire pour favoriser la livraison au noyau. L'une des stratégies prometteuses pour élaborer des agents de livraison plus efficace est d'outre passer ou de contourner les voies cellulaires limitantes à la transfection comme décrite précédemment. Pour ce faire, il est donc primordial d'avoir une compréhension approfondie des mécanismes par lesquels les agents de livraison interagissent avec les cellules et d'identifier les voies limitantes. Avant cette thèse, aucun mécanisme cellulaire n'a été décrit concernant les processus de livraison d'acides nucléiques utilisant la gésifection.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Construction des plasmides utilisés dans cette étude**

Voir paragraphe 2.4.1.

### **4.2.2 Culture cellulaire**

Les cellules HeLa (CCL-2™) ont été obtenues de la compagnie ATCC et ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine et 5% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de chez Hyclone™). Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La concentration et la viabilité cellulaire ont été déterminées par comptage direct des cellules au microscope en utilisant la méthode

d'exclusion au bleu de Trypan. Des cellules HeLa ayant 20 passages au plus ont été utilisées dans les expériences décrites ci-dessous.

### **4.2.3 Préparation des gésicules**

Voir paragraphe 2.4.4.

### **4.2.4 Livraison de plasmides par gésiffection**

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, à raison de  $5 \times 10^3$  cellules par puits, 24 heures avant la gésiffection. Deux heures avant la gésiffection, le milieu de culture a été remplacé par 50  $\mu\text{L}$  de milieu frais dans chaque puits. Les tests de gésiffection ont été réalisés en utilisant les conditions définies au paragraphe 2.5.7, permettant d'obtenir les meilleurs résultats de livraison, soit 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gésicules, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de pKCMV5/GFP ou de pKCMV5 marqué au Cy5 et 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de bromure d'hexadiméthrine. Le marquage des plasmides avec le fluorophore Cy5 a été réalisé selon le protocole fourni par le fournisseur (Label It®, Myrius). Brièvement, les plasmides purifiés (Maxiprep, Qiagen) sont mélangés à la solution de Cy5 avec un ratio plasmide/Cy5 = 1/1 (m/v) et incubés une heure à 37 °C avant d'être purifiés par précipitation à l'éthanol. Le culot d'ADN est dilué dans de l'eau stérile à une concentration de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Les complexes de gésiffection ont été constitués dans 50  $\mu\text{L}$  de milieu OptiMEM (Thermo Fisher) et incubés pendant 10 minutes avant d'être ajoutés aux cellules. La détection de la fluorescence (GFP et Cy5) a été effectuée par cytométrie de flux comme décrit ci-dessous.

### **4.2.5 Détection de la GFP et du Cy5 dans les cellules par cytométrie de flux**

Les cellules ont été récoltées 24 heures post-transfection à la suite d'un traitement à la trypsine et filtrées au travers d'un filtre Nitex en nylon de 310  $\mu\text{m}$  (Sefar Group) pour éliminer les agrégats cellulaires. L'expression de la GFP et la fluorescence du Cy5 ont été détectées par cytométrie de flux en utilisant un cytomètre BD Accuri C6 (Becton Dickinson) équipé d'un laser à ion argon de 50 mW. Un filtre d'émission de 510 (FL1) ou de 675 nm (FL4) a été utilisé pour détecter la fluorescence de la GFP ou du Cy5, respectivement. Au moins 10 000 cellules viables ont été analysées. Deux paramètres ont été utilisés pour analyser l'efficacité de transfection : le pourcentage (%) de cellules fluorescentes et l'index de fluorescence décrit au paragraphe 2.4.8. Les données obtenues sont représentatives de

3 ou 4 réplicatas de 2 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard entre ces différents répliquas.

#### **4.2.6 Évaluation de la toxicité cellulaire des inhibiteurs métaboliques de l'endocytose et du transport intracellulaire.**

Les cellules ont été préparées dans des plaques 96 puits tel que décrit au paragraphe 4.2.4. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture a été remplacé par 50  $\mu$ L de nouveau milieu de culture contenant une concentration d'inhibiteur. La cytotoxicité de chaque inhibiteur a été évaluée sur une large gamme de concentration à partir des informations de la littérature. Pour les inhibiteurs de l'endocytose, les cellules ont été incubées pendant 3h30. Cette durée correspond au temps d'incubation minimum entre les complexes de gésification et les cellules, nécessaire pour détecter facilement un signal de fluorescence par cytométrie (paragraphe 4.2.5). Pour les inhibiteurs du transport intracellulaire, les cellules ont été incubées pendant 18 heures puisqu'il est nécessaire de maintenir l'inhibition jusqu'à ce que les plasmides atteignent le noyau de la cellule et expriment une quantité de GFP détectable par cytométrie de flux. Par la suite, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS pour être incubées pendant 1 heure à 37 °C avec du milieu de culture contenant 0,45 mg / ml du bromure 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) (jaune). Ce sel de tétrazolium est réduit dans les mitochondries des cellules viables pour former des cristaux insolubles de formazan (bleu). Les cellules sont donc lysées avec 50  $\mu$ L de solution de solubilisation contenant 40% (v/v) de diméthylformamide, 2% (v/v) d'acide acétique glacial et 16% (p/v) de SDS à pH 7.4. Après homogénéisation pour dissoudre complètement les cristaux de formazan, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde d'émission de 570 nm. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité comparativement à la condition sans inhibiteur (100% de viabilité).

#### **4.2.7 Analyse des voies de pénétration et de transport intracellulaire à l'aide d'inhibiteurs métaboliques**

Les cellules ont été préparées dans des plaques 96 puits tel que décrit au paragraphe 4.2.4. Pour identifier l'implication de mécanismes d'endocytose ou de fusion membranaire, ainsi que pour les expériences d'analyses des voies de pénétration, les cellules sont préalablement incubées pendant 30 minutes à 4 °C ou avec des concentrations non toxiques des inhibiteurs métaboliques suivants (Tableau 3) : chlorpromazine, amiloride et nystatin (Sigma Aldrich). Les complexes de gésification contenant des plasmides marqués au Cy5 ont été préparés comme décrit au paragraphe 4.2.4 en



présence de l'inhibiteur pour maintenir la concentration de ce dernier dans le volume finale après dépôt sur les cellules. Les cellules sont incubées 3h00 supplémentaires avant d'être analysées au cytomètre de flux pour détecter la fluorescence du Cy5 (paragraphe 4.2.5). Pour l'étude du transport intracellulaire, les cellules sont incubées pendant 4 heures avec les complexes de gésification en absence d'inhibiteur afin de permettre la pénétration des plasmides codant pour la protéine GFP. Les inhibiteurs nocodazole et ciliobrévin (Tableau 3) sont ensuite ajoutés dans le milieu de culture et les cellules sont incubées pendant 18 heures avant d'être analysées au cytomètre de flux pour détecter la fluorescence de la protéine GFP exprimée.

Tableau 3 : Inhibiteurs métaboliques, mécanismes d'actions et concentrations.

<b>Traitement</b>	<b>Effet</b>	<b>Mécanisme</b>	<b>Concentrations</b>
<b>Chlorpromazine</b>	Inhibiteur spécifique de l'endocytose dépendante des clathrines	Dissocie le réseau de clathrines	2,5 - 5- 10 - 30 $\mu$ M
<b>Nystatin</b>	Inhibiteur spécifique de l'endocytose liée aux cavéoles	Séquestre le cholestérol membranaire	2,5 - 5- 10 - 30 $\mu$ M
<b>Amiloride</b>	Inhibiteur spécifique de la macropinocytose	Inhibe l'activité du canal ionique Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	50 - 75 - 100 -200 $\mu$ M
<b>Nocodazole</b>	Inhibition spécifique de la polymérisation des microtubules	Bloque la dimérisation des tubulines	1 - 2,5 - 5 - 10 $\mu$ M
<b>Ciliobrévin</b>	Inhibiteur du transport intracellulaire dépendant des dynéines	Inhibe l'activité ATPase des dynéines	10 - 30 - 50 -100 $\mu$ M

#### 4.2.8 Analyses statistiques

La différence significative entre deux ou plusieurs groupes a été déterminée en utilisant, respectivement, le test T de Student ou l'analyse de la variance. Une valeur de la probabilité inférieure à 0,05 a été prise en considération pour indiquer une différence statistiquement significative.

## 4.3 Résultats et discussion

### 4.3.1 Efficacité de la solution de lavage

Les études sur la pénétration des complexes de transfection faisant intervenir le marquage de plasmides avec un fluorophore nécessitent de pouvoir détecter spécifiquement la fluorescence intracellulaire sans biais provenant de complexes restés fixés à la membrane des cellules. Dans la littérature, les protocoles de lavages sont très hétérogènes en termes de fréquence et de composition. Quelques publications mentionnent l'importance de vérifier l'efficacité des solutions de lavages dans le système expérimental choisi afin d'éliminer les complexes de transfection fixés à la membrane cellulaire, ce qui faussent la détection du signal intracellulaire (Iwasa et al. 2006; Kameyama et al. 2007; R. K. Keswani, Lazebnik, et Pack 2015). Toutefois, plusieurs publications utilisent simplement du PBS comme solution de lavage (Fernando et al. 2010; Hällbrink et al. 2004; Y. Wu et al. 2011b). L'objectif de cette expérience est d'identifier une solution de lavage permettant d'éliminer efficacement les complexes de gésiflection liés à la surface des cellules afin de détecter uniquement l'ADN internalisé. L'efficacité de différentes solutions de lavages décrites dans la littérature a donc été comparée (Tableau 4). Pour ce faire, des cellules ont été préalablement traitées avec de l'azide de sodium pour bloquer la pénétration membranaire tel que décrit dans la littérature (Y. Li et Monteiro-Riviere 2016). L'azide de sodium est bien connu pour inhiber la phosphorylation oxydative via l'inhibition de la cytochrome oxydase. Il s'agit de la dernière enzyme de la chaîne de transport d'électron mitochondriale dont l'inhibition aboutie à l'épuisement rapide de l'ATP intracellulaire (Harvey, Hardy, et Ashford 1999). Par la suite, les cellules ont été incubées avec des complexes de gésiflection contenant des plasmides marqués au Cy5. Les cellules sont ensuite lavées avec l'une des solutions de lavage avant d'être analysées au cytomètre de flux pour évaluer la quantité de complexes Cy5 restée fixée à la surface des cellules. L'index de fluorescence a été calculé pour chaque condition et exprimé en pourcentage par rapport à la solution de référence (A) constitué uniquement de PBS 1X.

La Figure 25 révèle que les solutions de lavage contenant individuellement du SDS (solution B), de l'héparine (solution C) ou de la glycine à pH 3,1 (solution D) diminuent de plus de 70% l'intensité du signal Cy5 présent à la membrane cellulaire comparativement à la solution de référence (A = PBS). Par ailleurs, la combinaison de ces conditions de lavage (solution E) ne montre aucune amélioration significative comparativement aux solutions B, C et D. Également, les cellules lavées avec les solutions A, B, C et D présentent une viabilité supérieure à 80% alors que la viabilité des cellules lavées avec la

solution E est de 63% (Figure 26). La solution B, composée de PBS 1X et de SDS à 0,001%, sera choisie car elle permet d'obtenir la meilleure efficacité de lavage avec une excellente viabilité cellulaire dans les conditions expérimentales.

Par la suite, les expériences de gésifaction comprenant des lavages avec la solution B ont été réalisées afin d'évaluer l'intensité du signal non spécifique (complexes liés à la surface des cellules) comparativement à l'intensité du signal total mesuré (complexes intracellulaires et à la surface). Les résultats (Figure 27) montrent qu'à la suite des lavages avec la solution B, l'intensité du signal Cy5 à la surface des cellules (bruit de fond) représente seulement 0,9% du signal Cy5 total. En d'autres termes, ce protocole de lavage garanti que 99,1% de l'index de fluorescence du Cy5 détecté par cytométrie de flux est d'origine intracellulaire à condition d'utiliser les mêmes paramètres de gésifaction.

Tableau 4 : Composition des solutions de lavage testées.

<b>Composition des solutions de lavage</b>					
<b>Composition</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>PBS 1 X</b>	X	X	X	X	X
<b>SDS 0,001 %</b>		X			X
<b>Héparine 20 µg / mL</b>			X		X
<b>Glycine 0,2 M pH 3,1</b>				X	X
<b>Références</b>	(Capel et al. 2016)	(R. K. Keswani, Lazebnik, et Pack 2015)	(Iwasa et al. 2006)	(Kameyama et al. 2007)	-

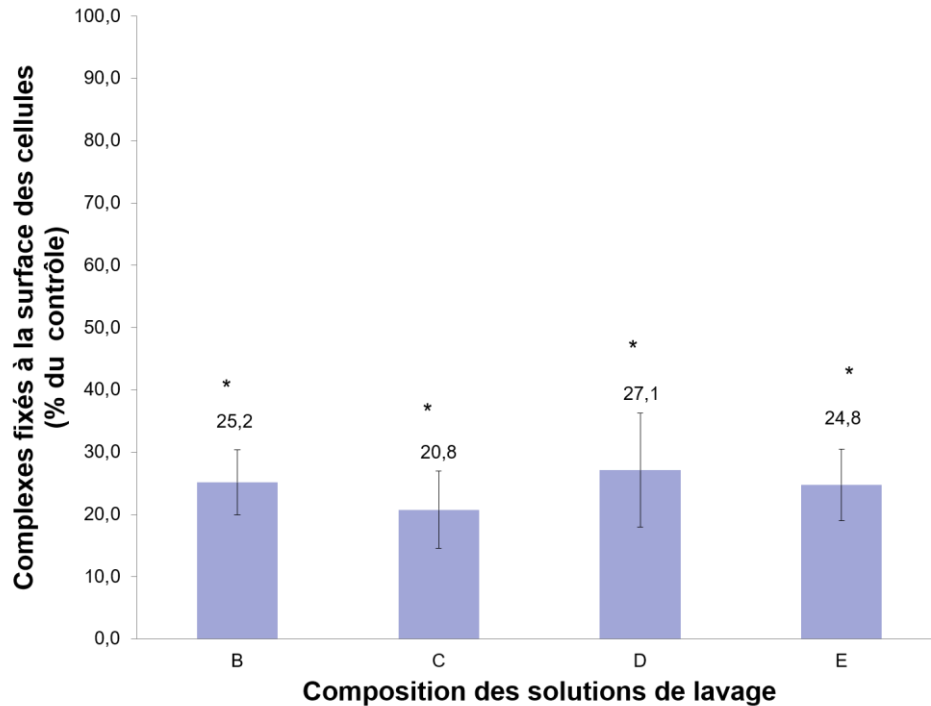


Figure 25 : Efficacité de différentes solutions de lavage pour éliminer les complexes de gésiffection liés à la surface des cellules.

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, 24 heures avant la gésiffection. Trente minutes avant la gésiffection, les cellules ont été traitées avec de l'azide de sodium pour épuiser l'ATP cellulaire. Les complexes de gésiffection contenant un plasmide marqué au Cy5 sont incubés pendant 24 heures avec les cellules. Par la suite, le milieu contenant les complexes a été retiré et les cellules ont été rincées 3 fois avec l'une des solutions de lavage étudiées puis lavées une dernière fois au PBS. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux pour détecter la fluorescence du Cy5 à la surface des cellules. L'index de fluorescence a été calculé pour chaque condition et exprimé en pourcentage par rapport à la solution de référence (A) constitué uniquement de PBS 1X. Le pourcentage de cellules fluorescentes est indiqué au-dessus des histogrammes. Les résultats sont représentatifs de deux expériences ou chaque condition a été réalisée en triplicata. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

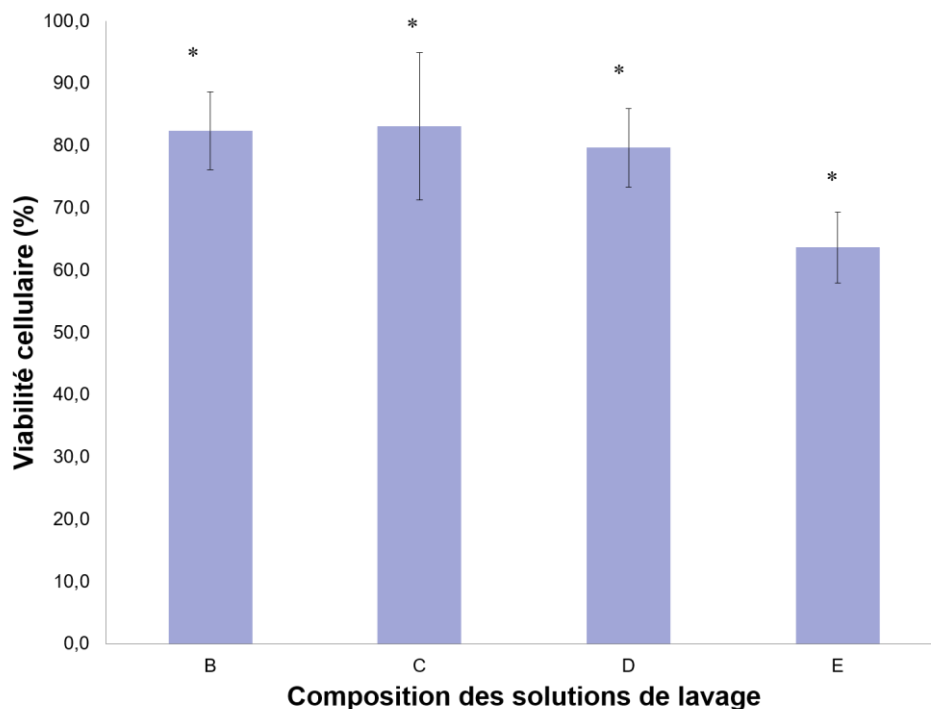


Figure 26 : Effet cytotoxique des solutions de lavage.

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, 24 heures avant le traitement par les différentes solutions de lavage. Le jour du traitement, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées 3 fois avec les solutions listées dans le Tableau 4. La viabilité des cellules a été mesurée par la méthode du MTT. Les valeurs ont été exprimées en pourcentage du contrôle (solution A = PBS). Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en 12 réplicatas. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

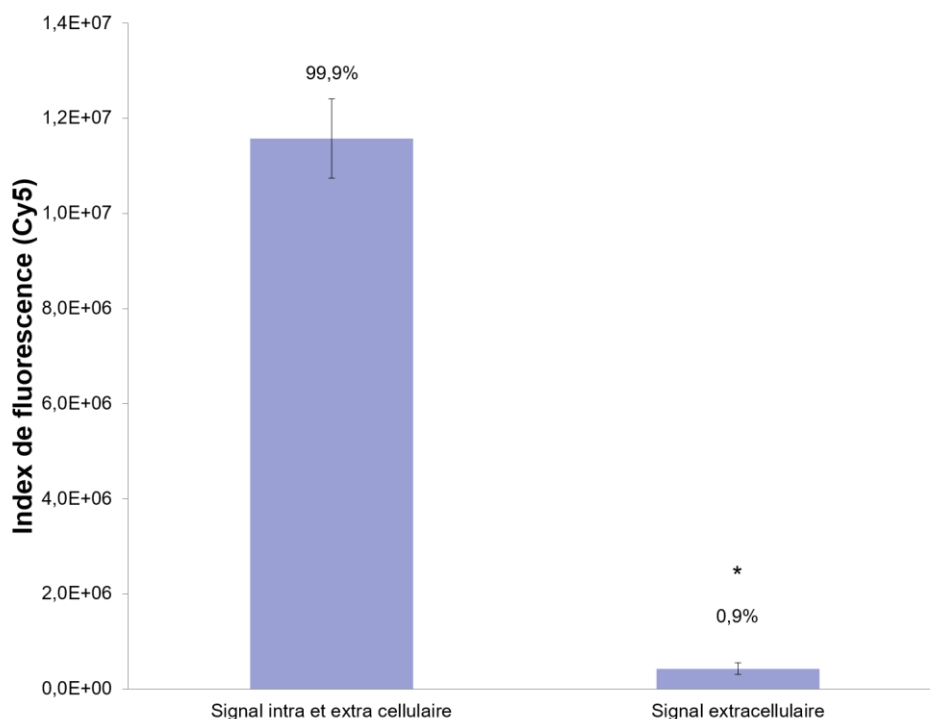


Figure 27 : Présence de complexes liés à la surface des cellules après lavage avec la solution B. Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésifiction. La présence de complexes de gésifiction à la surface cellulaire a été évaluée en cytométrie de flux sur des cellules traitées à l'azide de sodium puis incubées avec des complexes contenant de l'ADN marqué au Cy5 et enfin lavées avec la solution B. Des cellules non traitées à l'azide de sodium ont permis de déterminer le signal Cy5 total (complexes liés à la surface cellulaire et situé à l'intérieur de la cellule). Les résultats ont été exprimés en termes d'index de fluorescence (intensité de fluorescence \* pourcentage de fluorescence). Le pourcentage de cellules transfectées est indiqué au dessus de chaque barre. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3.2 Implication du bromure d'hexadiméthrine et des gésicules dans le processus de gésifiction

La gésifiction implique l'utilisation de bromure d'hexadiméthrine et de gésicules pour faire pénétrer de l'ADN dans les cellules dans le but qu'il soit conduit au noyau pour y être exprimé. L'objectif de cette expérience était de comprendre en quoi le bromure d'hexadiméthrine et les gésicules sont impliqués dans ce processus de transfection. L'expérience a consisté à mélanger de l'ADN sous forme de plasmides codant pour la GFP ou préalablement marqué au Cy5 avec du bromure d'hexadiméthrine

et/ou des gésicules avant que ces mélanges soient déposés sur des cellules HeLa. Après une incubation de 24 heures, les cellules ont été lavées et la fluorescence intracellulaire (Cy5 ou GFP) a été détectée au cytomètre de flux. Les résultats obtenus avec des plasmides marqués au Cy5 (Figure 28) montrent que les plasmides seuls ont pu pénétrer dans moins de 3% des cellules. En combinant les plasmides marqués au Cy5 et les gésicules en absence de bromure d'hexadiméthrine, l'efficacité de transfection atteint 28,6% des cellules. Les gésicules contribuent donc à la pénétration des plasmides dans les cellules. En mélangeant des plasmides marqués au Cy5 et du bromure d'hexadiméthrine, le pourcentage de cellules transfectées est de 91,9%. Le bromure d'hexadiméthrine est donc 3 fois plus efficace que les gésicules pour faire pénétrer des plasmides dans des cellules HeLa. D'ailleurs, l'ajout de bromure d'hexadiméthrine au mélange contenant des plasmides marqués au Cy5 et des gésicules, multiplie par 3,4 le pourcentage de cellules avec une fluorescence spécifique du Cy5 (Figure 28). Les résultats obtenus indiquent que le bromure d'hexadiméthrine joue un rôle majeur dans la pénétration des complexes de gésification. Par ailleurs, ces résultats sont appuyés par la littérature. En effet, le bromure d'hexadiméthrine est couramment utilisé pour améliorer l'efficacité d'infection des lentivirus (Clark et al. 1999; Davis, Morgan, et Yarmush 2002). La nature cationique du bromure d'hexadiméthrine permettrait de neutraliser la répulsion électrostatique entre les lentivirus et la membrane cellulaire (Lin et al. 2011). De plus, le bromure d'hexadiméthrine a également été décrit comme un agent interagissant avec les charges des cellules et de l'ADN pour faciliter la pénétration cellulaire de plasmides (Chaney et al. 1988; Aubin et al. 1994). Toutefois, les résultats obtenus avec les plasmides codant pour la GFP (Figure 29) révèle une absence de fluorescence lorsque ces plasmides sont en présence de gésicules ou de bromure d'hexadiméthrine. Cela suggère que le bromure d'hexadiméthrine ou les gésicules, en simple combinaison avec des plasmides ne jouent pas de rôles dans les processus intracellulaires aboutissant à l'expression des gènes. En revanche, la combinaison des plasmides, du bromure d'hexadiméthrine et des gésicules, permet de détecter dans les cellules la fluorescence de la protéine GFP (Figure 29). Cela signifie que l'association des gésicules avec du bromure d'hexadiméthrine joue un rôle crucial dans le processus intracellulaire permettant aux plasmides transfectés d'être exprimés. Par ailleurs, l'ajout de gésicules au mélange contenant des plasmides marqués au Cy5 et du bromure d'hexadiméthrine permet d'obtenir un index de fluorescence Cy5 approximativement 4,3 fois plus élevé qu'en absence de gésicules, et ce avec une faible augmentation du pourcentage de cellules ayant internalisé les plasmides (Figure 28). Ce résultat signifie que l'ajout des gésicules à la combinaison contenant des plasmides et du bromure

d'hexadiméthrine, augmente la quantité de plasmides internalisés par cellule. Cette observation peut s'expliquer par le fait que les gésicules sont des particules pseudo-virales arborant à leur surface la protéine VSV-G. La littérature mentionne que cette glycoprotéine joue un rôle dans la fixation des virus aux cellules (paragraphe 1.3.1.2). La littérature décrit également que la protéine VSV-G joue un rôle majeur dans la fuite des endosomes permettant aux molécules internalisées d'être libérées (Abe, Miyanochara, et Friedmann 1998; Stéphane Roche et al. 2007). Néanmoins, la Figure 29 montre que 51,2% des cellules expriment la protéine GFP alors que 99,1% des cellules ont été transfectées avec un plasmide marqué au Cy5 (Figure 28). Outre la limite de détection du cytomètre utilisé, ces données suggèrent que dans près de la moitié des cellules transfectées avec les complexes de gésification, les plasmides n'atteignent pas le noyau. La littérature démontre, à l'aide d'études quantitatives de la livraison d'acides nucléiques, que moins de 3% des plasmides livrés dans le cytoplasme ont rejoint le noyau (Coonrod, Li, et Horwitz 1997; Tseng, Haselton, et Giorgio 1997). Par ailleurs, d'autres publications ont démontré qu'il était nécessaire d'injecter 30 à 100 fois plus de plasmides dans le cytoplasme que dans le noyau pour obtenir le même niveau d'expression d'une protéine modèle (Dean 1997; Ludtke, Sebestyén, et Wolff 2002). Enfin, des analyses réalisées sur des cellules HeLa transfectées avec  $10^6$  plasmides par cellules révèlent que seulement 2000 copies (0,2%) sont internalisées. Par ailleurs, ces analyses indiquent que 60% de ces 2000 copies sont localisées dans le noyau, soit 0,12% de la quantité de plasmides initiales (James et Giorgio 2000). Selon ces informations, il est possible de suggérer que près de la moitié des cellules transfectées par des complexes de gésification n'expriment pas la protéine GFP à cause d'une quantité de plasmides livrés trop faible. Ainsi, le nombre de plasmides atteignant le noyau est insuffisant pour obtenir un signal de fluorescence de la GFP détectable.



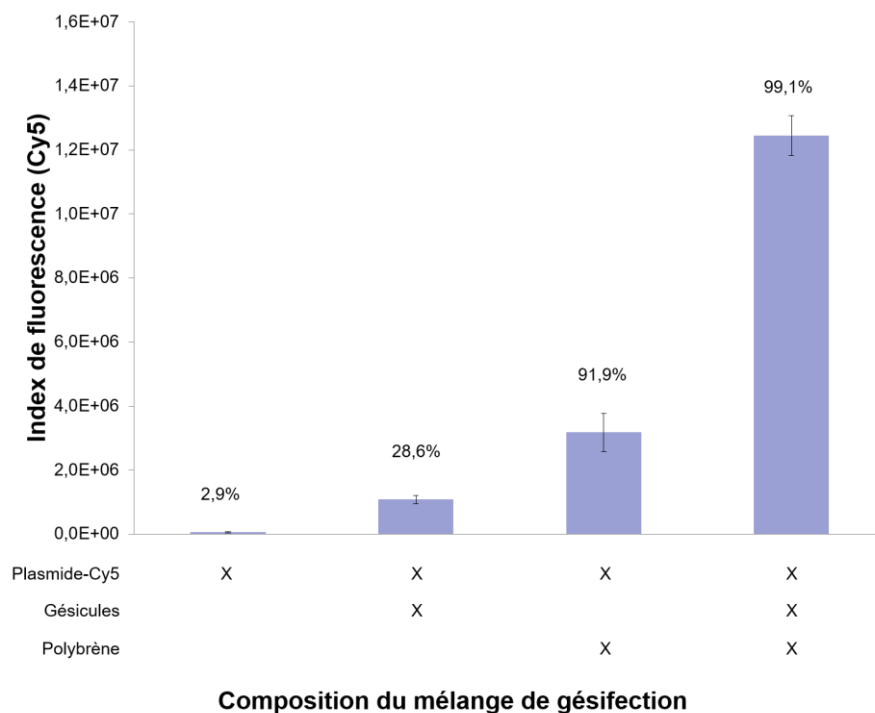


Figure 28 : Profil de pénétration cellulaire de l'ADN selon la composition des complexes de transfection. Les cellules HeLa ont été ensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésifaction. Différentes combinaisons de complexes de transfection incluant un plasmide marqué au Cy5 ont été préparées selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. Après dépôt sur les cellules, ces dernières ont été incubées pendant 24 heures avant d'être analysées par cytométrie de flux. Les résultats ont été exprimés en termes d'index de fluorescence (intensité de fluorescence \* pourcentage de fluorescence). Le pourcentage de cellules transfectées est indiqué au dessus de chaque barre. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata.

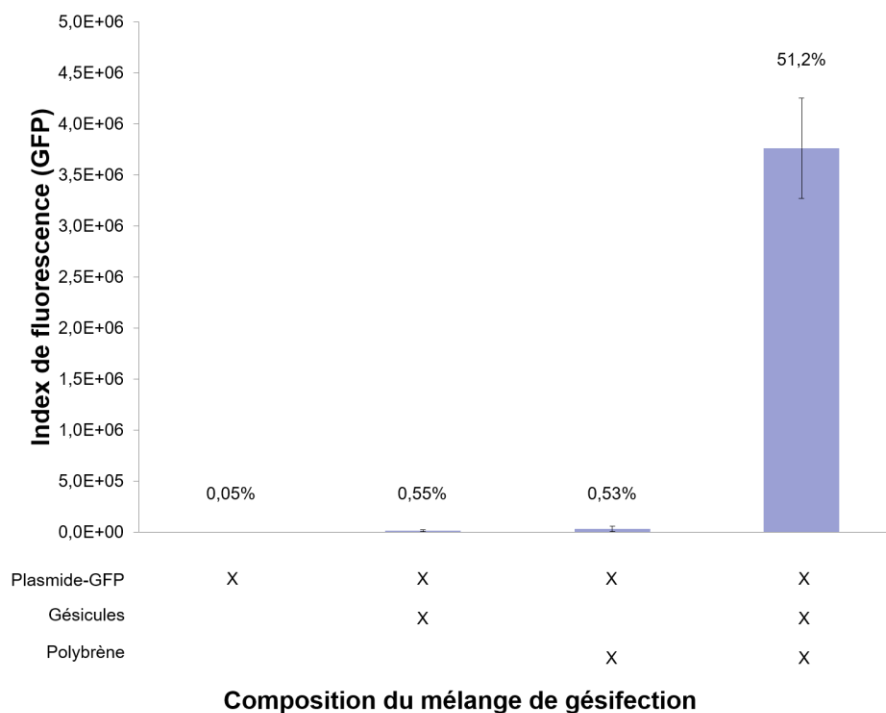


Figure 29 : Profil d'expression selon la composition des complexes de transfection.

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésiffection. Différentes combinaisons de complexes de transfection incluant un plasmide codant pour la GFP ont été préparées selon le protocole décrit en matériel et méthodes. Après dépôt sur les cellules, ces dernières ont été incubées pendant 24 heures avant d'être analysées par cytométrie de flux. Les résultats ont été exprimés en termes d'index de fluorescence (intensité de fluorescence \* pourcentage de fluorescence). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est indiqué au dessus de chaque barre. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3.3 Cinétique de pénétration et d'expression de l'ADN par gésiffection

Afin de poursuivre la caractérisation du processus de gésiffection, les cinétiques de pénétration et d'expression ont été établies à la suite du dépôt des complexes de gésiffection sur des cellules HeLa. La cinétique de pénétration a été obtenue en utilisant des complexes de gésiffection contenant des plasmides marqués au Cy5 (Figure 30). Pour ce faire, les cellules ont été incubées pendant différents temps avec des complexes de gésiffection avant d'être lavées et analysées au cytomètre de flux. Les résultats révèlent que presque la totalité des cellules ont été transfectées après 1 heure d'incubation

avec le complexe de gésification. Cela signifie que la pénétration cellulaire n'est pas un facteur limitant dans les cellules HeLa. Par ailleurs, l'index de fluorescence Cy5 augmente en fonction du temps jusqu'à la stabilisation du signal après 10 heures d'incubation. Puisque le pourcentage de cellules transfectées est stable, il s'agit plus précisément d'une augmentation de l'intensité de fluorescence Cy5. En corrélant l'intensité de fluorescence avec la quantité de plasmides marqués au Cy5, cela signifie que la pénétration des plasmides augmente pendant les dix premières heures de la gésification. La cinétique d'expression a été obtenue en utilisant des complexes de gésification formés avec des plasmides contenant une cassette d'expression de la protéine GFP. De la même manière que pour la cinétique de pénétration, les cellules ont été incubées pendant différents temps avec des complexes de gésification avant d'être lavées et analysées au cytomètre de flux. Les résultats (Figure 31) révèlent que l'expression de la GFP peut être détectée après 8 heures d'incubation avec les complexes de gésification (11,5%). Le pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP atteint son maximum à 48 heures (62,3%) après l'ajout des complexes de gésification et diminue après 72 heures. L'index de fluorescence de la protéine GFP atteint son maximum 60 heures après le dépôt des complexes de gésification. La viabilité cellulaire reste supérieure à 95% jusqu'à 48 heures post-transfection puis diminue progressivement probablement à cause de la toxicité provoquée par l'accumulation de la protéine GFP dans les cellules (données non montrées).

La littérature révèle que les ADN transfectés avec le PEI et la lipofectamine peuvent également être détectés 1 heure après le dépôt. Toutefois, la quantité maximum de complexes ayant pénétré dans les cellules est atteinte plus rapidement, soit 4 à 6 heures après le dépôt (Y. Wu et al. 2011a; van der Aa et al. 2007). Par ailleurs, il semblerait que dans nos conditions, les complexes de gésification pénètrent plus rapidement dans les cellules HeLa comparativement au chitosan. En effet, une étude rapporte que 8 à 12 heures sont nécessaires pour transfecter la totalité des cellules avec du chitosan (Thibault et al. 2010). De plus, il ne semble pas y avoir de différence dans la cinétique d'expression d'un transgène entre la gésification et les méthodes de livraison utilisant le PEI, le chitosan ou encore les lipides cationiques. En effet, il est décrit que ces différentes méthodes de transfection permettent de détecter une expression génique entre 5 à 7 heures après le dépôt, avec un maximum d'expression atteint à 48 heures. (Itaka et al. 2004; Kichler et al. 2001; Köping-Höggård et al. 2001; Thibault et al. 2010).

Par ailleurs, des analyses de PCR quantitative et de microscopie ont révélé que l'utilisation de lentivirus permettait d'atteindre un maximum de génomes viraux livrés dans le noyau de cellules HeLa seulement 30 minutes après le dépôt (N. Uchida et al. 2016; E. J. Lee, Lee, et Kim 2016). Cette cinétique de pénétration est plus rapide que celle obtenue avec la méthode de gésification (10 heures), bien que les méthodes de détection soient différentes. Par ailleurs, une publication utilisant l'imagerie en temps réel, décrit que le virus influenza est capable de pénétrer dans les cellules en moins de 3 minutes (Brandenburg et Zhuang 2007). Enfin, avec une méthode de détection similaire à celle utilisée pour obtenir les résultats de la Figure 31, une publication révèle que le papillomavirus humain possède une vitesse de pénétration proche de celle obtenue avec les complexes de gésification (Broniarczyk et al. 2015).

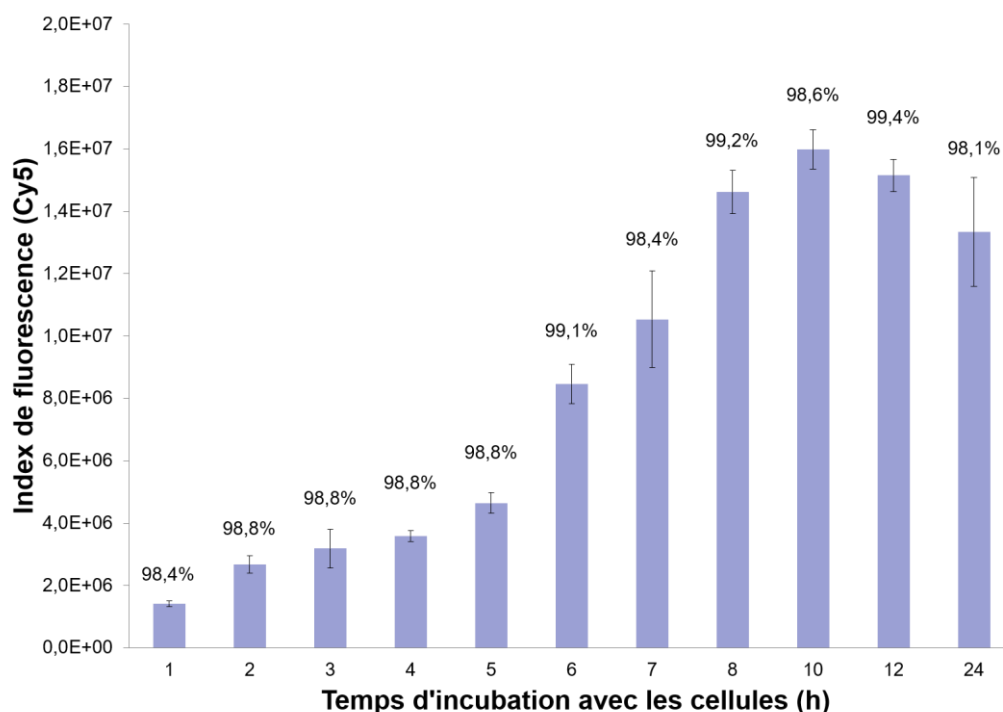


Figure 30 : Cinétique de pénétration des complexes composés d'un plasmide marqué au Cy5. Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésification. Les cellules ont ensuite été incubées pendant différents temps avec des complexes de gésification avant d'être lavées et analysées immédiatement au cytomètre de flux. Les résultats ont été exprimés en termes d'index de fluorescence (intensité de fluorescence \* pourcentage de fluorescence). Le pourcentage de cellules transfectées est indiqué au dessus de chaque barre. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata.

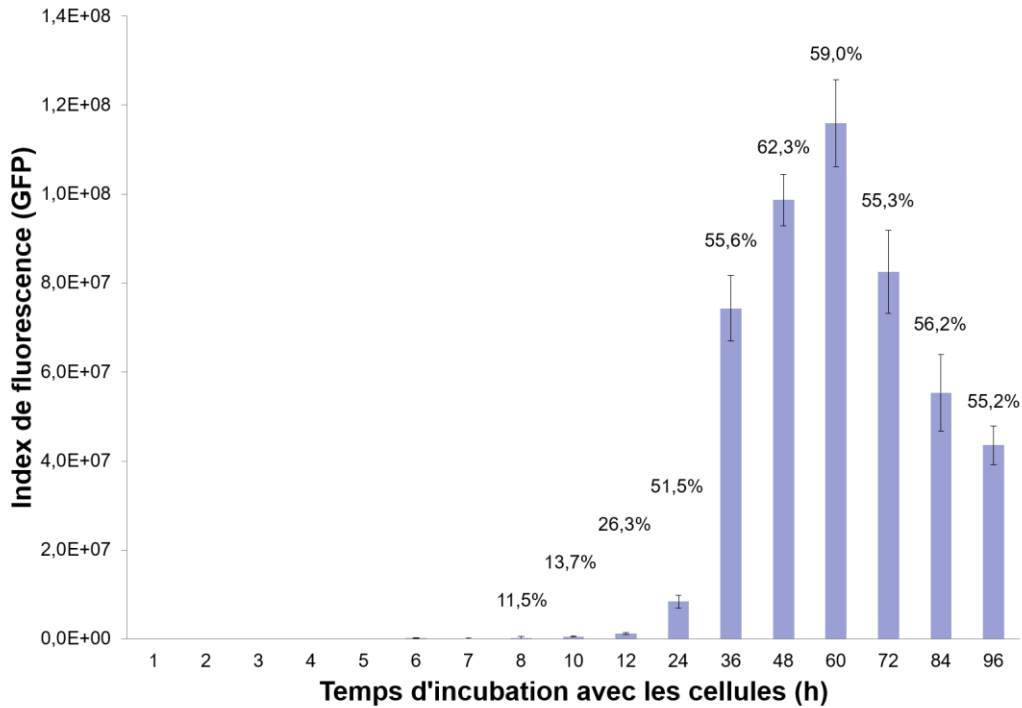


Figure 31 : Cinétique de pénétration des complexes composés d'un plasmide codant pour la GFP. Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésiffection. Les cellules ont ensuite été incubées pendant différents temps avec des complexes de gésiffection avant d'être lavées et analysées immédiatement au cytomètre de flux. Les résultats ont été exprimés en termes d'index de fluorescence (intensité de fluorescence \* pourcentage de fluorescence). Le pourcentage de cellules transfectées est indiqué au dessus de chaque barre. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata.

#### **4.3.4 Implication des mécanismes d'endocytose ou fusogénique**

L'endocytose est un ensemble de processus actifs dépendants de l'énergie par lequel les agents de livraison utilisent la machinerie cellulaire pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Ces processus sont régulés et impliquent de nombreuses enzymes ainsi que la consommation des molécules énergétiques telles de le GTP et l'ATP (Cooper 2000a). De manière différente, l'internalisation par fusion des membranes (fusogénique) est un mécanisme non spécifique par lequel certains agents de livraison entrent dans les cellules par fusion passive avec la membrane plasmique. En raison de sa dépendance au métabolisme énergétique, les mécanismes d'endocytoses sont inhibés à basse température (4 °C) tandis que le mécanisme de fusion est minimalement affecté par la température (Khalil et al. 2006). Dans le but de déterminer si les gésicules sont internalisées via endocytose ou fusion, les cellules ont été incubées à 4 °C avec les complexes de gésiffection contenant un plasmide marqué au Cy5. Les résultats ont démontré une diminution significative de la fluorescence intracellulaire lorsque la gésiffection est réalisée à 4 °C avec un taux d'inhibition proche de 100% (Figure 32). Cette expérience suggère que la pénétration des cellules par gésiffection implique des mécanismes cellulaires actifs tels que ceux de l'endocytose et non de fusion avec la membrane plasmique. Ces résultats semblent cohérents avec la littérature qui démontre que d'autres agents de livraison hybrides (R. Keswani, Su, et Pack 2014), des vésicules extracellulaires (Costa Verdera et al. 2017) et certains virus enveloppés comme le VSV, pénètrent uniquement dans les cellules par des voies d'endocytoses (Cureton et al. 2009; M. Luo 2012; Marsh, Pelchen-Matthews, et Hoxie 1997; Piccini, Castilla, et Damonte 2015).

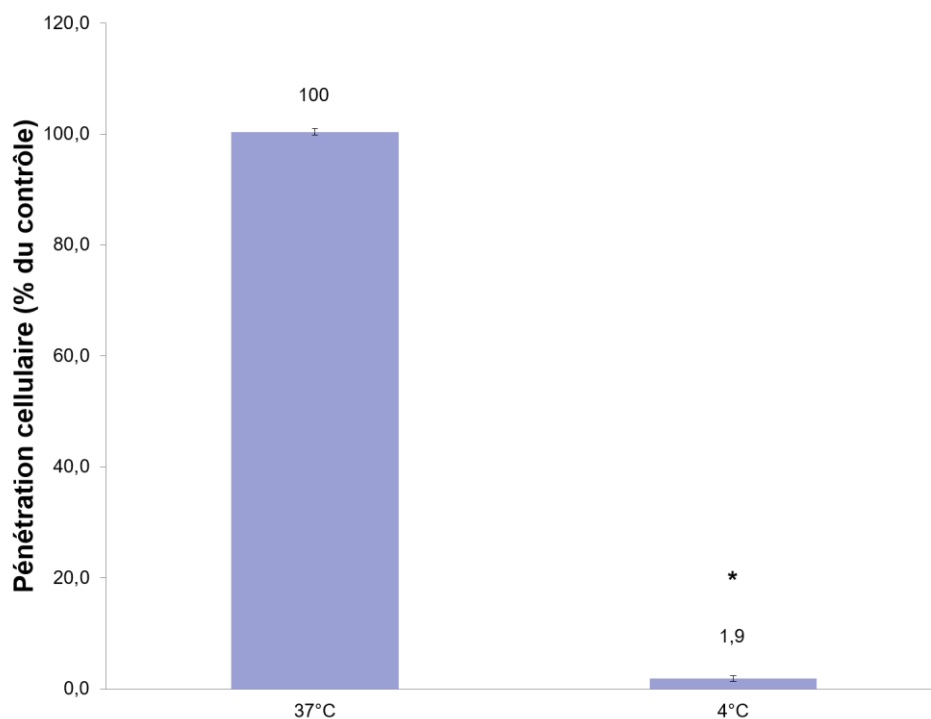


Figure 32 : Effet de la baisse de température sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésifaction. Le jour de la transfection, Les cellules ont été incubées pendant 3 heures à 37 °C ou à 4 °C avec les complexes de gésifaction contenant un plasmide marqué au Cy5 avant d'être analysées en cytométrie de flux. L'efficacité de pénétration cellulaire de l'ADN à basse température est déterminée en fonction de la condition à 37 °C (100 % de pénétration). Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \* Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.5 Concentration et cytotoxicité des inhibiteurs métaboliques pour étudier l'endocytose et le transport intracellulaire

Il existe différentes molécules permettant d'inhiber spécifiquement certaines voies d'endocytose et du transport intracellulaire. Toutefois, une utilisation non optimale de ces inhibiteurs est à l'origine de cytotoxicité, d'inefficacité et d'un manque de spécificité (Conner et Schmid 2003; Damke et al. 1995; Harush-Frenkel et al. 2007; Vercauteren et al. 2010). Par ailleurs, il a été démontré que les effets toxiques des inhibiteurs augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui peut fausser les résultats des tests d'endocytose (Vercauteren et al. 2010). Les conditions expérimentales doivent donc être définies en fonction du type cellulaire, de la concentration et du temps d'incubation avec les cellules afin de garantir la spécificité des inhibiteurs et la fiabilité des résultats d'inhibition des voies

métaboliques. Afin d'établir un protocole optimal pour l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose et du transport interne sur le modèle cellulaire utilisé (HeLa), il est important d'évaluer leur toxicité cellulaire dans nos conditions expérimentales. La viabilité des cellules HeLa a été étudiée après une exposition individuelle aux 5 inhibiteurs fréquemment utilisés : chlorpromazine, nystatin, ciliobrévin, amiloride et nocodazole (Figure 33). Différentes concentrations de chaque inhibiteur ont été testées sur cette lignée cellulaire et la viabilité cellulaire a été mesurée avec un test de MTT. Les inhibiteurs ont été dilués dans du milieu de culture et incubés avec les cellules. Les temps d'incubations ont été choisis en tenant compte des protocoles de la littérature. Ainsi, les inhibiteurs de l'endocytose (chlorpromazine, amiloride et nystatin) ont été incubés avec les cellules pendant 3h30 et les inhibiteurs du transport intracellulaire (nocodazole et ciliobrévin) pendant 18 heures. Le contrôle négatif a été obtenu à la suite d'une exposition des cellules avec du milieu ne contenant aucun inhibiteur. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire comparativement au contrôle négatif (100% de viabilité). La chlorpromazine, le nystatin, la ciliobrévin et le nocodazole démontrent une cytotoxicité qui augmente avec leur concentration. Par ailleurs, aucune des concentrations d'amiloride testées n'a eu un effet notable sur la viabilité des cellules HeLa malgré une concentration 2 fois supérieure à la concentration maximale utilisée dans la littérature (Costa Verdera et al. 2017). À partir de ces résultats, une gamme de concentrations garantissant une excellente viabilité cellulaire ( $\leq 85\%$ ) a été définie pour chaque inhibiteur, en tenant compte des concentrations efficaces utilisées dans la littérature (Tableau 3, paragraphe 4.2.7).



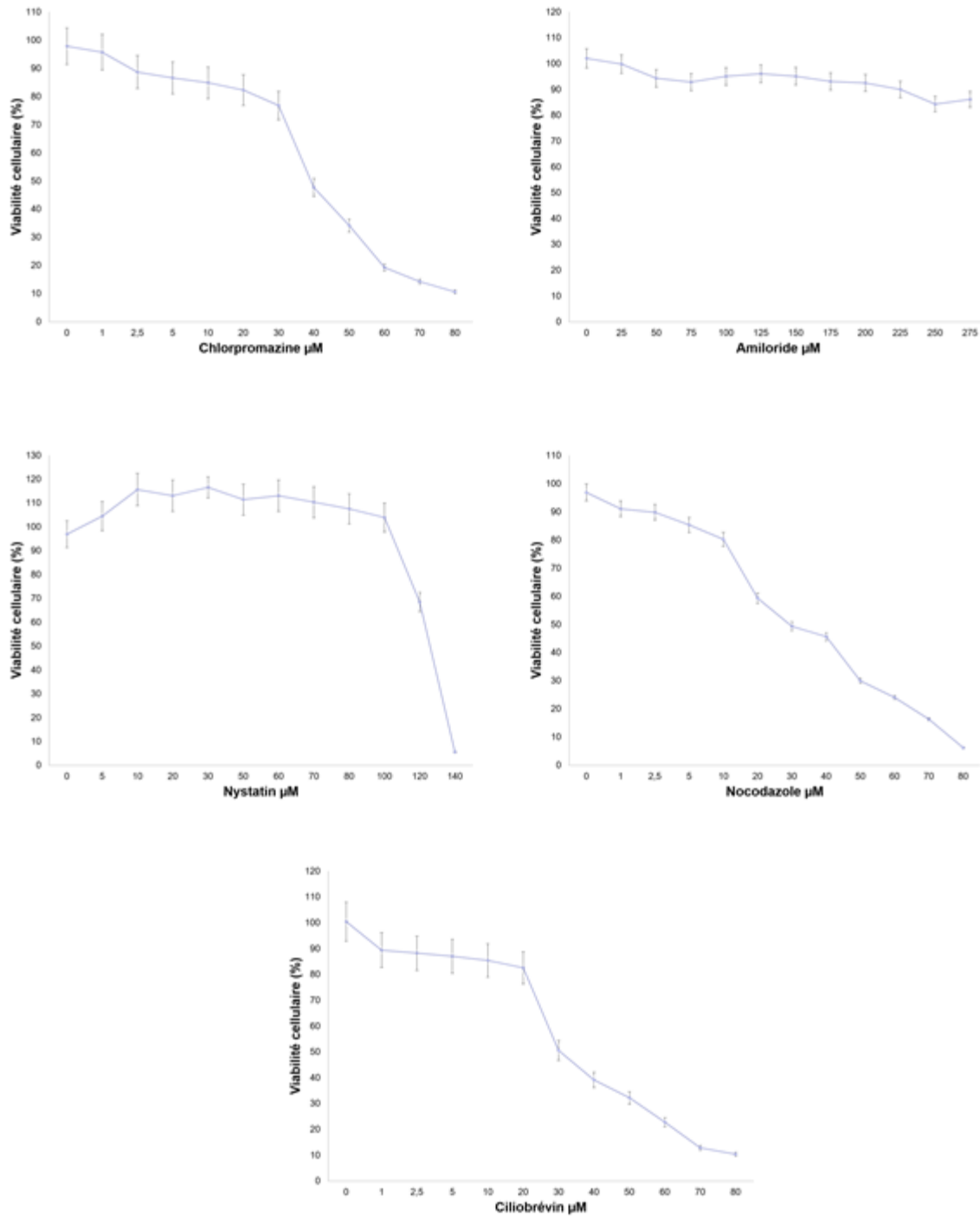


Figure 33 : Toxicité des inhibiteurs de voies métaboliques sur des cellules HeLa.

La chlorpromazine est un inhibiteur spécifique de l'endocytose dépendante des clathrines. Le nystatin inhibe spécifiquement l'endocytose liée aux cavéoles. L'amiloride est un inhibiteur spécifique de la macropinocytose. Le nocodazole inhibe la polymérisation des microtubules. Le cilibrévin inhibe spécifiquement le transport intracellulaire dépendant des dynéines. La chlorpromazine, le nystatin et

*l'amiloride ont été diluées et incubées pendant 3 h 30 avec les cellules qui ont été ensuite lavées et analysées immédiatement en cytométrie de flux. Le nocodazole et le ciliobrévin ont été dilués et incubés pendant 14 heures avec les cellules qui ont ensuite été lavées et analysées en cytométrie de flux. La viabilité des cellules a été évaluée par la méthode du MTT et les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de cellules viable comparativement à des cellules non traitées. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été réalisée en triplicata.*

## **4.3.6 Étude des mécanismes d'endocytose et intracellulaires**

### **4.3.6.1 Effet de l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines**

La chlorpromazine est un inhibiteur spécifique de l'endocytose dépendante des clathrines. Cet inhibiteur agit en empêchant l'assemblage et le désassemblage des réseaux de clathrines à la membrane des cellules (L. H. Wang, Rothberg, et Anderson 1993). Les cellules ont été préalablement incubées avec différentes concentrations de chlorpromazine, puis incubées avec les complexes de gésification contenant un plasmide marqué au Cy5, toujours en présence de l'inhibiteur. L'analyse au cytomètre de flux de la fluorescence intracellulaire permet de constater que la chlorpromazine diminue de manière significative la pénétration de l'ADN dans les cellules de manière dépendante de la concentration (Figure 34). L'effet inhibiteur de la chlorpromazine apparaît à partir d'une concentration de 5  $\mu$ M. Comparativement au contrôle, le taux d'inhibition maximum (index) obtenu est d'environ 60% avec une diminution du pourcentage de cellules transfectées de 22% comparativement au contrôle. Par ailleurs, bien que le pourcentage de cellules transfectées diminue de manière significative, les données montrent que l'intensité de fluorescence diminue encore plus significativement. Cela signifie que le traitement à la chlorpromazine diminue la quantité de plasmides internalisée dans les cellules (données non montrées). Ces résultats démontrent que l'endocytose dépendante des clathrines est l'une des voies permettant aux complexes de gésification de pénétrer dans les cellules.

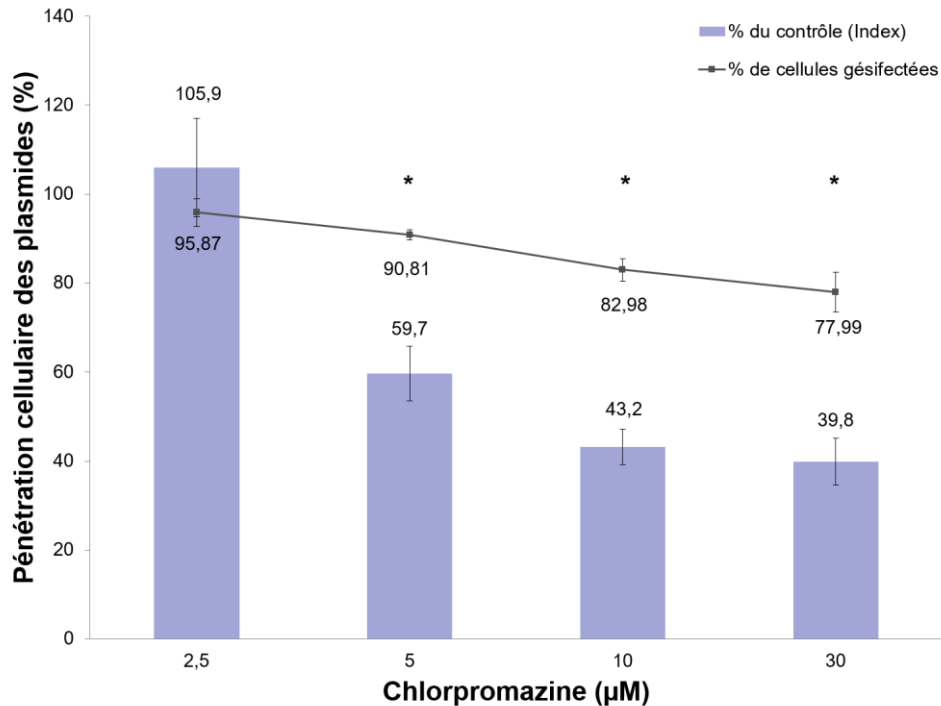


Figure 34 : Effet de la chlorpromazine sur l'efficacité de gésifectation en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésifectation. Le jour de la transfection, les cellules ont été préalablement incubées avec différentes concentrations efficaces de chlorpromazine (inhibiteur spécifique de l'endocytose dépendante des clathrines). Par la suite, les cellules ont été incubées avec les complexes de gésifectation contenant des plasmides marqués au Cy5, toujours en présence de l'inhibiteur, avant d'être analysées en cytométrie de flux. La pénétration des plasmides dans les cellules est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence (% du contrôle = index de fluorescence en présence de chlorpromazine \* 100 / index en absence de chlorpromazine). Index de fluorescence = % de cellules gésifectées \* intensité moyenne de fluorescence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.6.2 Effet de l'inhibition de la macropinocytose

L'amiloride est un inhibiteur spécifique de la macropinocytose et agit en empêchant les échanges des ions  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (Koivusalo et al. 2010). Les cellules ont été préalablement incubées avec différentes concentrations d'amiloride, puis avec les complexes de gésifectation contenant un plasmide marqué au Cy5, toujours en présence de l'inhibiteur. L'analyse au cytomètre de flux de la fluorescence

intracellulaire permet de constater une diminution significative de la pénétration du complexe de gésiffection à partir de 50  $\mu\text{M}$  avec un taux d'inhibition (index) maximum d'environ 60% et une diminution du pourcentage de cellules gésifectées de 16,8% (Figure 35). De plus, bien que le pourcentage de cellules transfectées diminue de manière significative, les données montrent que l'intensité de fluorescence diminue encore plus significativement (données non montrées). Ces résultats révèlent que la macropinocytose est également une des autres voies empruntées par les complexes de gésiffection.

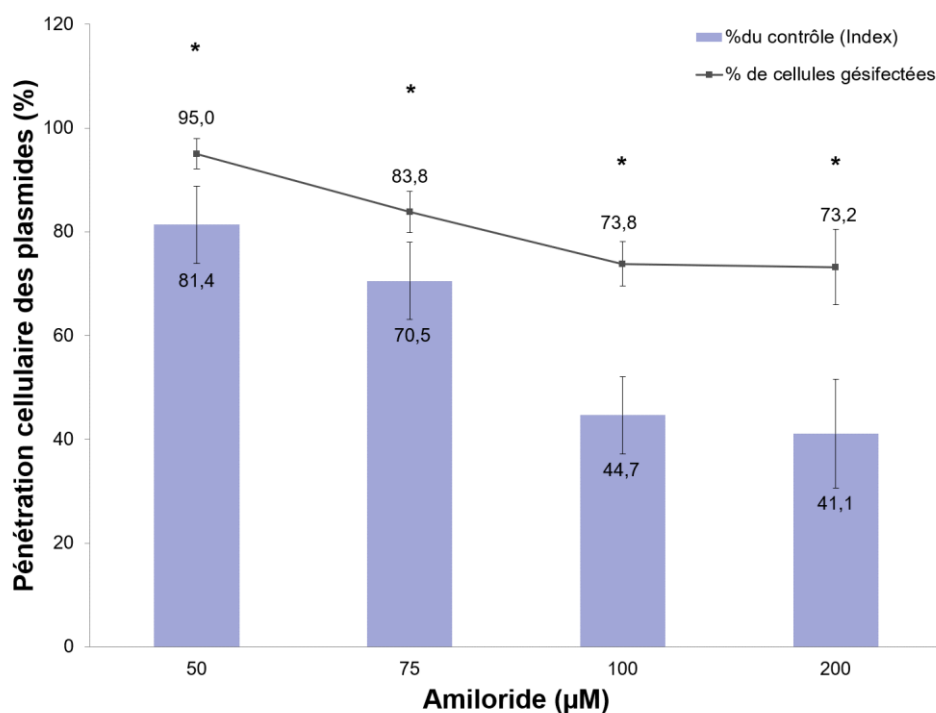


Figure 35 : Effet de l'amiloride sur l'efficacité de gésiffection en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésiffection. Le jour de la transfection, les cellules ont été préalablement incubées avec différentes concentrations efficaces de l'amiloride (inhibiteur spécifique de la macropinocytose). Par la suite, les cellules ont été incubées avec les complexes de gésiffection contenant un plasmide marqué au Cy5, toujours en présence de l'inhibiteur, avant d'être analysées en cytométrie de flux. La pénétration des plasmides dans les cellules est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence ( $\% \text{ du contrôle} = \text{index de fluorescence en présence d'amiloride} * 100 / \text{index en absence d'amiloride}$ ). Index de fluorescence =  $\% \text{ de cellules gésifectées} *$

intensité moyenne de fluorescence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.6.3 Effet de l'inhibition de l'endocytose dépendante des cavéolines

Le nystatin, un inhibiteur de l'endocytose liée aux cavéolines, ne démontre aucune inhibition de la pénétration du complexe de gésification après avoir utilisé des concentrations démontrées efficaces dans la littérature pour les cellules HeLa (Figure 36). Une concentration maximum non toxique de 100  $\mu\text{M}$  n'a également pas montré de diminution de la livraison d'ADN. Aucune diminution significative du pourcentage de cellules transfectées n'a également été observée. Ces résultats suggèrent que l'endocytose liée aux cavéoles n'est pas une voie essentielle dans l'internalisation des complexes de gésification.

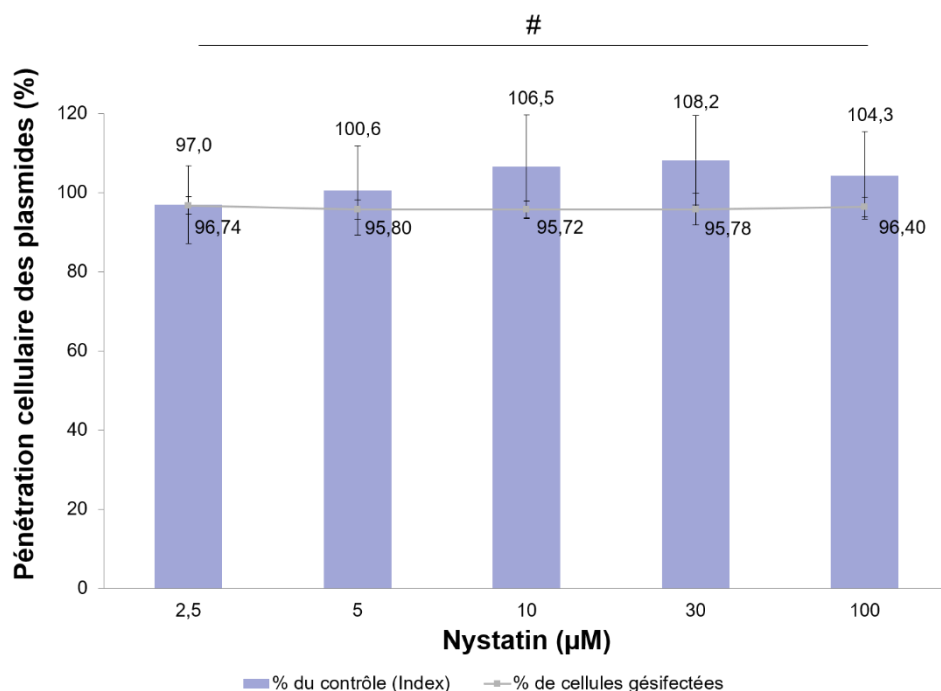


Figure 36 : Effet du nystatin sur l'efficacité de gésification en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésification. Le jour de la transfection, les cellules ont été préalablement incubées pendant 30 minutes avec différentes concentrations efficaces du nystatin (inhibiteur spécifique de l'endocytose impliquant les cavéolines). Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 3 h 30 avec les complexes de gésification contenant un plasmide marqué au Cy5 avant d'être analysées en cytométrie de flux. La pénétration des plasmides dans les cellules est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en

*pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence (% du contrôle = index de fluorescence en présence de nystatin \* 100 / index en absence de nystatin). Index de fluorescence = % de cellules gésifectées \* intensité moyenne de fluorescence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. #Résultats non significatifs ( $p > 0.05$ ).*

#### **4.3.6.4 Effet combiné de l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines et de la macropinocytose**

Les expériences ont démontré que l'endocytose dépendante des clathrines et la macropinocytose étaient impliquées dans la pénétration des complexes de gésifectation. Afin d'évaluer si la gésifectation emprunte exclusivement ces deux voies d'endocytose pour pénétrer la membrane cellulaire, l'effet combiné de l'amiloride et de la chlorpromazine sur la pénétration d'un complexe de gésifectation marqué au Cy5 a été étudié (Figure 37). Les résultats démontrent que la combinaison de ces deux inhibiteurs bloque 85% de l'internalisation des complexes de gésifectation (Index) tandis que l'inhibition individuelle diminue la pénétration des complexes de 57% (index). Par ailleurs, le pourcentage de cellules gésifectées en présence des deux inhibiteurs diminue significativement (38,4%) comparativement à l'inhibition individuelle. Ces résultats signifient que l'endocytose dépendante des clathrines et la macropinocytose sont les voies majoritaires empruntées par les complexes de gésifectation. Toutefois, ces résultats peuvent également suggérer que d'autres voies moins conventionnelles et encore mal décrites (paragraphe 1.2.1.3.2.4) pourraient être aussi sollicitées dans une moindre mesure.

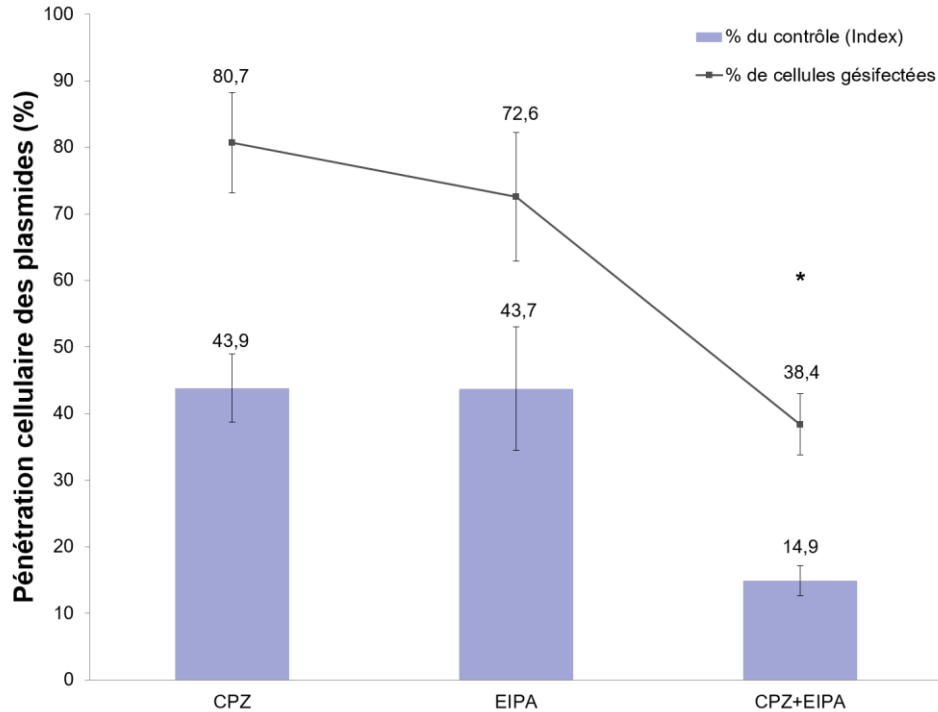


Figure 37 : Effet combiné de la chlorpromazine (CPZ) et de l'amiloride (EIPA) en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésification. Le jour de la transfection, les cellules ont été préalablement incubées pendant 30 minutes avec 30  $\mu$ M de chlorpromazine (inhibiteur spécifique de l'endocytose dépendante des clathrines) et/ou 100  $\mu$ M d'amiloride (inhibiteur spécifique de la macropinocytose). Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 3 heures avec les complexes de gésification contenant un plasmide marqué au Cy5 avant d'être analysées en cytométrie de flux. La pénétration des plasmides dans les cellules est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence ( $\% \text{ du contrôle} = \text{index de fluorescence en présence d'inhibiteur} * 100 / \text{index en absence d'inhibiteur}$ ).  $\text{Index de fluorescence} = \% \text{ de cellules gésifectées} * \text{intensité moyenne de fluorescence}$ . Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.6.5 Rôle des microtubules et des dynéines dans le transport intracellulaire

Les microtubules sont impliqués dans le transport intracellulaire des vésicules membranaires vers l'intérieur et l'extérieur des cellules (Caviston et Holzbaur 2006). Les microtubules sont répartis à travers la cellule, de la membrane nucléaire (extrémité négative) à la membrane plasmique (extrémité positive). Le déplacement le long des microtubules est attribué à deux protéines motrices : les dynéines

responsables du déplacement de l'extrémité positive vers l'extrémité négative et les kinésines responsables du déplacement inverse (Berg, Tymoczko, et Stryer 2002). Afin d'identifier le rôle des microtubules et des dynéines dans le mécanisme de gésifaction, les expériences de transfection d'un plasmide codant pour la protéine GFP ont été réalisées en présence de nocodazole ou de ciliobrévin. Le nocodazole est un inhibiteur de la polymérisation des sous unités de la tubuline alors que le ciliobrévin est un inhibiteur spécifique des dynéines (Tableau 3, paragraphe 4.2.7). Pour les deux inhibiteurs, les résultats montrent une diminution de l'index de fluorescence de la protéine GFP comparativement au contrôle, en fonction de la concentration de chaque inhibiteur (Figure 38 et Figure 39). En présence de nocodazole, un effet inhibiteur significatif est observé à partir de 1  $\mu\text{M}$  et l'inhibition maximum atteint 86% du contrôle (index) avec une diminution du pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP à 7,8% pour 10  $\mu\text{M}$ . En présence de ciliobrévin, l'inhibition est observée à partir de 10  $\mu\text{M}$  avec une inhibition maximum de 91% par rapport au contrôle (index) et une diminution du pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP à 5,1% pour 100  $\mu\text{M}$ . En conclusion, les résultats obtenus signifient que les microtubules et les dynéines jouent un rôle majeur dans le transport intracellulaire des complexes de gésifaction au noyau des cellules.

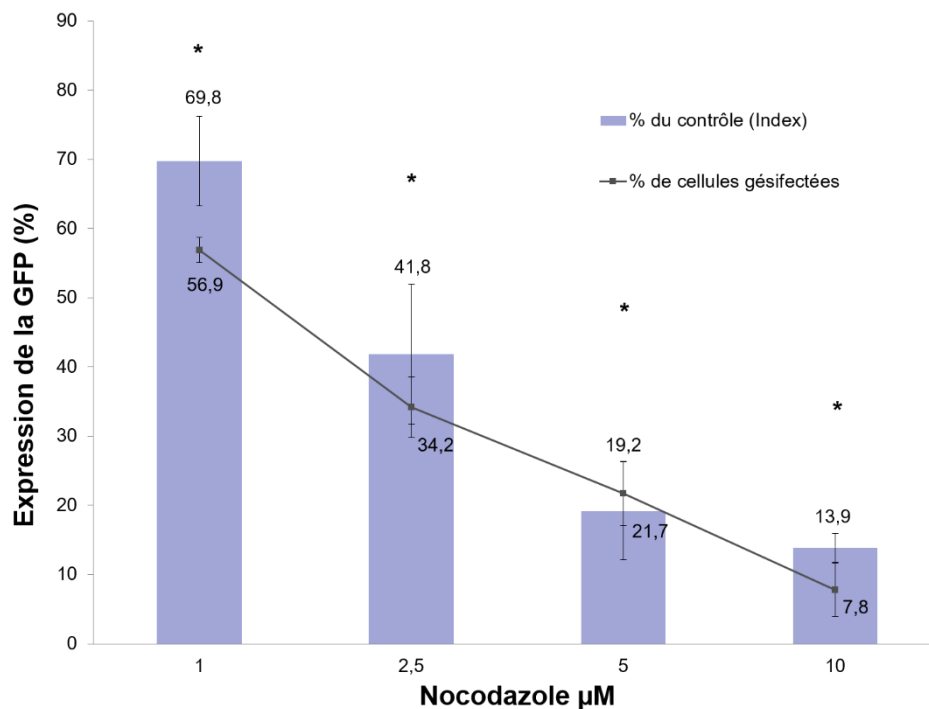


Figure 38 : Effet du nocodazole sur l'efficacité de gésifaction en cellules HeLa.



Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésiffection. Le jour de la transfection, les cellules et les complexes de gésiffection contenant un plasmide codant pour la GFP ont été incubés en absence d'inhibiteur pour permettre la pénétration du complexe. Par la suite, différentes concentrations de nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, ont été ajoutées. Les cellules ont été analysées en cytométrie de flux 24 heures après le dépôt des complexes. L'expression de la GFP est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence (% du contrôle = index de fluorescence en présence de nocodazole \* 100 / index en absence de nocodazole). Index de fluorescence = % de cellules gésifectées \* intensité moyenne de fluorescence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

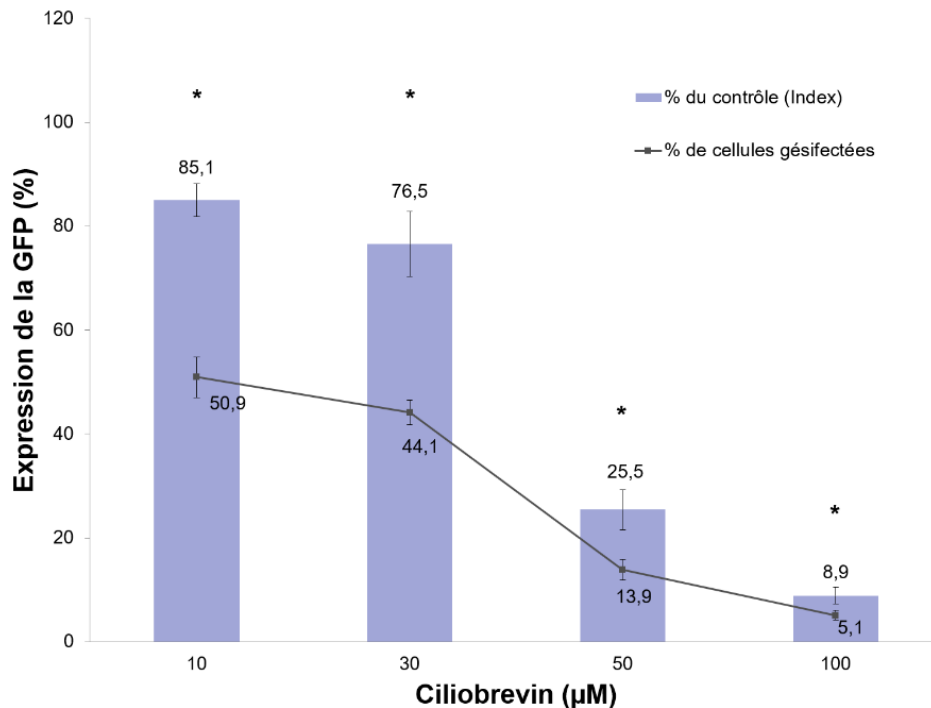


Figure 39 : Effet du ciliobrévin sur l'efficacité de gésiffection en cellules HeLa.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant la gésiffection. Le jour de la transfection, les cellules et les complexes de gésiffection contenant un plasmide codant pour la GFP ont été incubés en absence d'inhibiteur pour permettre la pénétration du complexe. Par la suite, différentes concentrations de ciliobrévin, un inhibiteur spécifique des dynéines, ont été ajoutées. Les cellules ont été analysées en cytométrie de flux 24 heures après le dépôt des complexes. L'expression

*de la GFP est exprimée, d'une part en pourcentage de cellules fluorescentes et d'autre part, en pourcentage du contrôle par rapport à l'index de fluorescence (% du contrôle = index de fluorescence en présence de ciliobrévine \* 100 / index en absence de ciliobrévine). Index de fluorescence = % de cellules gésifectées \* intensité moyenne de fluorescence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences où chaque condition a été testée quatre fois. \*Résultats significatifs ( $p \leq 0.05$ ).*

L'identification des mécanismes d'endocytose et de transport intracellulaire des complexes de transfection peut être réalisée par deux approches principales qui ont chacune leurs limites. La première est une approche classique, qui consiste à utiliser des molécules inhibitrices reconnues pour affecter spécifiquement ces mécanismes. La seconde approche consiste à inhiber de manière stable ou transitoire l'expression de protéines impliquées dans ces mécanismes cellulaires de pénétration et de transport. Cela peut être réalisé en utilisant des techniques de mise en silence de gènes (ARN interférents) ou par l'expression de protéines ayant une activité dominante négative (A. Benmerah et al. 1999; Damke et al. 1994; Hinrichsen et al. 2003; F. Huang et al. 2004; S. H. Liu, Marks, et Brodsky 1998; Mayor et Pagano 2007; Nichols 2002; Payne et al. 2007; Vanden Broeck et De Wolf 2006). Dans cette thèse, les inhibiteurs spécifiques ont été privilégiés car ils sont faciles à utiliser et sont bien documentés au niveau de leur mise en œuvre (Ivanov 2008), de leur spécificité et innocuité (Mano et al. 2005; Payne et al. 2007; Rejman, Bragonzi, et Conese 2005; Vercauteren et al. 2010; von Gersdorff et al. 2006). Par ailleurs, la littérature mentionne que l'inhibition des voies d'endocytose par ARN interférents peut être comparable à une utilisation appropriée d'inhibiteurs spécifiques (Gabrielson et Pack 2009).

Les expériences d'inhibition ont révélé que l'endocytose dépendante des clathrines et la macropinocytose sont les mécanismes cellulaires impliqués dans la pénétration de l'ADN par gésifectation (Figures 34 et 35). Ces résultats sont en accord avec la taille maximum des particules que ces voies d'endocytose peuvent internaliser. En effet, la macropinocytose est un mécanisme d'endocytose non sélectif pour l'internalisation de particules en suspension ayant un diamètre jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  (S. D. Xiang et al. 2006). L'endocytose dépendante des clathrines fait intervenir des vacuoles d'invagination avec un diamètre maximum de 150 à 200 nm (Harush-Frenkel et al. 2007). Toutefois, cela suggère qu'une vésicule de clathrines ne peut contenir qu'un seul complexe de gésifectation. Par ailleurs, l'endocytose dépendante des cavéolines ne semble pas être une voie d'entrée pour la gésifectation (Figure 36). Cela apparaît cohérent avec le fait que les invaginations formées à partir de la

membrane aient un diamètre de 50 à 80 nm, ce qui est trop petit pour contenir des gésicules de 143,5 nm. Le tableau 5 fait apparaître les différences et les points communs concernant les voies de pénétration cellulaire empruntées par la gésification comparativement à des méthodes de livraison similaires. De manière générale, on constate que l'endocytose dépendante des clathrines est la voie la plus utilisée par ces méthodes de livraison de gènes.

Le transport intracellulaire est également un processus important à caractériser pour une méthode de livraison de gènes puisque les mécanismes impliqués permettent d'acheminer le matériel génétique au noyau. Les dynéines sont connues pour être les protéines motrices essentielles du transport de molécules biologiques endocytées telles que les virus (Dodding et Way 2011) et les agents de transfection chimiques (Drake et Pack 2008; Yuan et al. 2020). De manière similaire, il a été mis en évidence l'implication des microtubules et des dynéines dans le processus de gésification (Figure 38 et 39).

Tableau 5 : Voies d'endocytose empruntées par les gésicules et des systèmes de livraison similaires.

<b>Systèmes de livraison</b>	<b>Endocytose dépendante des clathrines</b>	<b>Endocytose liée aux cavéolines</b>	<b>Macropinocytose</b>	<b>Références</b>
<b>Gésicules + bromure d'hexadiméthrine</b>	X		X	-
<b>Vésicules extracellulaires</b>		X	X	(Costa Verdera et al. 2017)
<b>VSV</b>	X			(Sun et al. 2010)
<b>Chitosan/M-VLP</b>	X	X		(R. Keswani, Su, et Pack 2014)
<b>Lentivirus + bromure d'hexadiméthrine</b>	X			(Daecke et al. 2005)

## 4.4 Conclusion

Les vecteurs hybrides représentent une nouvelle génération prometteuse d'agents de livraison de gènes. Afin de comprendre comment les gésicules permettent de livrer de l'ADN dans des cellules, des paramètres optimaux ont été identifiés pour garantir la fiabilité des résultats. Ainsi, la quasi-totalité du bruit de fond a été éliminée en identifiant une solution de lavage efficace composée de PBS et de 0,001 % de SDS. Le temps d'incubation des cellules avec les inhibiteurs a été réduit à un maximum de 3 h 30 pour maintenir la spécificité des inhibiteurs. Également, des concentrations efficaces et non toxiques d'inhibiteurs ont été identifiées. Le rôle du bromure d'hexadiméthrine et des gésicules dans le processus de gésification a été défini. Alors que le bromure d'hexadiméthrine semble être impliqué principalement dans la pénétration cellulaire du complexe de gésification, les gésicules semblent être impliquées majoritairement dans la fuite des endosomes. Par ailleurs, les expériences ont révélé que la transfection par gésification est un processus de pénétration cellulaire plus rapide que la transfection au chitosan mais plus lent que certains vecteurs viraux. En effet, moins d'une heure d'incubation entre les complexes et les cellules suffit pour livrer de l'ADN alors que quelques secondes suffisent pour les vecteurs viraux. Enfin, les complexes de gésification pénètrent dans les cellules par endocytose par la voie des clathrines et de la macropinocytose. L'endocytose par les cavéoles ne semble pas être impliquée. Enfin, les dynéines permettent aux complexes de gésification d'être transportés à l'intérieur des cellules pour atteindre le noyau. Cette étude pose les bases d'une compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de gésification et un point de départ pour l'amélioration de vecteurs hybrides à base de gésicules.

## Conclusion de la thèse

Les vecteurs viraux constituent la méthode de livraison d'acides nucléiques la plus efficace. Néanmoins, le prix élevé de la production, les risques sécuritaires liés à leur utilisation et la taille limitée du transgène pouvant être livré, représentent des inconvénients majeurs pour une généralisation de leur utilisation au laboratoire et dans des procédés thérapeutiques. Les vecteurs non viraux, quant à eux, sont sécuritaires et plus flexibles dans les tailles d'acides nucléiques livrés, mais leur grand point faible est qu'ils manquent d'efficacité sur un grand nombre de cellules *in vitro* et *in vivo*. Des vecteurs ou méthodes hybrides, tentant de concilier les avantages des vecteurs viraux et non viraux pour livrer des acides nucléiques, représentent une alternative très intéressante. Cette thèse s'intéresse à l'une de ces méthodes, appelée gésification, associant des gésicules (particule pseudo-virales pseudotypées avec la protéine VSV-G) avec un agent chimique, le bromure d'hexadiméthrine. Jusqu'à ce jour, une seule publication apportait des résultats sur l'utilisation des gésicules pour la livraison d'ADN. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont contribué à développer et caractériser la gésification au niveau de leur mode de production et d'utilisation, de leur stabilité, du potentiel de livraison sur des cellules primaires, de leur morphologie, de leur composition et enfin des mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de livraison.

Le premier objectif a été atteint et consistait à définir des conditions optimisées pour produire et utiliser les gésicules dans la livraison d'acides nucléiques. Les expériences ont permis de définir des conditions optimales pour produire des gésicules par transfection transitoire en cellules adhérentes HEK293A, en utilisant un procédé simple, économique et reproductible à base de PEI. Un protocole d'utilisation efficace, rapide et simple a été déterminé pour atteindre la meilleure efficacité de gésification. Les gésicules ont également démontré une grande stabilité dans le temps à différentes températures ainsi qu'une résistance au stress mécanique induit par de nombreux cycles de congélation. Par ailleurs, les gésicules ont révélées une capacité très intéressante pour livrer de l'ADN dans des cellules primaires, connues pour être réfractaires à la transfection. Enfin, la gésification est une méthode de livraison capable de livrer des plasmides de grandes tailles et des ARN interférents. Les résultats font l'objet d'un article scientifique qui a été soumis pour être publié dans le journal « Molecular Biotechnology ».

Le deuxième objectif consistant à caractériser les gésicules au niveau morphologique et protéique a également été rempli. Tout d'abord, la formation de complexes entre les gésicules, l'ADN et le bromure

d'hexadiméthrine a été démontrée à l'aide d'expériences de retard sur gel. En effet, jusque-là, l'existence de complexes était supposée par rapport à la nature électrochimique des composants. Les gésicules purifiées ont ensuite été visualisées avec les protéines VSV-G à leur membrane à l'aide d'expérience de microscopie électronique et l'utilisation d'anticorps couplés à des billes d'or, révélant par la même occasion une taille approximative de 100 nm. La mesure du diamètre des gésicules en solution par la technique de diffusion dynamique de la lumière s'est révélée supérieure au diamètre mesuré en microscopie électronique, probablement par effet d'hydratation ou d'agrégation en solution. Enfin, la première description de la composition protéique des gésicules produites en cellules HEK293 a été réalisée grâce à de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Ces résultats ont révélé la présence de 692 protéines aux fonctions biologiques variées dont trois sont de nature oncogénique. Cela ne constitue pas nécessairement un frein majeur pour les futurs développements des gésicules, puisque plusieurs produits biopharmaceutiques générés à partir de cellules HEK293 ont été approuvés par les autorités réglementaires pour un usage thérapeutique. Enfin, la connaissance du contenu des gésicules pourrait permettre d'orienter les futures optimisations comme, par exemple, sur le mode de production (choix du type cellulaire et d'ingénierie des cellules) afin de diminuer les facteurs de risques actuels pour des applications cliniques.

La réalisation du troisième objectif a conduit à la caractérisation des mécanismes cellulaires mis en jeu par la gésification pour franchir la membrane des cellules et se rendre au noyau. En tout premier lieu, l'efficacité d'une solution de lavage pour éliminer le bruit de fond lié à des complexes restés fixés à la membrane a été validée. Par la suite, le rôle des gésicules et du bromure d'hexadiméthrine dans le processus de gésification a été mis en évidence. Le bromure d'hexadiméthrine contribue uniquement à la pénétration du complexe dans les cellules alors que les gésicules jouent un rôle dans la pénétration et dans le transport intracellulaire (fuite des endosomes). Des expériences de cinétique de pénétration ont révélé des similitudes avec la vitesse de pénétration d'autres agents viraux et non viraux tels que la lipofectamine et le PEI. Ce troisième objectif a été complété en réalisant des tests cellulaires faisant intervenir des inhibiteurs métaboliques permettant de bloquer spécifiquement certaines voies d'endocytose classiquement empruntées lors de la livraison de biomolécules. Pour ce faire, une gamme de concentration non cytotoxique a été déterminée pour chaque inhibiteur spécifique de certaines voies d'endocytose et du transport intracellulaire. Avec ces concentrations, les expériences ont démontré que les complexes de gésification pénétraient dans les cellules HeLa par macropinocytose et endocytose dépendante des clathrines, puis étaient transportés dans la cellule le

long des microtubules par des protéines motrices (dynéines). Ces informations indiquent les mécanismes cellulaires à optimiser.

Cette thèse apporte de nouvelles informations inédites concernant les gésicules au niveau de leur production, de leur utilisation pour la livraison d'acides nucléiques, de leur composition ainsi que sur les mécanismes cellulaires sollicités lors de la gésification. En effet, avec une meilleure compréhension de la composition des gésicules, des mécanismes de pénétration cellulaire et des étapes limitantes de la gésification, cette thèse identifie les cibles des futures optimisations. Enfin, cette thèse permet de conclure que la gésification possède un excellent potentiel pour poursuivre leur développement pour des applications en recherche et dans le domaine thérapeutique.

# Perspectives

Les perspectives de développement et d'utilisation de la méthode de gésification peuvent être regroupées autour des 5 grands thèmes suivants :

## **Thème 1 : Optimisation de l'efficacité de livraison des gésicules.**

Les gésicules produites dans ces travaux ont permis d'obtenir des niveaux de transfection très intéressants notamment avec des cellules primaires (myoblastes humains), décrites pour être réfractaires à la transfection. Le pourcentage de transfection obtenu pour ces cellules était de 22%, ce qui offre une marge d'optimisation. L'objectif de ces optimisations est d'obtenir un pourcentage de transfection supérieur au maximum mentionné dans la littérature (30%) avec des agents de livraison non viraux (Balci et Dinçer 2009).

*Élargissement du tropisme des gésicules :* Actuellement, les gésicules contiennent dans leur membrane la protéine VSV-G dont le large tropisme a été clairement démontré dans la littérature. Toutefois, la littérature mentionne que les virus pseudotypés avec la protéine VSV-G sont inefficaces sur certains types cellulaires tels que les lymphocytes (Amirache et al. 2014). La première stratégie proposée consisterait à pseudotyper les gésicules avec différentes glycoprotéines d'origines virales de manière à élargir leur tropisme. Le virus de l'herpès simplex possède 2 glycoprotéines (gB, gD) responsables de la fixation aux cellules par une interaction avec des récepteurs sulfate héparan (Spear 2004). Ces récepteurs sont exprimés à la surface de très nombreux types cellulaires ce qui permet au virus de l'herpès simplex d'avoir un large tropisme. Bien que le VSV et l'herpès simplex aient tout deux un large tropisme, les récepteurs cellulaires mis en jeu lors de la pénétration du virus sont différents. Cela permet de suggérer que la combinaison des glycoprotéines VSV-G, gB et gD pourrait améliorer le tropisme des gésicules. La seconde stratégie consiste à modifier le VSV-G des gésicules avec un peptide de ciblage des intégrines (Morizono et al. 2009). La littérature décrit l'incorporation dans la séquence du VSV-G (N-terminale), d'une séquence peptidique de 14 acides amines (RGD) capable d'interagir avec différents récepteurs de surface de type intégrine. Des lentivirus pseudotypés avec cette protéine VSV-G/RGD ont démontré une capacité d'infection 10 fois supérieure dans différents types cellulaires : HEK293T (rein embryonnaire), TF-1 et MO7E (cellules leucémiques progénitrice), et B16F10 (mélanome). Des gésicules formées avec une protéine VSV-G/RGD pourraient pénétrer plus efficacement dans différents types cellulaires.



*Amélioration de la fuite des endosomes et du transport intracellulaire* : Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont révélé que les meilleures conditions de gésification permettaient d'exprimer la protéine GFP dans environ 50% de cellules HeLa. Toutefois, les expériences avec un complexe de gésification contenant un plasmide marqué au Cy5 ont démontré que la quasi-totalité des cellules avait internalisé les plasmides. Outre la limite de détection du cytomètre utilisé dans ces expériences, cela suggère que presque la moitié des plasmides internalisés n'atteint pas le noyau. Cela peut s'expliquer soit parce que les plasmides restent piégés dans les endosomes, malgré la protéine VSV-G, soit à cause de facteurs cellulaires qui bloquent leur cheminement dans le cytoplasme. Tout d'abord, la réalisation d'expériences de microscopie confocale à fluorescence afin de co-localiser la voie endosomale (LysoTracker jaune) et des plasmides internalisés par gésification (Cy5 – rouge), permettrait de préciser si la fuite des endosomes et/ou le transport intracellulaire sont des étapes limitantes. Afin d'améliorer la fuite des endosomes, la stratégie proposée consisterait à intégrer dans la membrane des gésicules, d'autres protéines impliquées dans la fusion membranaire qui utilisent des mécanismes différents de ceux de la protéine VSV-G. Ainsi, l'intégration des glycoprotéines de fusion gH et gL du virus de l'herpès simplex pourrait être utilisée à cet effet (R. P. Subramanian et Geraghty 2007), en les co-exprimant avec la protéine VSV-G lors de la production de gésicules. D'autre part, afin d'améliorer le transport intracellulaire, la stratégie serait d'utiliser la capacité de certaines protéines virales telles que Vif pour supprimer les facteurs de restrictions intracellulaires qui pourraient bloquer le transport des plasmides jusqu'au noyau (Sheehy et al. 2002). Les protéines Vif seraient contenues dans les gésicules et libérées dans les cellules transfectées au moment de la fuite des endosomes. L'incorporation des protéines Vif dans les gésicules pourrait être réalisée pendant la formation des gésicules à la suite de l'expression de protéines Vif fusionnées à une protéine d'adressage à la membrane interne telles que la protéine Gag (Robert, Lytvyn, et al. 2017).

## **Thème 2 : Développement d'un procédé de production à grande échelle.**

L'utilisation des gésicules à des fins commerciales nécessitera le développement d'un mode de production capable de s'adapter à des capacités variables pour fournir la demande. Actuellement, les gésicules rapportées dans la littérature sont produites à partir de cellules en adhérence. Des microporteurs (Blüml 2007) ou des boîtes de cultures empilées (Abraham et al. 2011) peuvent être utilisés pour produire de produits biologiques à grande échelle à partir de cellules adhérentes (C.-Y. Wu et al. 2015). Comparativement aux boîtes de culture empilées, le système de culture utilisant des

microporteurs présente l'avantage de pouvoir augmenter la concentration de cellules cultivées, et donc la quantité de gésicules produites. Par ailleurs, la mise en suspension du procédé de culture faciliterait l'augmentation de l'échelle de production à l'aide de bioréacteurs (Kiesslich et al. 2020). Dans le cadre de cette thèse, des essais de production de gésicules à partir de cellules cultivées sur des microporteurs ont été réalisés avec un certain succès (résultats non montrés). Néanmoins, en raison de la nécessité de préparer les billes pour que les cellules y adhèrent adéquatement, l'utilisation de microporteurs apparaît comme un procédé plus fastidieux que l'utilisation directe de cellules adaptées à la culture en suspension. Ainsi, la production de gésicules à partir de cellules HEK293 cultivées en suspension serait un procédé pertinent à développer. Ce procédé de production comprendrait d'une part, la création d'une lignée stable et inductible pour l'expression du VSV-G et éventuellement pour les autres protéines de fonctionnalisation telles que décrites au thème 1. L'utilisation d'une lignée cellulaire ayant incorporé de manière stable dans son génome la cassette d'expression de la protéine VSV-G, permettra son expression de manière constitutive. Cela facilitera la réalisation de la production en éliminant l'étape de transfection nécessaire jusqu'à présent pour l'expression transitoire de la protéine VSV-G. Toutefois, la protéine VSV-G est toxique pour les cellules ce qui justifiera l'utilisation d'un système de régulation (Broussau et al. 2008) permettant de déclencher l'expression et la production de gésicules. L'élaboration d'un clone cellulaire stable permettra également de sélectionner une lignée avec un rendement optimisé de gésicules. D'autre part, le développement d'un procédé de production de gésicules pourrait comprendre une optimisation du milieu de culture (Bielser et al. 2018; Hunter et al. 2019) mais également la mise en place d'un protocole optimisé pour maximiser le rendement en bioréacteur (Manceur et al. 2017).

### **Thème 3 : Développement d'un procédé de purification.**

Dans cette thèse comme dans la littérature, les gésicules ont été récoltées par ultracentrifugation sur un coussin de sucrose. Une purification a également été réalisée à l'aide d'un gradient d'iodixanol. Toutefois, l'ultracentrifugation seule, ne peut pas constituer un procédé de purification efficace pour des applications pré/cliniques. Par ailleurs, bien que l'ultracentrifugation puisse être utilisée à l'échelle industrielle, d'autres outils plus adaptés existent. Actuellement, la littérature ne mentionne pas de procédés industriels pour la purification de gésicules. L'élaboration d'un tel procédé pourrait prendre en compte les méthodes mises en place pour la purification de virus enveloppés pseudotypés avec la protéine VSV-G afin de se rapprocher en termes de composition de la surface des gésicules (Lima,

Souza, et Castilho 2019; Vicente et al. 2011; M. M. Segura, Kamen, et Garnier 2011). Brièvement, la purification des gésicules à une échelle industrielle pourrait compter les étapes suivantes. Étape 1 : Récolte du supernageant contenant les gésicules par microfiltration à partir du bioréacteur. Étape 2 : Digestion des acides nucléiques à la benzonase. Étape 3 : Clarification et concentration du surnageant pour éliminer les débris cellulaires par ultra/diafiltration. Étape 4 : Purification des gésicules à l'aide de techniques chromatographiques.

#### **Thème 4 : Poursuivre la caractérisation des gésicules.**

La caractérisation des processus cellulaires impliqués dans la formation des gésicules permettrait d'identifier des voies métaboliques à favoriser ou à réprimer dans l'objectif d'améliorer le rendement de production. Pour ce faire, des extraits cellulaires d'ARN totaux de cellules en cours de production de gésicules seront quantifiés à l'aide d'une micropuce à ARN puis séquencés. Le logiciel d'analyse permettra de relier chaque séquence d'ARN messenger à une protéine. Les protéines potentiellement impliquées dans des processus cellulaires pouvant influencer la production des gésicules pourront être sélectionnées pour réaliser des tests cellulaires. Ces tests consisteraient à inhiber ou à surexprimer ces protéines pendant la production de gésicules, tout dépendamment de leur fonction présumée. Des lignées stables de production surexprimant ou sous-exprimant ces protéines pourraient être créées.

#### **Thème 5 : Perspectives d'utilisation pour la livraison de molécules thérapeutiques.**

L'utilisation d'ARN thérapeutiques est un marché en fort croissance dans lequel plusieurs produits sont approuvés et en voie de développement dans plusieurs domaines (oncologie, neurobiologie, maladies infectieuses, maladies cardiovasculaires, ophtalmologie) (F. Wang, Zuroske, et Watts 2020). La livraison de protéines en thérapie cellulaire représente également une méthode prometteuse, notamment pour traiter des maladies génétiques pour lesquelles il n'y a pas de médicaments chimiques permettant d'atténuer les symptômes. Plusieurs protéines et peptides thérapeutiques sont commercialisés pour le traitement de diverses maladies (Pisal, Kosloski, et Balu-lyer 2010). La livraison des protéines et d'ARN thérapeutiques implique l'utilisation de liposomes, de polymères ou encore de nanoparticules (Malik et al. 2007). En combinant l'efficacité des virus et la sécurité des méthodes non virales, des gésicules optimisées pourraient être un excellent moyen pour livrer des ARN et des protéines thérapeutiques (Schott et al. 2011).

## Bibliographie

- Aa, M. A. E. M. van der, U. S. Huth, S. Y. Häfele, R. Schubert, R. S. Oosting, E. Mastrobattista, W. E. Hennink, R. Peschka-Süss, G. A. Koning, et D. J. A. Crommelin. 2007. « Cellular Uptake of Cationic Polymer-DNA Complexes Via Caveolae Plays a Pivotal Role in Gene Transfection in COS-7 Cells ». *Pharmaceutical Research* 24 (8): 1590-98. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9287-3>.
- Abe, A., A. Miyanochara, et T. Friedmann. 1998. « Enhanced Gene Transfer with Fusogenic Liposomes Containing Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein ». *Journal of Virology* 72 (7): 6159-63.
- Abraham, Elizabeth J., Katie A. Slater, Suparna Sanyal, Ken Linehan, Paula M. Flaherty, et Susan Qian. 2011. « Scale-Up of Mammalian Cell Culture using a New Multilayered Flask ». *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n° 58 (décembre): e3418. <https://doi.org/10.3791/3418>.
- Adami, Roger C., et Kevin G. Rice. 1999. « Metabolic Stability of Glutaraldehyde Cross-Linked Peptide Dna Condensates ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88 (8): 739-46. <https://doi.org/10.1021/js990042p>.
- Aderem, A., et D. M. Underhill. 1999. « Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages ». *Annual Review of Immunology* 17: 593-623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>.
- Ahn, Cheol-Hee, Su Young Chae, You Han Bae, et Sung Wan Kim. 2002. « Biodegradable Poly(Ethylenimine) for Plasmid DNA Delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 80 (1-3): 273-82. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00547-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00547-8).
- Aiuti, Alessandro, Giulio Cossu, Pablo de Felipe, Maria Cristina Galli, Gopalan Narayanan, Matthias Renner, Axel Stahlbom, Christian K. Schneider, et Caroline Voltz-Girolt. 2013. « The Committee for Advanced Therapies' of the European Medicines Agency Reflection Paper on Management of Clinical Risks Deriving from Insertional Mutagenesis ». *Human Gene Therapy. Clinical Development* 24 (2): 47-54. <https://doi.org/10.1089/humc.2013.119>.
- Akin, Demir, Jennifer Sturgis, Kathy Ragheb, Debby Sherman, Kristin Burkholder, J. Paul Robinson, Arun K. Bhunia, Sulma Mohammed, et Rashid Bashir. 2007. « Bacteria-Mediated Delivery of Nanoparticles and Cargo into Cells ». *Nature Nanotechnology* 2 (7): 441-49. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.149>.
- Albertini, Aurélie A. V., Eduard Baquero, Anna Ferlin, et Yves Gaudin. 2012. « Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry ». *Viruses* 4 (1): 117-39. <https://doi.org/10.3390/v4010117>.
- Al-Dosari, Mohammed S., et Xiang Gao. 2009. « Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress ». *The AAPS Journal* 11 (4): 671-81. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9143-y>.
- Aleksandrowicz, Paulina, Andrea Marzi, Nadine Biedenkopf, Nadine Beimforde, Stephan Becker, Thomas Hoenen, Heinz Feldmann, et Hans-Joachim Schnittler. 2011. « Ebola Virus Enters Host Cells by Macropinocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis ». *The Journal of Infectious Diseases* 204 (Suppl 3): S957-67. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir326>.
- Amirache, Fouzia, Camille Lévy, Caroline Costa, Philippe-Emmanuel Mangeot, Bruce E. Torbett, Cathy X. Wang, Didier Nègre, François-Loïc Cosset, et Els Verhoeven. 2014. « Mystery Solved: VSV-G-LVs Do Not Allow Efficient Gene Transfer into Unstimulated T Cells, B Cells, and HSCs Because They Lack the LDL Receptor ». *Blood* 123 (9): 1422-24. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-540641>.

- Anchiano Therapeutics Israel Ltd. 2019. « Phase 2b, Multicenter Trial of Intravesical DTA-H19/PEI in Patients With Intermediate-Risk Superficial Bladder Cancer ». Clinical trial registration NCT00595088. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00595088](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00595088).
- Anderson, J. L., et T. J. Hope. 2005. « Intracellular Trafficking of Retroviral Vectors: Obstacles and Advances ». *Gene Therapy* 12 (23): 1667-78. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302591>.
- Antkowiak, Maciej, Maria Leilani Torres-Mapa, Emily C. Witts, Gareth B. Miles, Kishan Dholakia, et Frank J. Gunn-Moore. 2013. « Fast Targeted Gene Transfection and Optogenetic Modification of Single Neurons Using Femtosecond Laser Irradiation ». *Scientific Reports* 3 (novembre): 3281. <https://doi.org/10.1038/srep03281>.
- Aoki, T., K. Miyauchi, E. Urano, R. Ichikawa, et J. Komano. 2011. « Protein Transduction by Pseudotyped Lentivirus-like Nanoparticles ». *Gene Therapy* 18 (9): 936-41. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.38>.
- Asati, Atul, Santimukul Santra, Charalambos Kaittanis, et J. Manuel Perez. 2010. « Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles ». *ACS Nano* 4 (9): 5321-31. <https://doi.org/10.1021/nn100816s>.
- Aslan, Hadi, Yoram Zilberman, Vered Arbeli, Dima Sheyn, Yoav Matan, Meir Liebergall, Jin Zhong Li, Gregory A. Helm, Dan Gazit, et Zulma Gazit. 2006. « Nucleofection-Based Ex Vivo Nonviral Gene Delivery to Human Stem Cells as a Platform for Tissue Regeneration ». Research-article. <https://Home.Liebertpub.Com/Ten>. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA. 4 mai 2006. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.877>.
- Aubin, R. A., M. Weinfeld, R. Mirzayans, et M. C. Paterson. 1994. « Polybrene/DMSO-Assisted Gene Transfer. Generating Stable Transfectants with Nanogram Amounts of DNA ». *Molecular Biotechnology* 1 (1): 29-48. <https://doi.org/10.1007/BF02821509>.
- B, Thapa, Plianwong S, Remant Bahadur Kc, Rutherford B, et Uludağ H. 2016. « Small Hydrophobe Substitution on Polyethylenimine for Plasmid DNA Delivery: Optimal Substitution Is Critical for Effective Delivery ». *Acta Biomaterialia*. *Acta Biomater.* mars 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.025>.
- Badding, M. A., E. E. Vaughan, et D. A. Dean. 2012. « Transcription Factor Plasmid Binding Modulates Microtubule Interactions and Intracellular Trafficking during Gene Transfer ». *Gene Therapy* 19 (3): 338-46. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.96>.
- Badding, Melissa A., John D. Lapek, Alan E. Friedman, et David A. Dean. 2013. « Proteomic and Functional Analyses of Protein-DNA Complexes during Gene Transfer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (4): 775-85. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.231>.
- Badran, M., et S. Arabia. 2014. « FORMULATION AND IN VITRO EVALUATION OF FLUFENAMIC ACID LOADED DEFORMABLE LIPOSOMES FOR IMPROVED SKIN DELIVERY ». Undefined. 2014. /paper/FORMULATION-AND-IN-VITRO-EVALUATION-OF-FLUFENAMIC-Badran-Arabia/d0091db01b013d48a58baefde339b17f6a4a7e0a.
- Bai, Haiqing, Gillian M. Schiralli Lester, Laura C. Petishnok, et David A. Dean. 2017. « Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA ». *Bioscience Reports* 37 (6). <https://doi.org/10.1042/BSR20160616>.
- Balci, Burcu, et Pervin Dinçer. 2009. « Efficient Transfection of Mouse-Derived C2C12 Myoblasts Using a Matrigel Basement Membrane Matrix ». *Biotechnology Journal* 4 (7): 1042-45. <https://doi.org/10.1002/biot.200800269>.

- Barba, Anna Angela, Sabrina Bochicchio, Annalisa Dalmoro, et Gaetano Lamberti. 2019. « Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications ». *Pharmaceutics* 11 (8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080360>.
- Barysch, Sina V., Shweta Aggarwal, Reinhard Jahn, et Silvio O. Rizzoli. 2009. « Sorting in Early Endosomes Reveals Connections to Docking- and Fusion-Associated Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (24): 9697-9702. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901444106>.
- Bayley, S. T., et J. S. Mymryk. 1994. « Adenovirus E1a Proteins and Transformation (Review) ». *International Journal of Oncology* 5 (3): 425-44. <https://doi.org/10.3892/ijo.5.3.425>.
- Behr, J.-P. 1997. « The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit ». *CHIMIA - ZÜRICH* 51 (1/2): 34-36.
- Bekeredjian, Raffi, Paul A. Grayburn, et Ralph V. Shohet. 2005. « Use of Ultrasound Contrast Agents for Gene or Drug Delivery in Cardiovascular Medicine ». *Journal of the American College of Cardiology* 45 (3): 329-35. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.08.067>.
- Benmerah, A., M. Bayrou, N. Cerf-Bensussan, et A. Dautry-Varsat. 1999. « Inhibition of Clathrin-Coated Pit Assembly by an Eps15 Mutant ». *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 9) (mai): 1303-11.
- Benmerah, Alexandre, et Christophe Lamaze. 2007. « Clathrin-Coated Pits: Vive La Différence? ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (8): 970-82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00585.x>.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, et Lubert Stryer. 2002. « Kinesin and Dynein Move Along Microtubules ». *Biochemistry. 5th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22572/>.
- Bhaskar, Sathyamoorthy, et Sierin Lim. 2017. « Engineering Protein Nanocages as Carriers for Biomedical Applications ». *NPG Asia Materials* 9 (4): e371-e371. <https://doi.org/10.1038/am.2016.128>.
- Bhattacharai, Shanta Raj, Sun Young Kim, Kyu Yun Jang, Ki Chang Lee, Ho Keun Yi, Dae Yeol Lee, Hak Yong Kim, et Pyoung Han Hwang. 2008. « N-Hexanoyl Chitosan-Stabilized Magnetic Nanoparticles: Enhancement of Adenoviral-Mediated Gene Expression Both in Vitro and in Vivo ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 4 (2): 146-54. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.02.001>.
- Bielsler, Jean-Marc, Moritz Wolf, Jonathan Souquet, Hervé Broly, et Massimo Morbidelli. 2018. « Perfusion Mammalian Cell Culture for Recombinant Protein Manufacturing – A Critical Review ». *Biotechnology Advances* 36 (4): 1328-40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.011>.
- Biffi, Alessandra, Eugenio Montini, Laura Lorioli, Martina Cesani, Francesca Fumagalli, Tiziana Plati, Cristina Baldoli, et al. 2013. « Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6148): 1233158. <https://doi.org/10.1126/science.1233158>.
- Bishnoi, Suman, Ritudhwaj Tiwari, Sharad Gupta, Siddappa N. Byrareddy, et Debasis Nayak. 2018. « Oncotargeting by Vesicular Stomatitis Virus (VSV): Advances in Cancer Therapy ». *Viruses* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/v10020090>.
- Bloomfield, Gareth, et Robert R. Kay. 2016. « Uses and Abuses of Macropinocytosis ». *Journal of Cell Science* 129 (14): 2697-2705. <https://doi.org/10.1242/jcs.176149>.
- Blüml, Gerald. 2007. « Microcarrier Cell Culture Technology ». In *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, édité par Ralf Pörtner, 149-78. Methods in Biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-399-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-399-8_5).

- Boucrot, Emmanuel, Antonio P. A. Ferreira, Leonardo Almeida-Souza, Sylvain Debard, Yvonne Vallis, Gillian Howard, Laetitia Bertot, Nathalie Sauvonnnet, et Harvey T. McMahon. 2015. « Endophilin Marks and Controls a Clathrin-Independent Endocytic Pathway ». *Nature* 517 (7535): 460-65. <https://doi.org/10.1038/nature14067>.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, et J. P. Behr. 1995. « A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16): 7297-7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- Brandenburg, Boerries, et Xiaowei Zhuang. 2007. « Virus trafficking – learning from single-virus tracking ». *Nature reviews. Microbiology* 5 (3): 197-208. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1615>.
- Bremner, K. H., L. W. Seymour, et C. W. Pouton. 2001. « Harnessing Nuclear Localization Pathways for Transgene Delivery ». *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 3 (2): 170-77.
- Breunig, Miriam, Uta Lungwitz, Renate Liebl, et Achim Goepferich. 2007. « Breaking up the Correlation between Efficacy and Toxicity for Nonviral Gene Delivery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (36): 14454-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703882104>.
- Broniarczyk, Justyna, Paola Massimi, Martina Bergant, et Lawrence Banks. 2015. « Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process ». *Journal of Virology* 89 (17): 8727-32. <https://doi.org/10.1128/JVI.00722-15>.
- Broussau, Sophie, Nadine Jabbour, Guillaume Lachapelle, Yves Durocher, Rosanne Tom, Julia Transfiguracion, Rénaud Gilbert, et Bernard Massie. 2008. « Inducible Packaging Cells for Large-Scale Production of Lentiviral Vectors in Serum-Free Suspension Culture ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (3): 500-507. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300383>.
- Brown, Christian T. A., David J. Stevenson, Xanthi Tsampoula, Craig McDougall, Alexander A. Lagatsky, Wilson Sibbett, Frank J. Gunn-Moore, et Kishan Dholakia. 2008. « Enhanced Operation of Femtosecond Lasers and Applications in Cell Transfection ». *Journal of Biophotonics* 1 (3): 183-99. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810011>.
- Buerli, Thomas, Christophe Pellegrino, Kristin Baer, Barbara Lardi-Studler, Ilona Chudotvorova, Jean-Marc Fritschy, Igor Medina, et Christian Fuhrer. 2007. « Efficient Transfection of DNA or ShRNA Vectors into Neurons Using Magnetofection ». *Nature Protocols* 2 (12): 3090-3101. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.445>.
- Burnie, Jonathan, et Christina Guzzo. 2019. « The Incorporation of Host Proteins into the External HIV-1 Envelope ». *Viruses* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/v11010085>.
- Burns, J C, T Friedmann, W Driever, M Burrascano, et J K Yee. 1993. « Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (17): 8033-37.
- Campbell, Lee A., Lamarque M. Coke, Christopher T. Richie, Lowella V. Fortuno, Aaron Y. Park, et Brandon K. Harvey. 2019. « Gsicle-Mediated Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex for Inactivating the HIV Provirus ». *Molecular Therapy* 27 (1): 151-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.002>.
- Cantin, Réjean, Sylvie Méthot, et Michel J. Tremblay. 2005. « Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses ». *Journal of Virology* 79 (11): 6577-87. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6577-6587.2005>.

- Cao, Ye, Yang Fei Tan, Yee Shan Wong, Melvin Wen Jie Liew, et Subbu Venkatraman. 2019. « Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery ». *Marine Drugs* 17 (6). <https://doi.org/10.3390/md17060381>.
- Capel, Victoria, Driton Vllasaliu, Peter Watts, et Snow Stolnik. 2016. « Insight into the Relationship between the Cell Culture Model, Cell Trafficking and siRNA Silencing Efficiency ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477 (2): 260-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.054>.
- Capron, Monique, Laurent Béghin, Céline Leclercq, Julien Labreuche, Arnaud Dendooven, Annie Standaert, Marie Delbeke, et al. 2019. « Safety of P28GST, a Protein Derived from a Schistosome Helminth Parasite, in Patients with Crohn's Disease: A Pilot Study (ACROHNEM) ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010041>.
- Carr, David R., et Steven E. Bradshaw. 2016. « Gene Therapies: The Challenge of Super-High-Cost Treatments and How to Pay for Them ». *Regenerative Medicine* 11 (4): 381-93. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0010>.
- Carvalho, Tecia M. U. de, Emile S. Barrias, et Wanderley de Souza. 2015. « Macropinocytosis: A Pathway to Protozoan Infection ». *Frontiers in Physiology* 6: 106. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00106>.
- Caviston, Juliane P., et Erika L. F. Holzbaur. 2006. « Microtubule Motors at the Intersection of Trafficking and Transport ». *Trends in Cell Biology* 16 (10): 530-37. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.002>.
- Cesana, Daniela, Marco Ranzani, Monica Volpin, Cynthia Bartholomae, Caroline Duros, Alexandre Artus, Stefania Merella, et al. 2014. « Uncovering and Dissecting the Genotoxicity of Self-Inactivating Lentiviral Vectors in Vivo ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (4): 774-85. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.3>.
- Cesnulevicius, Konstantin, Marco Timmer, Maik Wesemann, Tobias Thomas, Tanja Barkhausen, et Claudia Grothe. 2006. « Nucleofection Is the Most Efficient Nonviral Transfection Method for Neuronal Stem Cells Derived from Ventral Mesencephali with No Changes in Cell Composition or Dopaminergic Fate ». *STEM CELLS* 24 (12): 2776-91. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0176>.
- Chaney, W. G., D. R. Howard, J. W. Pollard, S. Sallustio, et P. Stanley. 1988. « DNA Transfection of Mammalian Cells Using Polybrene ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 4: 363-70. <https://doi.org/10.1385/0-89603-127-6:363>.
- Chen, Ming, Xiangli Liu, et Alfred Fahr. 2011. « Skin Penetration and Deposition of Carboxyfluorescein and Temoporfin from Different Lipid Vesicular Systems: In Vitro Study with Finite and Infinite Dosage Application ». *International Journal of Pharmaceutics* 408 (1-2): 223-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.006>.
- Chen, Xuguang, Samuel Shank, Pamela B. Davis, et Assem G. Ziady. 2011. « Nucleolin-Mediated Cellular Trafficking of DNA Nanoparticle Is Lipid Raft and Microtubule Dependent and Can Be Modulated by Glucocorticoid ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (1): 93-102. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.214>.
- Chin, Christine Lin, Justin Bryan Goh, Harini Srinivasan, Kaiwen Ivy Liu, Ali Gowher, Raghuvaran Shanmugam, Hsueh Lee Lim, et al. 2019. « A Human Expression System Based on HEK293 for the Stable Production of Recombinant Erythropoietin ». *Scientific Reports* 9 (1): 16768. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53391-z>.
- Chithrani, B. Devika, Arezou A. Ghazani, et Warren C. W. Chan. 2006. « Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells ». *Nano Letters* 6 (4): 662-68. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>.



- Choi, Joung-Woo, Joung-Pyo Nam, Kihoon Nam, Young Sook Lee, Chae-Ok Yun, et Sung Wan Kim. 2015. « Oncolytic Adenovirus Coated with Multidegradable Bioreducible Core-Cross-Linked Polyethylenimine for Cancer Gene Therapy ». *Biomacromolecules* 16 (7): 2132-43. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00538>.
- Chow, Yu Ting, Shuxun Chen, Ran Wang, Chichi Liu, Chi-Wing Kong, Ronald A. Li, Shuk Han Cheng, et Dong Sun. 2016. « Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes ». *Scientific Reports* 6 (avril): 24127. <https://doi.org/10.1038/srep24127>.
- Clague, M. J., C. Schoch, L. Zech, et R. Blumenthal. 1990. « Gating Kinetics of PH-Activated Membrane Fusion of Vesicular Stomatitis Virus with Cells: Stopped-Flow Measurements by Dequenching of Octadecylrhodamine Fluorescence ». *Biochemistry* 29 (5): 1303-8. <https://doi.org/10.1021/bi00457a028>.
- Clark, Paul R, Alison T Stopeck, Jacqueline L Brailey, Qing Wang, James McArthur, Mitch H Finer, et Evan M Hersh. 1999. « Polycations and Cationic Lipids Enhance Adenovirus Transduction and Transgene Expression in Tumor Cells ». *Cancer Gene Therapy* 6 (5): 437-46. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700074>.
- « ClinicalTrials.Gov ». 2019. 2019. <https://clinicaltrials.gov/>.
- Cohen, Richard N., Marieke A.E.M. van der Aa, Nichole Macaraeg, Ai Ping Lee, et Francis C. Szoka. 2009. « Quantification of Plasmid DNA Copies in the Nucleus after Lipoplex and Polyplex Transfection ». *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 135 (2): 166-74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.12.016>.
- Commissioner, Office of the. 2020. « First FDA-Approved Vaccine for the Prevention of Ebola Virus Disease, Marking a Critical Milestone in Public Health Preparedness and Response ». FDA. FDA. 24 mars 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-ebola-virus-disease-marking-critical-milestone-public-health>.
- Conner, Sean D., et Sandra L. Schmid. 2003. « Regulated Portals of Entry into the Cell ». *Nature* 422 (6927): 37-44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- Coonrod, A., F. Q. Li, et M. Horwitz. 1997. « On the Mechanism of DNA Transfection: Efficient Gene Transfer without Viruses ». *Gene Therapy* 4 (12): 1313-21. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300536>.
- Cooper, Geoffrey M. 2000a. « Endocytosis ». *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9831/>.
- . 2000b. « Structure of the Plasma Membrane ». *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>.
- Costa Verdera, Helena, Jerney J. Gitz-Francois, Raymond M. Schiffelers, et Pieter Vader. 2017. « Cellular Uptake of Extracellular Vesicles Is Mediated by Clathrin-Independent Endocytosis and Macropinocytosis ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 266 (novembre): 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.019>.
- Couchoux, Harold, Bruno Allard, Claude Legrand, Vincent Jacquemond, et Christine Berthier. 2007. « Loss of Caveolin-3 Induced by the Dystrophy-Associated P104L Mutation Impairs L-Type Calcium Channel Function in Mouse Skeletal Muscle Cells ». *The Journal of Physiology* 580 (Pt.3): 745-54. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124198>.
- Crespo-Barreda, A., M. M. Encabo-Berzosa, R. González-Pastor, P. Ortiz-Teba, M. Iglesias, J. L. Serrano, et P. Martin-Duque. 2016. « Chapter 11 - Viral and Nonviral Vectors for In Vivo and Ex Vivo Gene Therapies ». In *Translating Regenerative Medicine to the Clinic*, édité par Jeffrey Laurence, 155-77. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800548-4.00011-5>.

- Cui, Shaohui, Yueying Wang, Yan Gong, Xiao Lin, Yinan Zhao, Defu Zhi, Quan Zhou, et Shubiao Zhang. 2018. « Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups ». *Toxicology Research* 7 (3): 473-79. <https://doi.org/10.1039/c8tx00005k>.
- Cureton, David K., Ramiro H. Massol, Saveez Saffarian, Tomas L. Kirchhausen, et Sean P. J. Whelan. 2009. « Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization ». *PLOS Pathogens* 5 (4): e1000394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000394>.
- Daecke, Jessica, Oliver T. Fackler, Matthias T. Dittmar, et Hans-Georg Kräusslich. 2005. « Involvement of Clathrin-Mediated Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry ». *Journal of Virology* 79 (3): 1581-94. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1581-1594.2005>.
- Daemen, Toos, Arjan de Mare, Laura Bungener, Jørgen de Jonge, Anke Huckriede, et Jan Wilschut. 2005. « Virosomes for Antigen and DNA Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (3): 451-63. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.005>.
- Danke, H., T. Baba, A. M. van der Blik, et S. L. Schmid. 1995. « Clathrin-Independent Pinocytosis Is Induced in Cells Overexpressing a Temperature-Sensitive Mutant of Dynamin ». *The Journal of Cell Biology* 131 (1): 69-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.1.69>.
- Danke, H., T. Baba, D. E. Warnock, et S. L. Schmid. 1994. « Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation ». *The Journal of Cell Biology* 127 (4): 915-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.915>.
- David, Rhiannon M., et Ann T. Doherty. 2017. « Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity ». *Toxicological Sciences* 155 (2): 315-25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw220>.
- Davis, Howard E., Jeffrey R. Morgan, et Martin L. Yarmush. 2002. « Polybrene Increases Retrovirus Gene Transfer Efficiency by Enhancing Receptor-Independent Virus Adsorption on Target Cell Membranes ». *Biophysical Chemistry* 97 (2-3): 159-72. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00057-1).
- De Temmerman, Marie-Luce, Heleen Dewitte, Roosmarijn E. Vandenbroucke, Bart Lucas, Claude Libert, Jo Demeester, Stefaan C. De Smedt, Ine Lentacker, et Joanna Rejman. 2011. « mRNA-Lipoplex Loaded Microbubble Contrast Agents for Ultrasound-Assisted Transfection of Dendritic Cells ». *Biomaterials* 32 (34): 9128-35. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.024>.
- Dean, D. A. 1997. « Import of Plasmid DNA into the Nucleus Is Sequence Specific ». *Experimental Cell Research* 230 (2): 293-302. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.3427>.
- Degiulio, J. V., C. D. Kaufman, et D. A. Dean. 2010. « The SP-C Promoter Facilitates Alveolar Type II Epithelial Cell-Specific Plasmid Nuclear Import and Gene Expression ». *Gene Therapy* 17 (4): 541-49. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.166>.
- Del'Guidice, Thomas, Jean-Pascal Lepetit-Stoffaes, Louis-Jean Bordeleau, Joannie Roberge, Vanessa Théberge, Coraline Lauvaux, Xavier Barbeau, et al. 2018. « Membrane Permeabilizing Amphiphilic Peptide Delivers Recombinant Transcription Factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 Ribonucleoproteins in Hard-to-Modify Cells ». *PLOS ONE* 13 (4): e0195558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195558>.
- Delva, Emmanuella, Jean Marie Jennings, Catharine C. Calkins, Margaret D. Kottke, Victor Faundez, et Andrew P. Kowalczyk. 2008. « Pemphigus Vulgaris IgG-Induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-Independent Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 18303-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710046200>.

- Desai, Arpan S., Morag R. Hunter, et Alexander N. Kapustin. 2019. « Using macropinocytosis for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids to tumour cells ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1765): 20180156. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0156>.
- Deshayes, S., M. C. Morris, G. Divita, et F. Heitz. 2005. « Cell-Penetrating Peptides: Tools for Intracellular Delivery of Therapeutics ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (16): 1839-49. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5109-0>.
- Dettenhofer, M., et X. F. Yu. 1999. « Highly Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reveals a Virtual Absence of Vif in Virions ». *Journal of Virology* 73 (2): 1460-67.
- Dodding, Mark P, et Michael Way. 2011. « Coupling viruses to dynein and kinesin-1 ». *The EMBO Journal* 30 (17): 3527-39. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.283>.
- Doherty, Gary J., et Harvey T. McMahon. 2009. « Mechanisms of Endocytosis ». *Annual Review of Biochemistry* 78: 857-902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>.
- Dorozhkin, Sergey V., et Matthias Epple. 2002. « Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 41 (17): 3130-46. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1).
- Drake, David M., et Daniel W. Pack. 2008. « Biochemical Investigation of Active Intracellular Transport of Polymeric Gene-Delivery Vectors ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (4): 1399-1413. <https://doi.org/10.1002/jps.21106>.
- Dransfeld, Christian-Lars, Hamed Alborzinia, Stefan Wölfl, et Ulrich Mählknecht. 2010. « Continuous multiparametric monitoring of cell metabolism in response to transient overexpression of the sirtuin deacetylase SIRT3 ». *Clinical Epigenetics* 1 (1-2): 55-60. <https://doi.org/10.1007/s13148-010-0004-4>.
- Drolet, Barbara S., Corey L. Campbell, Melissa A. Stuart, et William C. Wilson. 2005. « Vector Competence of *Culicoides* *Sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) for Vesicular Stomatitis Virus ». *Journal of Medical Entomology* 42 (3): 409-18. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0409:vcocsd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0409:vcocsd]2.0.co;2).
- Drolet, Barbara S., Melissa A. Stuart, et Justin D. Derner. 2009. « Infection of *Melanoplus Sanguinipes* Grasshoppers Following Ingestion of Rangeland Plant Species Harboring Vesicular Stomatitis Virus ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (10): 3029-33. <https://doi.org/10.1128/AEM.02368-08>.
- Dumont, Jennifer, Don Eewart, Baisong Mei, Scott Estes, et Rashmi Kshirsagar. 2016. « Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives ». *Critical Reviews in Biotechnology* 36 (6): 1110-22. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>.
- Durocher, Yves, Sylvie Perret, et Amine Kamen. 2002. « High-Level and High-Throughput Recombinant Protein Production by Transient Transfection of Suspension-Growing Human 293-EBNA1 Cells ». *Nucleic Acids Research* 30 (2): E9. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.e9>.
- Edeling, Melissa A., Corinne Smith, et David Owen. 2006. « Life of a Clathrin Coat: Insights from Clathrin and AP Structures ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (1): 32-44. <https://doi.org/10.1038/nrm1786>.
- Edelstein, Michael. 2019a. « Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials ». *The Journal of Gene Medicine*. 2019. <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>.
- . 2019b. « Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials ». *The Journal of Gene Medicine*. 2019. <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>.
- Egami, Youhei, Tomohiko Taguchi, Masashi Maekawa, Hiroyuki Arai, et Nobukazu Araki. 2014. « Small GTPases and Phosphoinositides in the Regulatory Mechanisms of Macropinosome

- Formation and Maturation ». *Frontiers in Physiology* 5: 374.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00374>.
- Ehrlich, Marcelo, Werner Boll, Antoine Van Oijen, Ramesh Hariharan, Kartik Chandran, Max L. Nibert, et Tomas Kirchhausen. 2004. « Endocytosis by Random Initiation and Stabilization of Clathrin-Coated Pits ». *Cell* 118 (5): 591-605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.017>.
- Elouahabi, Abdelatif, et Jean-Marie Ruyschaert. 2005. « Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 11 (3): 336-47. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.006>.
- Elsabahy, Mahmoud, et Karen L. Wooley. 2012. « Strategies toward Well-Defined Polymer Nanoparticles Inspired by Nature: Chemistry versus Versatility ». *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 50 (10): 1869-80. <https://doi.org/10.1002/pola.25955>.
- Emery, David W. 2011. « The Use of Chromatin Insulators to Improve the Expression and Safety of Integrating Gene Transfer Vectors ». *Human Gene Therapy* 22 (6): 761-74.  
<https://doi.org/10.1089/hum.2010.233>.
- Epple, M., K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, et V. Sokolova. 2009. « Application of Calcium Phosphate Nanoparticles in Biomedicine ». *Journal of Materials Chemistry* 20 (1): 18-23. <https://doi.org/10.1039/B910885H>.
- Evers, Chris H. J., Jurriaan A. Luiken, Peter G. Bolhuis, et Willem K. Kegel. 2016. « Self-Assembly of Microcapsules via Colloidal Bond Hybridization and Anisotropy ». *Nature* 534 (7607): 364-68.  
<https://doi.org/10.1038/nature17956>.
- Fan, Pengfei, Yi Zhang, Xiasheng Guo, Chenliang Cai, Maochen Wang, Dongxin Yang, Yiran Li, et al. 2017. « Cell-cycle-specific Cellular Responses to Sonoporation ». *Theranostics* 7 (19): 4894-4908. <https://doi.org/10.7150/thno.20820>.
- Fan, Z., D. Chen, et C.X. Deng. 2013. « Improving ultrasound gene transfection efficiency by controlling ultrasound excitation of microbubbles ». *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 170 (3): 401-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.039>.
- Felgner, P. L., Y. Barenholz, J. P. Behr, S. H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J. A. Jessee, et al. 1997. « Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems ». *Human Gene Therapy* 8 (5): 511-12. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.5-511>.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, et M. Danielsen. 1987. « Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (21): 7413-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.
- Fernando, Lawrence P., Prakash K. Kandel, Jiangbo Yu, Jason McNeill, P. Christine Ackroyd, et Kenneth A. Christensen. 2010. « Mechanism of Cellular Uptake of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles ». *Biomacromolecules* 11 (10): 2675-82.  
<https://doi.org/10.1021/bm1007103>.
- Ferrara, Katherine, Rachel Pollard, et Mark Borden. 2007. « Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery ». *Annual Review of Biomedical Engineering* 9: 415-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852>.
- Finkelshtein, Danit, Ariel Werman, Daniela Novick, Sara Barak, et Menachem Rubinstein. 2013. « LDL Receptor and Its Family Members Serve as the Cellular Receptors for Vesicular Stomatitis Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (18): 7306-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>.

- Florea, Bogdan I., Clare Meaney, Hans E. Junginger, et Gerrit Borchard. 2002. « Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures ». *AAPS PharmSci* 4 (3): 1-11. <https://doi.org/10.1208/ps040312>.
- Florkiewicz, R. Z., et J. K. Rose. 1984. « A Cell Line Expressing Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Fuses at Low PH ». *Science (New York, N.Y.)* 225 (4663): 721-23. <https://doi.org/10.1126/science.6087454>.
- Fraley, R., S. Subramani, P. Berg, et D. Papahadjopoulos. 1980. « Introduction of Liposome-Encapsulated SV40 DNA into Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 255 (21): 10431-35.
- FRANCISCO, Estela Miranda. 2019. « First Vaccine to Protect against Ebola ». Text. European Medicines Agency. 18 octobre 2019. <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-vaccine-protect-against-ebola>.
- Fujimoto, T., H. Kogo, R. Nomura, et T. Une. 2000. « Isoforms of Caveolin-1 and Caveolar Structure ». *Journal of Cell Science* 113 Pt 19 (octobre): 3509-17.
- Funabashi, Hisakage, Makoto Takatsu, Mikako Saito, et Hideaki Matsuoka. 2010. « Sox2 Regulatory Region 2 Sequence Works as a DNA Nuclear Targeting Sequence Enhancing the Efficiency of an Exogenous Gene Expression in ES Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400 (4): 554-58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.098>.
- Furuyama, Wakako, Pierce Reynolds, Elaine Haddock, Kimberly Meade-White, Mai Quynh Le, Yoshihiro Kawaoka, Heinz Feldmann, et Andrea Marzi. 2020. « A Single Dose of a Vesicular Stomatitis Virus-Based Influenza Vaccine Confers Rapid Protection against H5 Viruses from Different Clades ». *Npj Vaccines* 5 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0155-z>.
- Fushimi, K., et A. S. Verkman. 1991. « Low Viscosity in the Aqueous Domain of Cell Cytoplasm Measured by Picosecond Polarization Microfluorimetry ». *The Journal of Cell Biology* 112 (4): 719-25. <https://doi.org/10.1083/jcb.112.4.719>.
- Gabrielson, Nathan P., et Daniel W. Pack. 2009. « Efficient Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery Proceeds via a Caveolar Pathway in HeLa Cells ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 136 (1): 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.003>.
- Garrison, Louis P., Tristen Jackson, Douglas Paul, et Mike Kenston. 2019. « Value-Based Pricing for Emerging Gene Therapies: The Economic Case for a Higher Cost-Effectiveness Threshold ». *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* 25 (7): 793-99. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2019.18378>.
- Gaudin, Y., R. W. Ruigrok, M. Knossow, et A. Flamand. 1993. « Low-PH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and Their Role in Membrane Fusion ». *Journal of Virology* 67 (3): 1365-72.
- Gersdorff, Katharina von, Niek N. Sanders, Roosmarijn Vandenbroucke, Stefaan C. De Smedt, Ernst Wagner, et Manfred Ogris. 2006. « The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on Both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (5): 745-53. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.07.006>.
- Glebov, Oleg O., Nicholas A. Bright, et Benjamin J. Nichols. 2006. « Flotillin-1 Defines a Clathrin-Independent Endocytic Pathway in Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 8 (1): 46-54. <https://doi.org/10.1038/ncb1342>.
- Glover, Dominic J., Denisse L. Leyton, Gregory W. Moseley, et David A. Jans. 2010. « The Efficiency of Nuclear Plasmid DNA Delivery Is a Critical Determinant of Transgene Expression at the

- Single Cell Level ». *The Journal of Gene Medicine* 12 (1): 77-85.  
<https://doi.org/10.1002/jgm.1406>.
- Glover, Dominic J., Su May Ng, Adam Mechler, Lisandra L. Martin, et David A. Jans. 2009. « Multifunctional Protein Nanocarriers for Targeted Nuclear Gene Delivery in Nondividing Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (9): 2996-3006. <https://doi.org/10.1096/fj.09-131425>.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et A. G. Mikos. 1999. « Poly(Ethyleneimine) and Its Role in Gene Delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 60 (2-3): 149-60. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00090-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00090-5).
- Gosselin, Michael A., Wenjin Guo, et Robert J. Lee. 2001. « Efficient Gene Transfer Using Reversibly Cross-Linked Low Molecular Weight Polyethylenimine ». *Bioconjugate Chemistry* 12 (6): 989-94. <https://doi.org/10.1021/bc0100455>.
- Graham, F. L., et A. J. Van Der Eb. 1973. « Transformation of Rat Cells by DNA of Human Adenovirus 5 ». *Virology* 54 (2): 536-39. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90163-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90163-3).
- Grassart, Alexandre, Annick Dujeancourt, Paul B. Lazarow, Alice Dautry-Varsat, et Nathalie Sauvonnnet. 2008. « Clathrin-Independent Endocytosis Used by the IL-2 Receptor Is Regulated by Rac1, Pak1 and Pak2 ». *EMBO Reports* 9 (4): 356-62.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2008.28>.
- Gratton, Stephanie E. A., Patricia A. Ropp, Patrick D. Pohlhaus, J. Christopher Luft, Victoria J. Madden, Mary E. Napier, et Joseph M. DeSimone. 2008. « The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (33): 11613-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>.
- Greene, L. E., et E. Eisenberg. 1990. « Dissociation of Clathrin from Coated Vesicles by the Uncoating ATPase. ». *Journal of Biological Chemistry* 265 (12): 6682-87.
- Gresch, Oliver, Felix B. Engel, Dobrila Nesic, Thi Thai Tran, Hazel M. England, Emma S. Hickman, Ida Körner, et al. 2004. « New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells ». *Methods (San Diego, Calif.)* 33 (2): 151-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.009>.
- Griesenbach, Uta, Katherine M. Wilson, Raymond Farley, Cuixiang Meng, Felix M. Munkonge, Seng H. Cheng, Ronald K. Scheule, et Eric W. F. W. Alton. 2012. « Assessment of the Nuclear Pore Dilating Agent Trans-Cyclohexane-1,2-Diol in Differentiated Airway Epithelium ». *The Journal of Gene Medicine* 14 (7): 491-500. <https://doi.org/10.1002/jgm.2643>.
- Grünwald, Geoffrey K., Alexandra Vetter, Kathrin Klutz, Michael J. Willhauck, Nathalie Schwenk, Reingard Senekowitsch-Schmidtke, Markus Schwaiger, et al. 2013. « Systemic Image-Guided Liver Cancer Radiovirotherapy Using Dendrimer-Coated Adenovirus Encoding the Sodium Iodide Symporter as Theranostic Gene ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 54 (8): 1450-57.  
<https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115493>.
- Grüter, O., C. Kostic, S. V. Crippa, M.-T. R. Perez, L. Zografos, D. F. Schorderet, F. L. Munier, et Y. Arsenijevic. 2005. « Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer in Adult Mouse Photoreceptors Is Impaired by the Presence of a Physical Barrier ». *Gene Therapy* 12 (11): 942-47. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302485>.
- Guang Liu, Wen, et Kang De Yao. 2002. « Chitosan and Its Derivatives--a Promising Non-Viral Vector for Gene Transfection ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 83 (1): 1-11. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00144-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00144-x).
- Günther, Melanie, Jens Lipka, Anastasia Malek, Daniela Gutsch, Wolfgang Kreyling, et Achim Aigner. 2011. « Polyethylenimines for RNAi-Mediated Gene Targeting in Vivo and SiRNA Delivery to

- the Lung ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Biological Barriers, 77 (3): 438-49. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.007>.
- Gupta, Bhawna, Tatiana S. Levchenko, et Vladimir P. Torchilin. 2005. « Intracellular Delivery of Large Molecules and Small Particles by Cell-Penetrating Proteins and Peptides ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Protein- and Peptide-Mediated Transduction: Mechanisms and Implications for Drug Delivery, 57 (4): 637-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.10.007>.
- Gurtovenko, Andrey A., et Ilpo Vattulainen. 2007. « Molecular Mechanism for Lipid Flip-Flops ». *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (48): 13554-59. <https://doi.org/10.1021/jp077094k>.
- Ha, Dinh, Ningning Yang, et Venkatareddy Nadithe. 2016. « Exosomes as Therapeutic Drug Carriers and Delivery Vehicles across Biological Membranes: Current Perspectives and Future Challenges ». *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Functional Materials, Nanocarriers, and Formulations for Targeted Therapy, 6 (4): 287-96. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>.
- Haider, Husnain K, Ibrahim Elmadbouh, Michel Jean-Baptiste, et Muhammad Ashraf. 2008. « Nonviral Vector Gene Modification of Stem Cells for Myocardial Repair ». *Molecular Medicine* 14 (1-2): 79-86. <https://doi.org/10.2119/2007-00092.Haider>.
- Hällbrink, Mattias, Johannes Oehlke, Gisela Papsdorf, et Michael Bienert. 2004. « Uptake of Cell-Penetrating Peptides Is Dependent on Peptide-to-Cell Ratio Rather than on Peptide Concentration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1667 (2): 222-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.10.009>.
- Hamann, Andrew, Albert Nguyen, et Angela K. Pannier. 2019. « Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications ». *Journal of Biological Engineering* 13 (janvier). <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0140-0>.
- Hansen, D. E., M. C. Thurmond, et M. Thorburn. 1985. « Factors Associated with the Spread of Clinical Vesicular Stomatitis in California Dairy Cattle ». *American Journal of Veterinary Research* 46 (4): 789-95.
- Harada, Josephine N., Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, David C. Pallas, et Arnold J. Berk. 2002. « Analysis of the Adenovirus E1B-55K-Anchored Proteome Reveals Its Link to Ubiquitination Machinery ». *Journal of Virology* 76 (18): 9194-9206. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9194-9206.2002>.
- Harush-Frenkel, Oshrat, Nir Debotton, Simon Benita, et Yoram Altschuler. 2007. « Targeting of Nanoparticles to the Clathrin-Mediated Endocytic Pathway ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353 (1): 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.135>.
- Harvey, J, S C Hardy, et M L J Ashford. 1999. « Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on KATP channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line ». *British Journal of Pharmacology* 126 (1): 51-60. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702267>.
- Hayer, Arnold, Miriam Stoeber, Christin Bissig, et Ari Helenius. 2010. « Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (3): 361-82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x>.
- He, Hao, Siu-Kai Kong, Rebecca Kit-Ying Lee, Yick-Keung Suen, et Kam Tai Chan. 2008. « Targeted Photoporation and Transfection in Human HepG2 Cells by a Fiber Femtosecond Laser at 1554 Nm ». *Optics Letters* 33 (24): 2961-63. <https://doi.org/10.1364/ol.33.002961>.
- Heikkilä, Outi, Petri Susi, Tuire Tevaluoto, Heidi Härmä, Varpu Marjomäki, Timo Hyypiä, et Saija Kiljunen. 2010. « Internalization of Coxsackievirus A9 Is Mediated by  $\beta$ 2-Microglobulin, Dynamin, and Arf6 but Not by Caveolin-1 or Clathrin ». *Journal of Virology* 84 (7): 3666-81. <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-09>.

- Hermens, Wim T.J.M.C., Olivier Ter Brake, Paul A. Dijkhuizen, Marc A.F. Sonnemans, Dirk Grimm, Jurgen A. Kleinschmidt, et Joost Verhaagen. 1999. « Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus by Iodixanol Gradient Ultracentrifugation Allows Rapid and Reproducible Preparation of Vector Stocks for Gene Transfer in the Nervous System ». *Human Gene Therapy* 10 (11): 1885-91. <https://doi.org/10.1089/10430349950017563>.
- Hernot, Sophie, et Alexander L. Klibanov. 2008. « Microbubbles in Ultrasound-Triggered Drug and Gene Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (10): 1153-66. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.005>.
- Hill, Michelle M., Michele Bastiani, Robert Luetterforst, Matthew Kirkham, Annika Kirkham, Susan J. Nixon, Piers Walser, et al. 2008. « PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function ». *Cell* 132 (1): 113-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042>.
- Hinrichsen, Lars, Jens Harborth, Lars Andrees, Klaus Weber, et Ernst J. Ungewickell. 2003. « Effect of Clathrin Heavy Chain- and Alpha-Adaptin-Specific Small Inhibitory RNAs on Endocytic Accessory Proteins and Receptor Trafficking in HeLa Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 45160-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307290200>.
- Holmen, S. L., M. W. Vanbrocklin, R. R. Eversole, S. R. Stapleton, et L. C. Ginsberg. 1995. « Efficient Lipid-Mediated Transfection of DNA into Primary Rat Hepatocytes ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 31 (5): 347-51. <https://doi.org/10.1007/BF02634283>.
- Hu, Jianwen, Jizhong Han, Haoran Li, Xian Zhang, Lan lan Liu, Fei Chen, et Bin Zeng. 2018. « Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology ». *Cells Tissues Organs* 205 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1159/000485501>.
- Hu, Wei-Shau, et Vinay K. Pathak. 2000. « Design of Retroviral Vectors and Helper Cells for Gene Therapy ». *Pharmacological Reviews* 52 (4): 493-512.
- Huang, Fangtian, Anastasia Khvorova, William Marshall, et Alexander Sorkin. 2004. « Analysis of Clathrin-Mediated Endocytosis of Epidermal Growth Factor Receptor by RNA Interference ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (16): 16657-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400046200>.
- Huang, Min, Zengshuan Ma, Eugene Khor, et Lee-Yong Lim. 2002. « Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells ». *Pharmaceutical Research* 19 (10): 1488-94. <https://doi.org/10.1023/A:1020404615898>.
- Huang, Xinglu, Xu Teng, Dong Chen, Fangqiong Tang, et Junqi He. 2010. « The Effect of the Shape of Mesoporous Silica Nanoparticles on Cellular Uptake and Cell Function ». *Biomaterials* 31 (3): 438-48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.060>.
- Huckriede, Anke, Laura Bungener, Toon Stegmann, Toos Daemen, Jeroen Medema, Abraham M. Palache, et Jan Wilschut. 2005. « The Virosome Concept for Influenza Vaccines ». *Vaccine* 23 Suppl 1 (juillet): S26-38. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.04.026>.
- Hunter, Molly, Ping Yuan, Divya Vavilala, et Mark Fox. 2019. « Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells ». *Current Protocols in Protein Science* 95 (1): e77. <https://doi.org/10.1002/cpp.77>.
- Huotari, Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome Maturation ». *The EMBO Journal* 30 (17): 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- Hwang, Jun-Ho, Sigirim Lee, Eunmi Kim, Jung-Suk Kim, Chang-Ha Lee, Ik-Sung Ahn, et Jae-Hyung Jang. 2011. « Heparin-Coated Superparamagnetic Nanoparticle-Mediated Adeno-Associated



- Virus Delivery for Enhancing Cellular Transduction ». *International Journal of Pharmaceutics* 421 (2): 397-404. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.019>.
- Ichim, Christine V., et Richard A. Wells. 2011. « Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation ». *Journal of Translational Medicine* 9 (1): 137. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-137>.
- Itaka, Keiji, Atsushi Harada, Yuichi Yamasaki, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, et Kazunori Kataoka. 2004. « In Situ Single Cell Observation by Fluorescence Resonance Energy Transfer Reveals Fast Intra-Cytoplasmic Delivery and Easy Release of Plasmid DNA Complexed with Linear Polyethylenimine ». *The Journal of Gene Medicine* 6 (1): 76-84. <https://doi.org/10.1002/jgm.470>.
- Ivanov, Andrei I. 2008. « Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? » *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 440: 15-33. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9_2).
- Iwasa, Akitada, Hidetaka Akita, Ikramy Khalil, Kentaro Kogure, Shiroh Futaki, et Hideyoshi Harashima. 2006. « Cellular Uptake and Subsequent Intracellular Trafficking of R8-Liposomes Introduced at Low Temperature ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (6): 713-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.015>.
- Jackson, Lisa A., Evan J. Anderson, Nadine G. Roupheal, Paul C. Roberts, Mamodikoe Makhene, Rhea N. Coler, Michele P. McCullough, et al. 2020. « An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report ». *New England Journal of Medicine*, juillet. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>.
- Jacobsen, Frank, Janine Mertens-Rill, Juergen Beller, Tobias Hirsch, Adrien Daigeler, Stefan Langer, Marcus Lehnhardt, Hans-Ulrich Steinau, et Lars Steinstraesser. 2006. « Nucleofection: A New Method for Cutaneous Gene Transfer? » *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2006 (5): 26060. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/26060>.
- James, M. B., et T. D. Giorgio. 2000. « Nuclear-Associated Plasmid, but Not Cell-Associated Plasmid, Is Correlated with Transgene Expression in Cultured Mammalian Cells ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 1 (4): 339-46. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0054>.
- Jayant, Rahul Dev, Daniela Sosa, Ajeet Kaushik, Venkata Atluri, Arti Vashist, Asahi Tomitaka, et Madhavan Nair. 2016. « Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders ». *Expert opinion on drug delivery* 13 (10): 1433-45. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1188802>.
- Jin, Lian, Xin Zeng, Ming Liu, Yan Deng, et Nongyue He. 2014. « Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-Carriers ». *Theranostics* 4 (3): 240-55. <https://doi.org/10.7150/thno.6914>.
- Joanne, P., P. Nicolas, et C. El Amri. 2009. « Antimicrobial Peptides and Viral Fusion Peptides: How Different They Are? » *Protein and Peptide Letters* 16 (7): 743-50. <https://doi.org/10.2174/092986609788681814>.
- Johannsdottir, Hrefna Kristin, Roberta Mancini, Jurgen Kartenbeck, Lea Amato, et Ari Helenius. 2009. « Host Cell Factors and Functions Involved in Vesicular Stomatitis Virus Entry ». *Journal of Virology* 83 (1): 440-53. <https://doi.org/10.1128/JVI.01864-08>.
- Jones, Arwyn T., et Edward J. Sayers. 2012. « Cell Entry of Cell Penetrating Peptides: Tales of Tails Wagging Dogs ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 161 (2): 582-91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.003>.

- Jones, Arwyn Tomos. 2007. « Macropinocytosis: Searching for an Endocytic Identity and Role in the Uptake of Cell Penetrating Peptides ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (4): 670-84. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00062.x>.
- Jonge, J. de, M. Holtrop, J. Wilschut, et A. Huckriede. 2006. « Reconstituted Influenza Virus Envelopes as an Efficient Carrier System for Cellular Delivery of Small-Interfering RNAs ». *Gene Therapy* 13 (5): 400-411. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302673>.
- Jordan, Elizabeth T., Michelle Collins, Joseph Terefe, Luis Ugozzoli, et Teresa Rubio. 2008. « Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells ». *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* 19 (5): 328-34.
- Jordan, Martin, Annette Schallhorn, et Florian M. Wurm. 1996. « Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation ». *Nucleic Acids Research* 24 (4): 596-601. <https://doi.org/10.1093/nar/24.4.596>.
- Kaczmarczyk, Stanislaw J., Kalavathy Sitaraman, Howard A. Young, Stephen H. Hughes, et Deb K. Chatterjee. 2011. « Protein Delivery Using Engineered Virus-like Particles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (41): 16998-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101874108>.
- Kaestner, Lars, Anke Scholz, Qinghai Tian, Sandra Ruppenthal, Wiebke Tabellion, Kathrina Wiesen, Hugo A. Katus, Oliver J. Müller, Michael I. Kotlikoff, et Peter Lipp. 2014. « Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators in Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 114 (10): 1623-39. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303475>.
- Kafil, Vala, et Yadollah Omid. 2011. « Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells ». *BiolImpacts: BI* 1 (1): 23-30. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.004>.
- Kafri, T., U. Blömer, D. A. Peterson, F. H. Gage, et I. M. Verma. 1997. « Sustained Expression of Genes Delivered Directly into Liver and Muscle by Lentiviral Vectors ». *Nature Genetics* 17 (3): 314-17. <https://doi.org/10.1038/ng1197-314>.
- Kälin, Stefan, Beat Amstutz, Michele Gastaldelli, Nina Wolfrum, Karin Boucke, Menzo Havenga, Fabienne DiGennaro, Nicole Liska, Silvio Hemmi, et Urs F. Greber. 2010. « Macropinocytotic Uptake and Infection of Human Epithelial Cells with Species B2 Adenovirus Type 35 ». *Journal of Virology* 84 (10): 5336-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.02494-09>.
- Kameyama, Shouju, Mayo Horie, Takeo Kikuchi, Takao Omura, Akiko Tadokoro, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Yukio Sugiura, et Shiroh Futaki. 2007. « Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates ». *Peptide Science* 88 (2): 98-107. <https://doi.org/10.1002/bip.20689>.
- Kämper, Nadine, Patricia M. Day, Thorsten Nowak, Hans-Christoph Selinka, Luise Florin, Jan Bolscher, Lydia Hilbig, John T. Schiller, et Martin Sapp. 2006. « A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Is Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes ». *Journal of Virology* 80 (2): 759-68. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.759-768.2006>.
- Kaneda, Yasufumi, Toshihiro Nakajima, Tomoyuki Nishikawa, Seiji Yamamoto, Hiroyuki Ikegami, Naho Suzuki, Hitomi Nakamura, Ryuichi Morishita, et Hitoshi Kotani. 2002. « Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 6 (2): 219-26. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0647>.

- Karshafian, Raffi, Sanya Samac, Peter D. Bevan, et Peter N. Burns. 2010. « Microbubble Mediated Sonoporation of Cells in Suspension: Clonogenic Viability and Influence of Molecular Size on Uptake ». *Ultrasonics* 50 (7): 691-97. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2010.01.009>.
- Kasamatsu, H., et A. Nakanishi. 1998. « How Do Animal Dna Viruses Get to the Nucleus? » *Annual Review of Microbiology* 52 (1): 627-86. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.627>.
- Kasper, Jennifer, Maria I. Hermanns, Christoph Bantz, Olga Koshkina, Thomas Lang, Michael Maskos, Christine Pohl, Ronald E. Unger, et C. James Kirkpatrick. 2013. « Interactions of silica nanoparticles with lung epithelial cells and the association to flotillins ». *Archives of Toxicology* 87 (6): 1053-65. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0876-5>.
- Kawabata, Kenji, Yoshinobu Takakura, et Mitsuru Hashida. 1995. « The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake ». *Pharmaceutical Research* 12 (6): 825-30. <https://doi.org/10.1023/A:1016248701505>.
- Keren, Kinneret. 2011. « Cell motility: the integrating role of the plasma membrane ». *European Biophysics Journal* 40 (9): 1013-27. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0741-0>.
- Keswani, Rahul K., Mihael Lazebnik, et Daniel W. Pack. 2015. « Intracellular Trafficking of Hybrid Gene Delivery Vectors ». *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 207 (juin): 120-30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.015>.
- Keswani, Rahul, Kai Su, et Daniel W. Pack. 2014. « Efficient In Vitro Gene Delivery by Hybrid Biopolymer/Virus Nanobiovectors ». *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 192 (octobre): 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.060>.
- Khalil, Ikramy A., Kentaro Kogure, Hidetaka Akita, et Hideyoshi Harashima. 2006. « Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery ». *Pharmacological Reviews* 58 (1): 32-45. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.8>.
- Khosravi-Darani, Kianoush, Mohamaad Reza Mozafari, Ladan Rashidi, et Mehrdad Mohammadi. 2010. « Calcium Based Non-Viral Gene Delivery: An Overview of Methodology and Applications ». *Acta Medica Iranica* 48 (3): 133-41.
- Kichler, A., C. Leborgne, E. Coeytaux, et O. Danos. 2001. « Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery: A Mechanistic Study ». *The Journal of Gene Medicine* 3 (2): 135-44. <https://doi.org/10.1002/jgm.173>.
- Kidd, Martha E., Seungjin Shin, et Lonnie D. Shea. 2012. « Fibrin Hydrogels for Lentiviral Gene Delivery in Vitro and in Vivo ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 157 (1): 80-85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.036>.
- Kiesslich, Sascha, José Pedro Vila-Chã Losa, Jean-François Gélinas, et Amine A. Kamen. 2020. « Serum-Free Production of RVSV-ZEBOV in Vero Cells: Microcarrier Bioreactor versus Scale-X™ Hydro Fixed-Bed ». *Journal of Biotechnology* 310 (février): 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.015>.
- Kim, Irene S., Simon Jenni, Megan L. Stanifer, Eatai Roth, Sean P. J. Whelan, Antoine M. van Oijen, et Stephen C. Harrison. 2017. « Mechanism of Membrane Fusion Induced by Vesicular Stomatitis Virus G Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (1): E28-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618883114>.
- Kim, J.-S., H. S. Chu, K. I. Park, J.-I. Won, et J.-H. Jang. 2012. « Elastin-like Polypeptide Matrices for Enhancing Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Delivery to Human Neural Stem Cells ». *Gene Therapy* 19 (3): 329-37. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.84>.
- Kim, Sung Wan. 2012. « In Vitro Transfection with Plasmid DNA Using Polylysine Copolymers ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2012 (4): 457-58. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot068627>.

- Kim, Tae Kyung, et James H. Eberwine. 2010. « Mammalian cell transfection: the present and the future ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (8): 3173-78. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>.
- Klein, R. M., E. D. Wolf, R. Wu, et J. C. Sanford. 1992. « High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids into Living Cells. 1987 ». *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 384-86.
- Kogure, Kentaro, Rumiko Moriguchi, Kentaro Sasaki, Masaharu Ueno, Shiroh Futaki, et Hideyoshi Harashima. 2004. « Development of a Non-Viral Multifunctional Envelope-Type Nano Device by a Novel Lipid Film Hydration Method ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 98 (2): 317-23. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.04.024>.
- Koivusalo, Mirikka, Christopher Welch, Hisayoshi Hayashi, Cameron C. Scott, Moshe Kim, Todd Alexander, Nicolas Touret, Klaus M. Hahn, et Sergio Grinstein. 2010. « Amiloride Inhibits Macropinocytosis by Lowering Submembranous PH and Preventing Rac1 and Cdc42 Signaling ». *Journal of Cell Biology* 188 (4): 547-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908086>.
- Kolangath, Sujit M., S. H. Basagoudanavar, M. Hosamani, P. Saravanan, et R. P. Tamil Selvan. 2014. « Baculovirus Mediated Transduction: Analysis of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Pseudotyping ». *Virusdisease* 25 (4): 441. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>.
- Köping-Höggård, M., I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, K. M. Vårum, et P. Artursson. 2001. « Chitosan as a Nonviral Gene Delivery System. Structure-Property Relationships and Characteristics Compared with Polyethylenimine in Vitro and after Lung Administration in Vivo ». *Gene Therapy* 8 (14): 1108-21. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301492>.
- Kovtun, Anna, R. Heumann, et Matthias Epple. 2009. « Calcium Phosphate Nanoparticles for the Transfection of Cells ». *Bio-Medical Materials and Engineering* 19 (2-3): 241-47. <https://doi.org/10.3233/BME-2009-0586>.
- Kristen, Arnt V, Senda Ajroud-Driss, Isabel Conceição, Peter Gorevic, Theodoros Kyriakides, et Laura Obici. 2018. « Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis ». *Neurodegenerative Disease Management* 9 (1): 5-23. <https://doi.org/10.2217/nmt-2018-0033>.
- Kuehnle, Adelheid R., et Manfred R. Kuehnle. 1996. Magnetophoretic particle delivery method and apparatus for the treatment of cells. 5516670, filed 7 octobre 1994, et issued 14 mai 1996. <http://www.freepatentsonline.com/5516670.html>.
- Künnapuu, Kadri, Kadi-Liis Veiman, Ly Porosk, Evelin Rammul, Kristina Kiisholts, Ülo Langel, et Kaido Kurrikoff. 2019. « Tumor Gene Therapy by Systemic Delivery of Plasmid DNA with Cell-Penetrating Peptides ». *FASEB BioAdvances* 1 (2): 105-14. <https://doi.org/10.1096/fba.1026>.
- Kurrikoff, Kaido, Kadi-Liis Veiman, Kadri Künnapuu, Elin Madli Peets, Tõnis Lehto, Ly Pärnaste, Piret Arukuusk, et Ülo Langel. 2017. « Effective in Vivo Gene Delivery with Reduced Toxicity, Achieved by Charge and Fatty Acid -Modified Cell Penetrating Peptide ». *Scientific Reports* 7 (1): 17056. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17316-y>.
- Kwon, E. J., J. M. Bergen, I. K. Park, et S. H. Pun. 2008. « Peptide-Modified Vectors for Nucleic Acid Delivery to Neurons ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 132 (3): 230-35. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.06.012>.
- Kwon, Ester J., Sylvie Liong, et Suzie H. Pun. 2010. « A Truncated HGP Peptide Sequence That Retains Endosomolytic Activity and Improves Gene Delivery Efficiencies ». *Molecular Pharmaceutics* 7 (4): 1260-65. <https://doi.org/10.1021/mp1000668>.

- Lam, A. P., et D. A. Dean. 2010. « Progress and Prospects: Nuclear Import of Nonviral Vectors ». *Gene Therapy* 17 (4): 439-47. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.31>.
- Lamaze, Christophe, Nicolas Tardif, Melissa Dewulf, Stéphane Vassilopoulos, et Cédric M. Blouin. 2017. « The Caveolae Dress Code: Structure and Signaling ». *Current Opinion in Cell Biology* 47: 117-25. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.014>.
- Lange, Allison, Ryan E. Mills, Christopher J. Lange, Murray Stewart, Scott E. Devine, et Anita H. Corbett. 2007. « Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin  $\alpha$  ». *The Journal of biological chemistry* 282 (8): 5101-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>.
- Laurentt, Nicolas, Cédric Sapet, Loic Le Gourrierec, Elodie Bertosio, et Olivier Zelphati. 2011. « Nucleic Acid Delivery Using Magnetic Nanoparticles: The Magnetofection Technology ». *Therapeutic Delivery* 2 (4): 471-82. <https://doi.org/10.4155/tde.11.12>.
- Lee, Cho-Hee, Dayananda Kasala, Youjin Na, Min Sang Lee, Sung Wan Kim, Ji Hoon Jeong, et Chae-Ok Yun. 2014. « Enhanced Therapeutic Efficacy of an Adenovirus-PEI-Bile-Acid Complex in Tumors with Low Coxsackie and Adenovirus Receptor Expression ». *Biomaterials* 35 (21): 5505-16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.060>.
- Lee, Eun Jung, Na Kyeong Lee, et In-San Kim. 2016. « Bioengineered Protein-Based Nanocage for Drug Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 106 (Pt A): 157-71. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.002>.
- Lee, Sigirim, Jung-Suk Kim, Hun Su Chu, Go-Woon Kim, Jong-In Won, et Jae-Hyung Jang. 2011. « Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Controlled Release of Adeno-Associated Viral Vectors ». *Acta Biomaterialia* 7 (11): 3868-76. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.035>.
- Lee, Woo-kyoung, Jong-yeun Park, Sangho Jung, Chul Woo Yang, Wan-Uk Kim, Ho-Youn Kim, Jae-Hun Park, et Jong-sang Park. 2005. « Preparation and Characterization of Biodegradable Nanoparticles Entrapping Immunodominant Peptide Conjugated with PEG for Oral Tolerance Induction ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 105 (1-2): 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.03.009>.
- Lentacker, I., I. De Cock, R. Deckers, S. C. De Smedt, et C. T. W. Moonen. 2014. « Understanding Ultrasound Induced Sonoporation: Definitions and Underlying Mechanisms ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 72 (juin): 49-64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.008>.
- Li, Jianrong, et Yu Zhang. 2012. « Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus ». *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*, novembre. <https://doi.org/10.5772/54598>.
- Li, Yang, et Nancy A Monteiro-Riviere. 2016. « Mechanisms of cell uptake, inflammatory potential and protein corona effects with gold nanoparticles ». *Nanomedicine* 11 (24): 3185-3203. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0303>.
- Liang, Wanling, et Jenny K. W. Lam. 2012. « Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems ». *Molecular Regulation of Endocytosis*, juillet. <https://doi.org/10.5772/46006>.
- Liao, Z., J. W. Roos, et J. E. Hildreth. 2000. « Increased Infectivity of HIV Type 1 Particles Bound to Cell Surface and Solid-Phase ICAM-1 and VCAM-1 through Acquired Adhesion Molecules LFA-1 and VLA-4 ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 16 (4): 355-66. <https://doi.org/10.1089/088922200309232>.
- Lim, Jet Phey, et Paul A. Gleeson. 2011. « Macropinocytosis: An Endocytic Pathway for Internalising Large Gulps ». *Immunology and Cell Biology* 89 (8): 836-43. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>.

- Lima, Túlio M., Matheus O. Souza, et Leda R. Castilho. 2019. « Purification of Flavivirus VLPs by a Two-Step Chromatographic Process ». *Vaccine, Vaccine Technology VII: Promises and achievements of the Decade of Vaccines*, 37 (47): 7061-69. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.066>.
- Lin, Paul, Diego Correa, Yuan Lin, et Arnold I. Caplan. 2011. « Polybrene Inhibits Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation during Lentiviral Transduction ». *PLOS ONE* 6 (8): e23891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023891>.
- Liu, S. H., M. S. Marks, et F. M. Brodsky. 1998. « A Dominant-Negative Clathrin Mutant Differentially Affects Trafficking of Molecules with Distinct Sorting Motifs in the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 140 (5): 1023-37. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.5.1023>.
- Liu, Yarong, Yun Fang, Yu Zhou, Ebrahim Zandi, Chi-Lin Lee, Kye-Il Joo, et Pin Wang. 2013. « Site-Specific Modification of Adeno-Associated Viruses via a Genetically Engineered Aldehyde Tag ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 9 (3): 421-29. <https://doi.org/10.1002/sml.201201661>.
- Loh, Xian Jun, Tung-Chun Lee, Qingqing Dou, et G. Roshan Deen. 2015. « Utilising Inorganic Nanocarriers for Gene Delivery ». *Biomaterials Science* 4 (1): 70-86. <https://doi.org/10.1039/C5BM00277J>.
- Lonez, Caroline, Michel Vandenbranden, et Jean-Marie Ruyschaert. 2012. « Cationic Lipids Activate Intracellular Signaling Pathways ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (15): 1749-58. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.009>.
- Lopez, Matilde, Elias Nelson Rodriguez, Yadira Lobaina, Alexis Musacchio, Viviana Falcon, Gerardo Guillen, et Julio C. Aguilar. 2017. « Characterization of the Size Distribution and Aggregation of Virus-like Nanoparticles Used as Active Ingredients of the HeberNasvac Therapeutic Vaccine against Chronic Hepatitis B ». *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2): 025009. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa5e1d>.
- Louis, N., C. Eveleigh, et F. L. Graham. 1997. « Cloning and Sequencing of the Cellular-Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line ». *Virology* 233 (2): 423-29. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8597>.
- Luby-Phelps, K. 2000. « Cytoarchitecture and Physical Properties of Cytoplasm: Volume, Viscosity, Diffusion, Intracellular Surface Area ». *International Review of Cytology* 192: 189-221. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60527-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60527-6).
- Ludtke, James J., Magdolna G. Sebestyén, et Jon A. Wolff. 2002. « The Effect of Cell Division on the Cellular Dynamics of Microinjected DNA and Dextran ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 5 (5 Pt 1): 579-88. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0581>.
- Lukacs, G. L., P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, et A. S. Verkman. 2000. « Size-Dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (3): 1625-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1625>.
- Luo, D., et W. M. Saltzman. 2000. « Synthetic DNA Delivery Systems ». *Nature Biotechnology* 18 (1): 33-37. <https://doi.org/10.1038/71889>.
- Luo, Ming. 2012. « Influenza Virus Entry ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 726: 201-21. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9).
- Lv, Hongtao, Shubiao Zhang, Bing Wang, Shaohui Cui, et Jie Yan. 2006. « Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of*

- the Controlled Release Society* 114 (1): 100-109.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.
- Madshus, Inger Helene, et Espen Stang. 2009. « Internalization and Intracellular Sorting of the EGF Receptor: A Model for Understanding the Mechanisms of Receptor Trafficking ». *Journal of Cell Science* 122 (19): 3433-39. <https://doi.org/10.1242/jcs.050260>.
- Maekawa, Masashi, Shimpei Terasaka, Yasuhiro Mochizuki, Katsuhisa Kawai, Yuka Ikeda, Nobukazu Araki, Edward Y. Skolnik, Tomohiko Taguchi, et Hiroyuki Arai. 2014. « Sequential Breakdown of 3-Phosphorylated Phosphoinositides Is Essential for the Completion of Macropinocytosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (11): E978-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311029111>.
- Maetzig, Tobias, Melanie Galla, Christopher Baum, et Axel Schambach. 2011. « Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application ». *Viruses* 3 (6): 677-713. <https://doi.org/10.3390/v3060677>.
- Mahato, Manohar, Giridhara R. Jayandharan, et Praveen Kumar Vemula. 2018. « Viral- and Non-Viral-Based Hybrid Vectors for Gene Therapy ». In *Gene and Cell Therapy: Biology and Applications*, édité par Giridhara R. Jayandharan, 111-30. Singapore: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0481-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0481-1_4).
- Malboeuf, Christine M., David A. L. Simon, Young-Eun Ellen Lee, Heather A. Lankes, Stephen Dewhurst, John G. Frelinger, et Robert C. Rose. 2007. « Human Papillomavirus-like Particles Mediate Functional Delivery of Plasmid DNA to Antigen Presenting Cells in Vivo ». *Vaccine* 25 (17): 3270-76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.067>.
- Malik, Dharendra Kumar, Sanjula Baboota, Alka Ahuja, Sohail Hasan, et Javed Ali. 2007. « Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery Systems ». *Current Drug Delivery* 4 (2): 141-51. <https://doi.org/10.2174/156720107780362339>.
- Manceur, Aziza P., Howard Kim, Vanja Mistic, Nadejda Andreev, July Dorion-Thibaudeau, Stéphane Lanthier, Alice Bernier, et al. 2017. « Scalable Lentiviral Vector Production Using Stable HEK293SF Producer Cell Lines ». *Human Gene Therapy Methods* 28 (6): 330-39. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.086>.
- Mangeot, Philippe-Emmanuel, Sandra Dollet, Mathilde Girard, Claire Ciancia, Stéphane Joly, Marc Peschanski, et Vincent Lotteau. 2011. « Protein Transfer into Human Cells by VSV-G-Induced Nanovesicles ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (9): 1656-66. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.138>.
- Mano, Miguel, Cristina Teodósio, Artur Paiva, Sérgio Simões, et Maria C. Pedroso de Lima. 2005. « On the Mechanisms of the Internalization of S4(13)-PV Cell-Penetrating Peptide ». *The Biochemical Journal* 390 (Pt 2): 603-12. <https://doi.org/10.1042/BJ20050577>.
- Mansouri, Sania, Patrick Lavigne, Karin Corsi, Mohamed Benderdour, Eric Beaumont, et Julio C. Fernandes. 2004. « Chitosan-DNA Nanoparticles as Non-Viral Vectors in Gene Therapy: Strategies to Improve Transfection Efficacy ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 57 (1): 1-8. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00155-3](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00155-3).
- Mao, Hai-Quan, Krishnendu Roy, Vu L. Truong-Le, Kevin A. Janes, Kevin Y. Lin, Yan Wang, J. Thomas August, et Kam W. Leong. 2001. « Chitosan-DNA Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency ». *Journal of Controlled Release* 70 (3): 399-421. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00361-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00361-8).
- Maréchal, Valérie, Marie-Christine Prevost, Caroline Petit, Emmanuelle Perret, Jean-Michel Heard, et Olivier Schwartz. 2001. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages

- Mediated by Macropinocytosis ». *Journal of Virology* 75 (22): 11166-77.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11166-11177.2001>.
- MarketsandMarkets. 2017. « Transfection Reagents and Equipment Market ». 2017.  
<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/transfection-reagents-equipment-market-139141146.html>.
- Marks, Bruno, Michael H. B. Stowell, Yvonne Vallis, Ian G. Mills, Adele Gibson, Colin R. Hopkins, et Harvey T. McMahon. 2001. « GTPase Activity of Dynamin and Resulting Conformation Change Are Essential for Endocytosis ». *Nature* 410 (6825): 231-35.  
<https://doi.org/10.1038/35065645>.
- Marsh, M., A. Pelchen-Matthews, et J. A. Hoxie. 1997. « Roles for Endocytosis in Lentiviral Replication ». *Trends in Cell Biology* 7 (1): 1-4. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)20038-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)20038-3).
- Martin, Claudia Sánchez-San, Tomás López, Carlos F. Arias, et Susana López. 2004. « Characterization of Rotavirus Cell Entry ». *Journal of Virology* 78 (5): 2310-18.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2310-2318.2004>.
- Martin, Molly E., et Kevin G. Rice. 2007. « Peptide-guided gene delivery ». *The AAPS Journal* 9 (1): E18-29. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901003>.
- Massignani, Marzia, Caterina LoPresti, Adam Blanz, Jeppe Madsen, Steven P. Armes, Andrew L. Lewis, et Giuseppe Battaglia. 2009. « Controlling Cellular Uptake by Surface Chemistry, Size, and Surface Topology at the Nanoscale ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 5 (21): 2424-32. <https://doi.org/10.1002/sml.200900578>.
- Massol, Ramiro H., Werner Boll, April M. Griffin, et Tomas Kirchhausen. 2006. « A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10265-70.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603369103>.
- Mastrobattista, Enrico, Marieke A. E. M. van der Aa, Wim E. Hennink, et Daan J. A. Crommelin. 2006. « Artificial Viruses: A Nanotechnological Approach to Gene Delivery ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (2): 115-21. <https://doi.org/10.1038/nrd1960>.
- Mastrobattista, Enrico, Gerben A. Koning, Louis van Bloois, Ana C. S. Filipe, Wim Jiskoot, et Gert Storm. 2002. « Functional Characterization of an Endosome-Disruptive Peptide and Its Application in Cytosolic Delivery of Immunoliposome-Entrapped Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27135-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200429200>.
- Maurisse, Rosalie, David De Semir, Hamid Emamekhoo, Babak Bedayat, Alireza Abdolmohammadi, Hooman Parsi, et Dieter C Gruenert. 2010. « Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages ». *BMC Biotechnology* 10 (février): 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-9>.
- Maxwell, Karen L., et Lori Frappier. 2007. « Viral Proteomics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 71 (2): 398-411. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-06>.
- Mayor, Satyajit, et Richard E. Pagano. 2007. « Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (8): 603-12. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>.
- Mb, Bally, Harvie P, Wong Fm, Kong S, Wasan Ek, et Reimer DI. 1999. « Biological Barriers to Cellular Delivery of Lipid-Based DNA Carriers. » *Advanced Drug Delivery Reviews* 38 (3): 291-315. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(99\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(99)00034-4).
- « MBInfo ». 2018a. MBInfo. 2018. <https://www.mechanobio.info/what-is-the-plasma-membrane/what-is-membrane-trafficking/>.



- . 2018b. « What Is the Plasma Membrane? » MBIInfo. 2018.  
<https://www.mechanobio.info/what-is-the-plasma-membrane/>.
- McKenzie, D. L., K. Y. Kwok, et K. G. Rice. 2000. « A Potent New Class of Reductively Activated Peptide Gene Delivery Agents ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (14): 9970-77.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9970>.
- McMahon, Harvey T., et Emmanuel Boucrot. 2011. « Molecular Mechanism and Physiological Functions of Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (8): 517-33. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>.
- Meacham, J. Mark, Kiranmai Durvasula, F. Levent Degertekin, et Andrei G. Fedorov. 2014. « Physical Methods for Intracellular Delivery: Practical Aspects from Laboratory Use to Industrial-Scale Processing ». *Journal of laboratory automation* 19 (1): 1-18.  
<https://doi.org/10.1177/2211068213494388>.
- Mead, Daniel G., Elmer W. Gray, Raymond Noblet, Molly D. Murphy, Elizabeth W. Howerth, et David E. Stallknecht. 2004. « Biological Transmission of Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Serotype) by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to Domestic Swine (*Sus scrofa*) ». *Journal of Medical Entomology* 41 (1): 78-82. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.1.78>.
- Medina-Kauwe, L. K. 2007. « “Alternative” Endocytic Mechanisms Exploited by Pathogens: New Avenues for Therapeutic Delivery? » *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (8): 798-809.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.009>.
- Megías, Javier, María Isabel Guillén, Victoria Clérigues, Ana I. Rojo, Antonio Cuadrado, Miguel Angel Castejón, Francisco Gomar, et María José Alcaraz. 2009. « Heme Oxygenase-1 Induction Modulates Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Expression and Prostaglandin E(2) Production in Osteoarthritic Chondrocytes ». *Biochemical Pharmacology* 77 (12): 1806-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.009>.
- Melzer, Michael Karl, Lisa Zeitlinger, Sabine Mall, Katja Steiger, Roland M. Schmid, Oliver Ebert, Angela Krackhardt, et Jennifer Altomonte. 2019. « Enhanced Safety and Efficacy of Oncolytic VSV Therapy by Combination with T Cell Receptor Transgenic T Cells as Carriers ». *Molecular Therapy - Oncolytics* 12 (mars): 26-40.  
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.12.001>.
- Mercer, Jason, et Ari Helenius. 2012. « Gulpin Rather than Sipping: Macropinocytosis as a Way of Virus Entry ». *Current Opinion in Microbiology* 15 (4): 490-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.016>.
- Mercer, Jason, Mario Schelhaas, et Ari Helenius. 2010. « Virus Entry by Endocytosis ». *Annual Review of Biochemistry* 79: 803-33. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>.
- Mesika, Adi, Vladimir Kiss, Vlad Brumfeld, Gourisankar Ghosh, et Ziv Reich. 2005. « Enhanced Intracellular Mobility and Nuclear Accumulation of DNA Plasmids Associated with a Karyophilic Protein ». *Human Gene Therapy* 16 (2): 200-208.  
<https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.200>.
- Miller, Aaron M., Felix M. Munkonge, Eric W. F. W. Alton, et David A. Dean. 2009. « Identification of Protein Cofactors Necessary for Sequence-Specific Plasmid DNA Nuclear Import ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (11): 1897-1903. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.127>.
- Mintzer, Meredith A., et Eric E. Simanek. 2009. « Nonviral Vectors for Gene Delivery ». *Chemical Reviews* 109 (2): 259-302. <https://doi.org/10.1021/cr800409e>.

- Morizono, Kouki, Nonia Pariente, Yiming Xie, et Irvin S. Y. Chen. 2009. « Redirecting lentiviral vectors by insertion of integrin-targeting peptides into envelope proteins ». *The Journal of gene medicine* 11 (7): 549-58. <https://doi.org/10.1002/jgm.1339>.
- Munkonge, Felix M., Vaksha Amin, Stephen C. Hyde, Anne-Marie Green, Ian A. Pringle, Deborah R. Gill, Joel W. S. Smith, et al. 2009. « Identification and Functional Characterization of Cytoplasmic Determinants of Plasmid DNA Nuclear Import ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (39): 26978-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.034850>.
- Murata, Masaharu, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Ryo Ugawa, et Makoto Hashizume. 2015. « Expression and Characterization of Myristoylated PreS1-Conjugated Nanocages for Targeted Cell Delivery ». *Protein Expression and Purification* 110 (juin): 52-56. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.12.001>.
- Mykhaylyk, Olga, Yolanda Sánchez Antequera, Dialekti Vlaskou, et Christian Plank. 2007. « Generation of Magnetic Nonviral Gene Transfer Agents and Magnetofection in Vitro ». *Nature Protocols* 2 (10): 2391-2411. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.352>.
- Naldini, L, U Blömer, F H Gage, D Trono, et I M Verma. 1996. « Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21): 11382-88.
- Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, et D. Trono. 1996. « In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5259): 263-67. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>.
- Neuberg, Patrick, et Antoine Kichler. 2014. « Recent Developments in Nucleic Acid Delivery with Polyethylenimines ». *Advances in Genetics* 88: 263-88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00009-2>.
- Nichols, Benjamin J. 2002. « A Distinct Class of Endosome Mediates Clathrin-Independent Endocytosis to the Golgi Complex ». *Nature Cell Biology* 4 (5): 374-78. <https://doi.org/10.1038/ncb787>.
- Nielsen, Søren U., Margaret F. Bassendine, Alastair D. Burt, Caroline Martin, Wanna Pumeechockchai, et Geoffrey L. Toms. 2006. « Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients ». *Journal of Virology* 80 (5): 2418-28. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2418-2428.2006>.
- Nikitin, Nikolai, Ekaterina Trifonova, Evgeniy Evtushenko, Mikhail Kirpichnikov, Joseph Atabekov, et Olga Karpova. 2015. « Comparative Study of Non-Enveloped Icosahedral Viruses Size ». *PLoS ONE* 10 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142415>.
- Nishi, Kenji, et Kaoru Saigo. 2007. « Cellular Internalization of Green Fluorescent Protein Fused with Herpes Simplex Virus Protein VP22 via a Lipid Raft-Mediated Endocytic Pathway Independent of Caveolae and Rho Family GTPases but Dependent on Dynamin and Arf6 ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 27503-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703810200>.
- Nonnenmacher, Mathieu, et Thomas Weber. 2011. « Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway ». *Cell host & microbe* 10 (6): 563-76. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.014>.
- O'Brien, John A., et Sarah CR Lummis. 2011. « Nano-biostics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles ». *BMC Biotechnology* 11 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-66>.

- Oh, Phil, Deirdre P. McIntosh, et Jan E. Schnitzer. 1998. « Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium ». *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 101-14.
- Okimoto, T., T. Friedmann, et A. Miyanojara. 2001. « VSV-G Envelope Glycoprotein Forms Complexes with Plasmid DNA and MLV Retrovirus-like Particles in Cell-Free Conditions and Enhances DNA Transfection ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 4 (3): 232-38. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0443>.
- Ott, David E. 2008. « Cellular Proteins Detected in HIV-1 ». *Reviews in Medical Virology* 18 (3): 159-75. <https://doi.org/10.1002/rmv.570>.
- Pack, Daniel W., Allan S. Hoffman, Suzie Pun, et Patrick S. Stayton. 2005. « Design and Development of Polymers for Gene Delivery ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 4 (7): 581-93. <https://doi.org/10.1038/nrd1775>.
- Pan, Zhenzhen, Xuejia Kang, Yuaner Zeng, Wenyuan Zhang, Huige Peng, Jinyu Wang, Wei Huang, Huiyuan Wang, Youqing Shen, et Yongzhuo Huang. 2017. « A Mannosylated PEI-CPP Hybrid for TRAIL Gene Targeting Delivery for Colorectal Cancer Therapy ». *Polymer Chemistry* 8 (35): 5275-85. <https://doi.org/10.1039/C7PY00882A>.
- Pang, Hong-Bo, Gary B. Braun, Tomas Friman, Pedro Aza-Blanc, Manuel E. Ruidiaz, Kazuki N. Sugahara, Tambet Teesalu, et Erkki Ruoslahti. 2014. « An Endocytosis Pathway Initiated through Neuropilin-1 and Regulated by Nutrient Availability ». *Nature Communications* 5 (octobre): 4904. <https://doi.org/10.1038/ncomms5904>.
- Parhiz, Hamideh, Wayne Thomas Shier, et Mohammad Ramezani. 2013. « From Rationally Designed Polymeric and Peptidic Systems to Sophisticated Gene Delivery Nano-Vectors ». *International Journal of Pharmaceutics* 457 (1): 237-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.014>.
- Park, Hongkwan, Pyung-Hwan Kim, Taewon Hwang, Oh-Joon Kwon, Tae-Joon Park, Sung-Wook Choi, Chae-Ok Yun, et Jung Hyun Kim. 2012. « Fabrication of Cross-Linked Alginate Beads Using Electrospraying for Adenovirus Delivery ». *International Journal of Pharmaceutics* 427 (2): 417-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.050>.
- Park, Ji-Ho, Geoffrey von Maltzahn, Lianglin Zhang, Michael P. Schwartz, Erkki Ruoslahti, Sangeeta N. Bhatia, et Michael J. Sailor. 2008. « Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging ». *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 20 (9): 1630-35. <https://doi.org/10.1002/adma.200800004>.
- Park, Yeonah, Eunah Kang, Oh-Joon Kwon, Taewon Hwang, Hongkwan Park, Jung Min Lee, Jung Hyun Kim, et Chae-Ok Yun. 2010. « Ionically Crosslinked Ad/Chitosan Nanocomplexes Processed by Electrospinning for Targeted Cancer Gene Therapy ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 148 (1): 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.027>.
- Park, Yeonah, Eunah Kang, Oh-Jun Kwon, Hong-Kwan Park, Jung Hyun Kim, et Chae-Ok Yun. 2010. « Tumor Targeted Adenovirus Nanocomplex Ionically Crosslinked by Chitosan ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 148 (1): e124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.094>.
- Parreno, Justin, Elizabeth Delve, Katarina Andrejevic, Sabrina Paez-Parent, Po-Han Wu, et Rita Kandel. 2016. « Efficient, Low-Cost Nucleofection of Passaged Chondrocytes ». *Cartilage* 7 (1): 82-91. <https://doi.org/10.1177/1947603515609399>.
- Parton, Robert G., et Kai Simons. 2007. « The Multiple Faces of Caveolae ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (3): 185-94. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>.

- Payne, Christine K., Sara A. Jones, Chen Chen, et Xiaowei Zhuang. 2007. « Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (4): 389-401. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00540.x>.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, et A. Helenius. 2001. « Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Reveals a New Two-Step Vesicular-Transport Pathway to the ER ». *Nature Cell Biology* 3 (5): 473-83. <https://doi.org/10.1038/35074539>.
- Peters, Reiner. 2006. « Introduction to Nucleocytoplasmic Transport: Molecules and Mechanisms ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 322: 235-58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-000-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-000-3_17).
- Pettit, Marie W., Peter Griffiths, Paolo Ferruti, et Simon C. W. Richardson. 2011. « Poly(Amidoamine) Polymers: Soluble Linear Amphiphilic Drug-Delivery Systems for Genes, Proteins and Oligonucleotides ». *Therapeutic Delivery* 2 (7): 907-17. <https://doi.org/10.4155/tde.11.55>.
- Pezzoli, Daniele, Anna Kajaste-Rudnitski, Roberto Chiesa, et Gabriele Candiani. 2013. « Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1025: 269-79. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3_21).
- Pfeifer, A., et I. M. Verma. 2001. « Gene Therapy: Promises and Problems ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2: 177-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.2.1.177>.
- Pham, Phuong Lan, Amine Kamen, et Yves Durocher. 2006. « Large-Scale Transfection of Mammalian Cells for the Fast Production of Recombinant Protein ». *Molecular Biotechnology* 34 (2): 225-37. <https://doi.org/10.1385/MB:34:2:225>.
- Piccini, Luana E., Viviana Castilla, et Elsa B. Damonte. 2015. « Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection ». *PLoS ONE* 10 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140824>.
- Pichon, Chantal, Ludvine Billiet, et Patrick Midoux. 2010. « Chemical Vectors for Gene Delivery: Uptake and Intracellular Trafficking ». *Current Opinion in Biotechnology* 21 (5): 640-45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.003>.
- Pisal, Dipak S., Matthew P. Kosloski, et Sathy V. Balu-Iyer. 2010. « DELIVERY OF THERAPEUTIC PROTEINS ». *Journal of pharmaceutical sciences* 99 (6): 2557-75. <https://doi.org/10.1002/jps.22054>.
- Plank, Christian, Martina Anton, Carsten Rudolph, Joseph Rosenecker, et Florian Krötz. 2003. « Enhancing and Targeting Nucleic Acid Delivery by Magnetic Force ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 3 (5): 745-58. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.5.745>.
- Plank, Christian, Olivier Zelphati, et Olga Mykhaylyk. 2011. « Magnetically Enhanced Nucleic Acid Delivery. Ten Years of Magnetofection-Progress and Prospects ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (14-15): 1300-1331. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002>.
- Plianwong, Samarwadee, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, et Theerasak Rojanarata. 2013. « Fast, Facile and Ethidium Bromide-Free Assay Based on the Use of Adsorption Indicator for the Estimation of Polyethylenimine to Nucleic Acid Ratio of Complete Polyplex Assembly for Gene Delivery ». *Talanta* 115 (octobre): 241-45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.073>.
- Potter, Huntington, et Richard Heller. 2003. « Transfection by Electroporation ». *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* CHAPTER (mai): Unit-9.3. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>.
- Prosen, Lara, Sara Prijic, Branka Music, Jaka Lavrencak, Maja Cemazar, et Gregor Sersa. 2013. « Magnetofection: A Reproducible Method for Gene Delivery to Melanoma Cells ». *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/209452>.

- Pucadyil, Thomas J., et Sandra L. Schmid. 2009. « Conserved Functions of Membrane Active GTPases in Coated Vesicle Formation ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945): 1217-20. <https://doi.org/10.1126/science.1171004>.
- Querido, Emmanuelle, Paola Blanchette, Qin Yan, Takumi Kamura, Megan Morrison, Dominique Boivin, William G. Kaelin, Ronald C. Conaway, Joan Weliky Conaway, et Philip E. Branton. 2001. « Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex ». *Genes & Development* 15 (23): 3104-17. <https://doi.org/10.1101/gad.926401>.
- Racoosin, E. L., et J. A. Swanson. 1993. « Macropinosome Maturation and Fusion with Tubular Lysosomes in Macrophages ». *The Journal of Cell Biology* 121 (5): 1011-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.1011>.
- Ramezani, Ali, et Robert G. Hawley. 2002. « Generation of HIV-1-based lentiviral vector particles. » *Current protocols in molecular biology*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1622s60>.
- Rappoport, Joshua Z. 2008. « Focusing on Clathrin-Mediated Endocytosis ». *The Biochemical Journal* 412 (3): 415-23. <https://doi.org/10.1042/BJ20080474>.
- Reif, J. S., P. A. Webb, T. P. Monath, J. K. Emerson, J. D. Poland, G. E. Kemp, et G. Cholas. 1987. « Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: Infection in Occupational Risk Groups ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36 (1): 177-82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.177>.
- Rejman, Joanna, Alessandra Bragonzi, et Massimo Conese. 2005. « Role of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis in Gene Transfer Mediated by Lipo- and Polyplexes ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 12 (3): 468-74. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.038>.
- Reyes-Reyes, E. Merit, Yun Teng, et Paula J. Bates. 2010. « A New Paradigm for Aptamer Therapeutic AS1411 Action: Uptake by Macropinocytosis and Its Stimulation by a Nucleolin-Dependent Mechanism ». *Cancer Research* 70 (21): 8617-29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0920>.
- Richard, Jean Philippe, Kamran Melikov, Hilary Brooks, Paul Prevot, Bernard Lebleu, et Leonid V. Chernomordik. 2005. « Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-Dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 15300-306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401604200>.
- Richardson, Simon C. W., Nicola G. Patrick, Y. K. Stella Man, Paolo Ferruti, et Ruth Duncan. 2001. « Poly(Amidoamine)s as Potential Nonviral Vectors: Ability to Form Interpolyelectrolyte Complexes and to Mediate Transfection in Vitro ». *Biomacromolecules* 2 (3): 1023-28. <https://doi.org/10.1021/bm010079f>.
- Robert, Marc-André, Parminder S. Chahal, Alexandre Audy, Amine Kamen, Rénaud Gilbert, et Bruno Gaillet. 2017. « Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viruses Using Mammalian Expression Platforms ». *Biotechnology Journal* 12 (3). <https://doi.org/10.1002/biot.201600193>.
- Robert, Marc-André, Viktoria Lytvyn, Francis Deforet, Rénaud Gilbert, et Bruno Gaillet. 2017. « Virus-Like Particles Derived from HIV-1 for Delivery of Nuclear Proteins: Improvement of Production and Activity by Protein Engineering ». *Molecular Biotechnology* 59 (1): 9-23. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9987-1>.
- Roberts, Lee K., Lori J. Barr, Deborah H. Fuller, Christopher W. McMahon, Philip T. Leese, et Suzanne Jones. 2005. « Clinical Safety and Efficacy of a Powdered Hepatitis B Nucleic Acid

- Vaccine Delivered to the Epidermis by a Commercial Prototype Device ». *Vaccine* 23 (40): 4867-78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.026>.
- Roche, S., A. A. V. Albertini, J. Lepault, S. Bressanelli, et Y. Gaudin. 2008. « Structures of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein: Membrane Fusion Revisited ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (11): 1716-28. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7534-3>.
- Roche, Stéphane, et Yves Gaudin. 2002. « Characterization of the Equilibrium between the Native and Fusion-Inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein Indicates That the Fusion Complex Is Made of Several Trimers ». *Virology* 297 (1): 128-35. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1429>.
- Roche, Stéphane, Félix A. Rey, Yves Gaudin, et Stéphane Bressanelli. 2007. « Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G ». *Science (New York, N.Y.)* 315 (5813): 843-48. <https://doi.org/10.1126/science.1135710>.
- Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, et J. Downward. 1994. « Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a Direct Target of Ras ». *Nature* 370 (6490): 527-32. <https://doi.org/10.1038/370527a0>.
- Rojek, Jillian M., Mar Perez, et Stefan Kunz. 2008. « Cellular Entry of Lymphocytic Choriomeningitis Virus ». *Journal of Virology* 82 (3): 1505-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01331-07>.
- Rols, M. P., D. Coulet, et J. Teissié. 1992. « Highly Efficient Transfection of Mammalian Cells by Electric Field Pulses. Application to Large Volumes of Cell Culture by Using a Flow System ». *European Journal of Biochemistry* 206 (1): 115-21. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16908.x>.
- Rols, Marie-Pierre. 2008. « Mechanism by Which Electroporation Mediates DNA Migration and Entry into Cells and Targeted Tissues ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 423: 19-33. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-194-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-194-9_2).
- Ryu, Byoung Y., Marguerite V. Evans-Galea, John T. Gray, David M. Bodine, Derek A. Persons, et Arthur W. Nienhuis. 2008. « An Experimental System for the Evaluation of Retroviral Vector Design to Diminish the Risk for Proto-Oncogene Activation ». *Blood* 111 (4): 1866-75. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-085506>.
- Sabharanjak, Shefali, Pranav Sharma, Robert G. Parton, et Satyajit Mayor. 2002. « GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct Cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytic Pathway ». *Developmental Cell* 2 (4): 411-23. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00145-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00145-4).
- Sahay, Gaurav, Elena V. Batrakova, et Alexander V. Kabanov. 2008. « Different Internalization Pathways of Polymeric Micelles and Unimers and Their Effects on Vesicular Transport ». *Bioconjugate Chemistry* 19 (10): 2023-29. <https://doi.org/10.1021/bc8002315>.
- Sahay, Gaurav, Jong Oh Kim, Alexander V. Kabanov, et Tatiana K. Bronich. 2010. « The Exploitation of Differential Endocytic Pathways in Normal and Tumor Cells in the Selective Targeting of Nanoparticulate Chemotherapeutic Agents ». *Biomaterials* 31 (5): 923-33. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.101>.
- Salman, Hanna, Asmahan Abu-Arish, Shachar Oliel, Avraham Loyter, Joseph Klafter, Rony Granek, et Michael Elbaum. 2005. « Nuclear Localization Signal Peptides Induce Molecular Delivery along Microtubules ». *Biophysical Journal* 89 (3): 2134-45. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.060160>.
- Salzman, Rachel, Francesca Cook, Timothy Hunt, Harry L. Malech, Philip Reilly, Betsy Foss-Campbell, et David Barrett. 2018. « Addressing the Value of Gene Therapy and Enhancing

- Patient Access to Transformative Treatments ». *Molecular Therapy* 26 (12): 2717-26. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.017>.
- Samal, Sangram Keshari, Mamoni Dash, Sandra Van Vlierberghe, David L. Kaplan, Emo Chiellini, Clemens van Blitterswijk, Lorenzo Moroni, et Peter Dubruel. 2012. « Cationic Polymers and Their Therapeutic Potential ». *Chemical Society Reviews* 41 (21): 7147-94. <https://doi.org/10.1039/c2cs35094g>.
- Sanders, Niek, Carsten Rudolph, Kevin Braeckmans, Stefaan C. De Smedt, et Joseph Demeester. 2009. « Extracellular Barriers in Respiratory Gene Therapy ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2): 115-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.011>.
- Santoro, M. Gabriella, Carla Amici, et Antonio Rossi. 2010. « Role of Heat Shock Proteins in Viral Infection ». In *Prokaryotic and Eukaryotic Heat Shock Proteins in Infectious Disease*, édité par A. Graham Pockley, Stuart K. Calderwood, et M. Gabriella Santoro, 51-84. Heat Shock Proteins. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2976-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2976-8_3).
- Schenborn, E. T., et V. Goiffon. 2000. « DEAE-Dextran Transfection of Mammalian Cultured Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 130: 147-53. <https://doi.org/10.1385/1-59259-686-x:147>.
- Schmid, Eva M., et Harvey T. McMahon. 2007. « Integrating Molecular and Network Biology to Decode Endocytosis ». *Nature* 448 (7156): 883-88. <https://doi.org/10.1038/nature06031>.
- Schoen, P., A. Chonn, P. R. Cullis, J. Wilschut, et P. Scherrer. 1999. « Gene Transfer Mediated by Fusion Protein Hemagglutinin Reconstituted in Cationic Lipid Vesicles ». *Gene Therapy* 6 (5): 823-32. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300919>.
- Schott, Juliane W., Melanie Galla, Tamaryin Godinho, Christopher Baum, et Axel Schambach. 2011. « Viral and Non-Viral Approaches for Transient Delivery of mRNA and Proteins ». *Current Gene Therapy* 11 (5): 382-98. <https://doi.org/10.2174/156652311797415872>.
- Segura, María de las Mercedes, Alain Garnier, et Amine Kamen. 2006. « Purification and Characterization of Retrovirus Vector Particles by Rate Zonal Ultracentrifugation ». *Journal of Virological Methods* 133 (1): 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.030>.
- Segura, María Mercedes, Alain Garnier, Marcos Rafael Di Falco, Gavin Whissell, Angélica Meneses-Acosta, Normand Arcand, et Amine Kamen. 2008. « Identification of Host Proteins Associated with Retroviral Vector Particles by Proteomic Analysis of Highly Purified Vector Preparations ». *Journal of Virology* 82 (3): 1107-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01909-07>.
- Segura, María Mercedes, Amine A. Kamen, et Alain Garnier. 2011. « Overview of Current Scalable Methods for Purification of Viral Vectors ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 737: 89-116. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_4).
- Segura, María Mercedes, Mathias Mangion, Bruno Gaillet, et A. Garnier. 2013. « New developments in lentiviral vector design, production and purification ». *Expert opinion on biological therapy*. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.779249>.
- Sessa, Maria, Laura Lorioli, Francesca Fumagalli, Serena Acquati, Daniela Redaelli, Cristina Baldoli, Sabrina Canale, et al. 2016. « Lentiviral Haemopoietic Stem-Cell Gene Therapy in Early-Onset Metachromatic Leukodystrophy: An Ad-Hoc Analysis of a Non-Randomised, Open-Label, Phase 1/2 Trial ». *Lancet (London, England)* 388 (10043): 476-87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30374-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30374-9).
- Sharp, Paul M. 2002. « Origins of Human Virus Diversity ». *Cell* 108 (3): 305-12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00639-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00639-6).

- Sheehy, Ann M., Nathan C. Gaddis, Jonathan D. Choi, et Michael H. Malim. 2002. « Isolation of a Human Gene That Inhibits HIV-1 Infection and Is Suppressed by the Viral Vif Protein ». *Nature* 418 (6898): 646-50. <https://doi.org/10.1038/nature00939>.
- Shen, Chao, Meijia Gu, Ci Song, Lixia Miao, Liu Hu, Dan Liang, et Congyi Zheng. 2008. « The Tumorigenicity Diversification in Human Embryonic Kidney 293 Cell Line Cultured in Vitro ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 36 (4): 263-68. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.02.002>.
- Shi, Junfeng, Yifan Ma, Jing Zhu, Yuanxin Chen, Yating Sun, Yicheng Yao, Zhaogang Yang, et Jing Xie. 2018. « A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery ». *Molecules* 23 (11). <https://doi.org/10.3390/molecules23113044>.
- Shin, Seungjin, et Lonnie D. Shea. 2010. « Lentivirus Immobilization to Nanoparticles for Enhanced and Localized Delivery from Hydrogels ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (4): 700-706. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.300>.
- Shirley, Jamie L., Ype P. de Jong, Cox Terhorst, et Roland W. Herzog. 2020. « Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors ». *Molecular Therapy* 28 (3): 709-22. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>.
- Shoji, Jun'ichi, Yuko Tanihara, Tsuneo Uchiyama, et Akihiko Kawai. 2004. « Preparation of Virosomes Coated with the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein as Efficient Gene Transfer Vehicles for Animal Cells ». *Microbiology and Immunology* 48 (3): 163-74. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03502.x>.
- Simões, Sérgio, Ana Filipe, Henrique Faneca, Miguel Mano, Nuno Penacho, Nejat Düzgünes, et Maria Pedroso de Lima. 2005. « Cationic Liposomes for Gene Delivery ». *Expert Opinion on Drug Delivery* 2 (2): 237-54. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.237>.
- Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, et M. P. Lisanti. 1999. « Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (11): 7289-7304. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7289>.
- Sokol, Martin, Matthias Wabl, Irene Rius Ruiz, et Finn Skou Pedersen. 2014. « Novel Principles of Gamma-Retroviral Insertional Transcription Activation in Murine Leukemia Virus-Induced End-Stage Tumors ». *Retrovirology* 11 (mai): 36. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-36>.
- Sokolova, Viktoriya, Anna Kovtun, Rolf Heumann, et Matthias Epple. 2007. « Tracking the Pathway of Calcium Phosphate/DNA Nanoparticles during Cell Transfection by Incorporation of Red-Fluorescing Tetramethylrhodamine Isothiocyanate-Bovine Serum Albumin into These Nanoparticles ». *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 12 (2): 174-79. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0177-7>.
- Soman, Pranav, Wande Zhang, Aiko Umeda, Zhiwen Jonathan Zhang, et Shaochen Chen. 2011. « Femtosecond Laser-Assisted Optoporation for Drug and Gene Delivery into Single Mammalian Cells ». *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7 (3): 334-41. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1295>.
- Somiya, Masaharu, Qiushi Liu, et Shun'ichi Kuroda. 2017. « Current Progress of Virus-Mimicking Nanocarriers for Drug Delivery ». *Nanotheranostics* 1 (4): 415-29. <https://doi.org/10.7150/ntno.21723>.
- Sonawane, N. D., Francis C. Szoka, et A. S. Verkman. 2003. « Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44826-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308643200>.
- Song, Jae-Min, Chi-Won Choi, Sang-Oh Kwon, Richard. W. Compans, Sang-Moo Kang, et Seung Il Kim. 2011. « Proteomic Characterization of Influenza H5N1 virus-like particles and their



- protective immunogenicity ». *Journal of proteome research* 10 (8): 3450-59.  
<https://doi.org/10.1021/pr200086v>.
- Spear, Patricia G. 2004. « Herpes Simplex Virus: Receptors and Ligands for Cell Entry ». *Cellular Microbiology* 6 (5): 401-10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x>.
- Staecker, Hinrich, Galina Jokovic, Sergey Karpishchenko, Andrea Kienle-Gogolok, Andrzej Krzyzaniak, Chia-Der Lin, Pavel Navratil, Ventzislav Tzvetkov, Nida Wright, et Thomas Meyer. 2019. « Efficacy and Safety of AM-111 in the Treatment of Acute Unilateral Sudden Deafness—A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Phase 3 Study ». *Otology & Neurotology* 40 (5): 584-94. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002229>.
- Staring, Jacqueline, Matthijs Raaben, et Thijn R. Brummelkamp. 2018. « Viral Escape from Endosomes and Host Detection at a Glance ». *Journal of Cell Science* 131 (15).  
<https://doi.org/10.1242/jcs.216259>.
- Stayton, P. S., A. S. Hoffman, N. Murthy, C. Lackey, C. Cheung, P. Tan, L. A. Klumb, A. Chilkoti, F. S. Wilbur, et O. W. Press. 2000. « Molecular Engineering of Proteins and Polymers for Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutics ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 65 (1-2): 203-20. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00236-9](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00236-9).
- Stepanenko, A. A., et V. V. Dmitrenko. 2015. « HEK293 in Cell Biology and Cancer Research: Phenotype, Karyotype, Tumorigenicity, and Stress-Induced Genome-Phenotype Evolution ». *Gene* 569 (2): 182-90. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>.
- Stevenson, D., B. Agate, X. Tsampoula, P. Fischer, C. T. A. Brown, W. Sibbett, A. Riches, F. Gunn-Moore, et K. Dholakia. 2006. « Femtosecond Optical Transfection of Cells: Viability and Efficiency ». *Optics Express* 14 (16): 7125-33. <https://doi.org/10.1364/oe.14.007125>.
- Stevenson, David J., Frank J. Gunn-Moore, Paul Campbell, et Kishan Dholakia. 2010. « Single Cell Optical Transfection ». *Journal of the Royal Society, Interface* 7 (47): 863-71.  
<https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0463>.
- Subramanian, Ravi P., et Robert J. Geraghty. 2007. « Herpes Simplex Virus Type 1 Mediates Fusion through a Hemifusion Intermediate by Sequential Activity of Glycoproteins D, H, L, and B ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8): 2903-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608374104>.
- Subramanian, Shyamsundar, et Friedrich Srenc. 1996. « Quantitative Analysis of Transient Gene Expression in Mammalian Cells Using the Green Fluorescent Protein ». *Journal of Biotechnology* 49 (1-3): 137-51. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01536-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01536-2).
- Suerth, Julia D., Verena Labenski, et Axel Schambach. 2014. « Alpharetroviral Vectors: From a Cancer-Causing Agent to a Useful Tool for Human Gene Therapy ». *Viruses* 6 (12): 4811-38.  
<https://doi.org/10.3390/v6124811>.
- Sukharev, S. I., V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, et null Chizmadzhev YuA. 1992. « Electroporation and Electrophoretic DNA Transfer into Cells. The Effect of DNA Interaction with Electropores ». *Biophysical Journal* 63 (5): 1320-27. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81709-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81709-5).
- Sun, Xiangjie, Shoshannah L Roth, Michele A Bialecki, et Gary R Whittaker. 2010. « Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses ». *Future virology* 5 (1): 85-96. <https://doi.org/10.2217/FVL.09.72>.
- Swanson, J. A., et C. Watts. 1995. « Macropinocytosis ». *Trends in Cell Biology* 5 (11): 424-28.  
[https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)89101-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)89101-1).

- Swanson, Joel A. 2008. « Shaping Cups into Phagosomes and Macropinosomes ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (8): 639-49. <https://doi.org/10.1038/nrm2447>.
- Swanson, Joel A., et Jason S. King. 2019. « The breadth of macropinocytosis research ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1765). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0146>.
- Tachibana, K., T. Uchida, K. Ogawa, N. Yamashita, et K. Tamura. 1999. « Induction of Cell-Membrane Porosity by Ultrasound ». *Lancet (London, England)* 353 (9162): 1409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01244-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01244-1).
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takei, K., et V. Haucke. 2001. « Clathrin-Mediated Endocytosis: Membrane Factors Pull the Trigger ». *Trends in Cell Biology* 11 (9): 385-91. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02082-7](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02082-7).
- Teo, Pei Yun, Chuan Yang, James L. Hedrick, Amanda C. Engler, Daniel J. Coady, Sadaf Ghaem-Maghani, Andrew J. T. George, et Yi Yan Yang. 2013. « Hydrophobic Modification of Low Molecular Weight Polyethylenimine for Improved Gene Transfection ». *Biomaterials* 34 (32): 7971-79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.005>.
- Thibault, Marc, Surendra Nimesh, Marc Lavertu, et Michael D Buschmann. 2010. « Intracellular Trafficking and Decondensation Kinetics of Chitosan–pDNA Polyplexes ». *Molecular Therapy* 18 (10): 1787-95. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.143>.
- Tooze, Sharon A., Adi Abada, et Zvulun Elazar. 2014. « Endocytosis and Autophagy: Exploitation or Cooperation? ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018358>.
- Torchilin, V. P., R. Rammohan, V. Weissig, et T. S. Levchenko. 2001. « TAT Peptide on the Surface of Liposomes Affords Their Efficient Intracellular Delivery Even at Low Temperature and in the Presence of Metabolic Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15): 8786-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.151247498>.
- Traub, Linton M. 2009. « Tickets to Ride: Selecting Cargo for Clathrin-Regulated Internalization ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (9): 583-96. <https://doi.org/10.1038/nrm2751>.
- Tripathi, Prem Prakash, Hamed Arami, Ivneet Banga, Jalaj Gupta, et Sonu Gandhi. 2018. « Cell penetrating peptides in preclinical and clinical cancer diagnosis and therapy ». *Oncotarget* 9 (98): 37252-67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26442>.
- Tsai, Billy. 2007. « Penetration of Nonenveloped Viruses into the Cytoplasm ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 23-43. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123454>.
- Tsai, Chun, Vaughn Smider, Byung Joon Hwang, et Gilbert Chu. 2012. « Electrophoretic Mobility Shift Assays for Protein–DNA Complexes Involved in DNA Repair ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 920: 53-78. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_5).
- Tseng, W. C., F. R. Haselton, et T. D. Giorgio. 1997. « Transfection by Cationic Liposomes Using Simultaneous Single Cell Measurements of Plasmid Delivery and Transgene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25641-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25641>.
- Tsong, T Y. 1991. « Electroporation of cell membranes. ». *Biophysical Journal* 60 (2): 297-306.

- Tsukakoshi, M., S. Kurata, Y. Nomiya, Y. Ikawa, et T. Kasuya. 1984. « A Novel Method of DNA Transfection by Laser Microbeam Cell Surgery ». *Applied Physics B* 35 (3): 135-40. <https://doi.org/10.1007/BF00697702>.
- Uchida, Masaki, Xiong Wei Li, Peter Mertens, et H. Oya Alpar. 2009. « Transfection by Particle Bombardment: Delivery of Plasmid DNA into Mammalian Cells Using Gene Gun ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (8): 754-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.013>.
- Uchida, Masaki, Hideshi Natsume, Daisuke Kobayashi, Kenji Sugibayashi, et Yasunori Morimoto. 2002. « Effects of Particle Size, Helium Gas Pressure and Microparticle Dose on the Plasma Concentration of Indomethacin after Bombardment of Indomethacin-Loaded Poly-L-Lactic Acid Microspheres Using a Helios Gun System ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25 (5): 690-93. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.690>.
- Uchida, Naoya, Rashidah Green, Josiah Ballantine, Luke P. Skala, Matthew M. Hsieh, et John F. Tisdale. 2016. « Kinetics of lentiviral vector transduction in human CD34+ cells ». *Experimental hematology* 44 (2): 106-15. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.003>.
- Uchida, T., J. Kim, M. Yamaizumi, Y. Miyake, et Y. Okada. 1979. « Reconstitution of Lipid Vesicles Associated with HVJ (Sendai Virus) Sikes. Purification and Some Properties of Vesicles Containing Nontoxic Fragment A of Diphtheria Toxin ». *The Journal of Cell Biology* 80 (1): 10-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.80.1.10>.
- Ui, M., M. Takada, T. Arai, K. Matsumoto, K. Yamada, T. Nakahata, T. Nishiwaki, et al. 1999. « Retrovirus Vectors Designed for Efficient Transduction of Cytotoxic or Cytostatic Genes ». *Gene Therapy* 6 (10): 1670-78. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301009>.
- Van Dyke, R. W. 1996. « Acidification of Lysosomes and Endosomes ». *Sub-Cellular Biochemistry* 27: 331-60. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5833-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5833-0_10).
- Vanden Broeck, Davy, et Marc J. S. De Wolf. 2006. « Selective Blocking of Clathrin-Mediated Endocytosis by RNA Interference: Epsin as Target Protein ». *BioTechniques* 41 (4): 475-84. <https://doi.org/10.2144/000112265>.
- Vaughan, Erin E., James V. DeGiulio, et David A. Dean. 2006. « Intracellular Trafficking of Plasmids for Gene Therapy: Mechanisms of Cytoplasmic Movement and Nuclear Import ». *Current gene therapy* 6 (6): 671-81.
- Venereo-Sánchez, Alina, Kelly Fulton, Krisztina Koczka, Susan Twine, Parminder Chahal, Sven Ansoerge, Rénaud Gilbert, Olivier Henry, et Amine Kamen. 2019. « Characterization of Influenza H1N1 Gag Virus-like Particles and Extracellular Vesicles Co-Produced in HEK-293SF ». *Vaccine, Vaccine Technology VII: Promises and achievements of the Decade of Vaccines*, 37 (47): 7100-7107. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.057>.
- Venkataraman, Anand, Daniel J. Nevriy, Theresa M. Filtz, et Mark Leid. 2012. « Grp1-ASSOCIATED SCAFFOLD PROTEIN (GRASP) IS A REGULATOR OF THE ADP RIBOSYLATION FACTOR 6 (ARF6)-DEPENDENT MEMBRANE TRAFFICKING PATHWAY ». *Cell biology international* 36 (12): 1115-28. <https://doi.org/10.1042/CBI20120221>.
- Venkataraman, Shrinivas, James L. Hedrick, Zhan Yuin Ong, Chuan Yang, Pui Lai Rachel Ee, Paula T. Hammond, et Yi Yan Yang. 2011. « The Effects of Polymeric Nanostructure Shape on Drug Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Hybrid nanostructures for diagnostics and therapeutics, 63 (14): 1228-46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.016>.
- Vercauteren, Dries, Martin Piest, Leonardus J. van der Aa, Monerah Al Soraj, Arwyn T. Jones, Johan F. J. Engbersen, Stefaan C. De Smedt, et Kevin Braeckmans. 2011. « Flotillin-Dependent

- Endocytosis and a Phagocytosis-like Mechanism for Cellular Internalization of Disulfide-Based Poly(Amido Amine)/DNA Polyplexes ». *Biomaterials* 32 (11): 3072-84. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.045>.
- Vercauteren, Dries, Roosmarijn Vandenbroucke, Arwyn T. Jones, Joanna Rejman, Jo Demeester, Stefaan De Smedt, Niek Sanders, et Kevin Braeckmans. 2010. « The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls ». *MOLECULAR THERAPY* 18 (3): 561-69. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.281>.
- Vicennati, Paola, Antonella Giuliano, Giancarlo Ortaggi, et Andrea Masotti. 2008. « Polyethylenimine in Medicinal Chemistry ». *Current Medicinal Chemistry* 15 (27): 2826-39. <https://doi.org/10.2174/092986708786242778>.
- Vicente, Tiago, António Roldão, Cristina Peixoto, Manuel J. T. Carrondo, et Paula M. Alves. 2011. « Large-Scale Production and Purification of VLP-Based Vaccines ». *Journal of Invertebrate Pathology* 107 Suppl (juillet): S42-48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.004>.
- Wadhwa, Manpreet S., Wendy T. Collard, Roger C. Adami, Donald L. McKenzie, et Kevin G. Rice. 1997. « Peptide-Mediated Gene Delivery: Influence of Peptide Structure on Gene Expression ». *Bioconjugate Chemistry* 8 (1): 81-88. <https://doi.org/10.1021/bc960079q>.
- Wadia, Jehangir S., Radu V. Stan, et Steven F. Dowdy. 2004. « Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape of TAT-Fusion Proteins after Lipid Raft Macropinocytosis ». *Nature Medicine* 10 (3): 310-15. <https://doi.org/10.1038/nm996>.
- Wagner, E., C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, et M. L. Birnstiel. 1992. « Influenza Virus Hemagglutinin HA-2 N-Terminal Fusogenic Peptides Augment Gene Transfer by Transferrin-Polylysine-DNA Complexes: Toward a Synthetic Virus-like Gene-Transfer Vehicle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (17): 7934-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.7934>.
- Waleed, Muhammad, Sun-Uk Hwang, Jung-Dae Kim, Irfan Shabbir, Sang-Mo Shin, et Yong-Gu Lee. 2013. « Single-Cell Optoporation and Transfection Using Femtosecond Laser and Optical Tweezers ». *Biomedical Optics Express* 4 (9): 1533-47. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001533>.
- Wang, Bingqing, Chunbai He, Cui Tang, et Chunhua Yin. 2011. « Effects of Hydrophobic and Hydrophilic Modifications on Gene Delivery of Amphiphilic Chitosan Based Nanocarriers ». *Biomaterials* 32 (20): 4630-38. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.003>.
- Wang, Feng, Travis Zuroske, et Jonathan K. Watts. 2020. « RNA Therapeutics on the Rise ». *Nature Reviews Drug Discovery* 19 (7): 441-42. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00078-0>.
- Wang, Jin, James D. Byrne, Mary E. Napier, et Joseph M. DeSimone. 2011. « More Effective Nanomedicines through Particle Design ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 7 (14): 1919-31. <https://doi.org/10.1002/sml.201100442>.
- Wang, L. H., K. G. Rothberg, et R. G. Anderson. 1993. « Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation. » *Journal of Cell Biology* 123 (5): 1107-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.5.1107>.
- Wang, Mingxing, Bo Wu, Peijuan Lu, Caryn Cloer, Jay D Tucker, et Qilong Lu. 2013. « Polyethylenimine-modified Pluronic (PCMs) Improve Morpholino Oligomer Delivery in Cell Culture and Dystrophic mdx Mice ». *Molecular Therapy* 21 (1): 210-16. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.236>.
- Wang, Zhenjia, Chinnaswamy Tirupathi, Richard D. Minshall, et Asrar B. Malik. 2009. « Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells ». *ACS Nano* 3 (12): 4110-16. <https://doi.org/10.1021/nn9012274>.

- Wang, Zhijun, Zhenghong Yuan, et Li Jin. 2008. « Gene Delivery into Hepatocytes with the PreS/Liposome/DNA System ». *Biotechnology Journal* 3 (9-10): 1286-95. <https://doi.org/10.1002/biot.200800125>.
- Watarai, Masahisa, Sou-Ichi Makino, Yoshio Fujii, Keinosuke Okamoto, et Toshikazu Shirahata. 2002. « Modulation of Brucella-Induced Macropinocytosis by Lipid Rafts Mediates Intracellular Replication ». *Cellular Microbiology* 4 (6): 341-55. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00195.x>.
- Weiner, Allon, Nora Mellouk, Noelia Lopez-Montero, Yuen-Yan Chang, Célia Souque, Christine Schmitt, et Jost Enninga. 2016. « Macropinosomes Are Key Players in Early Shigella Invasion and Vacuolar Escape in Epithelial Cells ». *PLOS Pathogens* 12 (5): e1005602. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005602>.
- White, Judith M., et Gary R. Whittaker. 2016. « Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (6): 593-614. <https://doi.org/10.1111/tra.12389>.
- Wiethoff, Christopher M., Harald Wodrich, Larry Gerace, et Glen R. Nemerow. 2005. « Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption Following Capsid Disassembly ». *Journal of Virology* 79 (4): 1992-2000. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005>.
- Wiley. 2019. « Liposome Clinical Trial ». *The Journal of Gene Medicine*. 2019.
- Wirth, Matthias, Petra Fritsche, Natasa Stojanovic, Martina Brandl, Stephanie Jaeckel, Roland M. Schmid, Dieter Saur, et Günter Schneider. 2011. « A Simple and Cost-Effective Method to Transfect Small Interfering RNAs into Pancreatic Cancer Cell Lines Using Polyethylenimine ». *Pancreas* 40 (1): 144-50. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181f7e41c>.
- Woods, Niels-Bjarne, Arne Muessig, Manfred Schmidt, Johan Flygare, Karin Olsson, Patrick Salmon, Didier Trono, Christof von Kalle, et Stefan Karlsson. 2003. « Lentiviral Vector Transduction of NOD/SCID Repopulating Cells Results in Multiple Vector Integrations per Transduced Cell: Risk of Insertional Mutagenesis ». *Blood* 101 (4): 1284-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2238>.
- Wright, J. Fraser. 2009. « Transient Transfection Methods for Clinical Adeno-Associated Viral Vector Production ». *Human Gene Therapy* 20 (7): 698-706. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.064>.
- Wu, Chia-Ying, Yi-Wen Lin, Chia-Ho Kuo, Wan-Hsin Liu, Hsiu-Fen Tai, Chien-Hung Pan, Yung-Tsung Chen, et al. 2015. « Inactivated Enterovirus 71 Vaccine Produced by 200-L Scale Serum-Free Microcarrier Bioreactor System Provides Cross-Protective Efficacy in Human SCARB2 Transgenic Mouse ». *PLOS ONE* 10 (8): e0136420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136420>.
- Wu, Chia-Ying, Yi-Chun Yeh, Yu-Chih Yang, Ching Chou, Ming-Tsan Liu, Ho-Sheng Wu, Jia-Tsong Chan, et Pei-Wen Hsiao. 2010. « Mammalian Expression of Virus-like Particles for Advanced Mimicry of Authentic Influenza Virus ». *PLoS One* 5 (3): e9784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009784>.
- Wu, Yun, Yi-Ping Ho, Yicheng Mao, Xinmei Wang, Bo Yu, Kam W. Leong, et L. James Lee. 2011a. « Uptake and Intracellular Fate of Multifunctional Nanoparticles: A Comparison between Lipoplexes and Polyplexes via Quantum Dot Mediated Förster Resonance Energy Transfer ». *Molecular Pharmaceutics* 8 (5): 1662-68. <https://doi.org/10.1021/mp100466m>.
- . 2011b. « Uptake and intracellular fate of multifunctional nanoparticles: a comparison between lipoplexes and polyplexes via quantum dots-FRET ». *Molecular pharmaceutics* 8 (5): 1662-68. <https://doi.org/10.1021/mp100466m>.
- Wurm, Florian M. 2004. « Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells ». *Nature Biotechnology* 22 (11): 1393-98. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>.

- Xiang, Shengnan, et Xiaoling Zhang. 2013. « Cellular Uptake Mechanism of Non-Viral Gene Delivery and Means for Improving Transfection Efficiency ». *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, février. <https://doi.org/10.5772/53353>.
- Xiang, Sue D., Anja Scholzen, Gabriela Minigo, Cassandra David, Vasso Apostolopoulos, Patricia L. Mottram, et Magdalena Plebanski. 2006. « Pathogen Recognition and Development of Particulate Vaccines: Does Size Matter? » *Methods (San Diego, Calif.)* 40 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.016>.
- Xie, Jing, Ye Bi, Huan Zhang, Shiyan Dong, Lesheng Teng, Robert J. Lee, et Zhaogang Yang. 2020. « Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application ». *Frontiers in Pharmacology* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00697>.
- Yang, Lin, Thad A. Harroun, Thomas M. Weiss, Lai Ding, et Huey W. Huang. 2001. « Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores ». *Biophysical Journal* 81 (3): 1475-85. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X).
- Yao, C. P., Z. X. Zhang, R. Rahmzadeh, et G. Huettmann. 2008. « Laser-Based Gene Transfection and Gene Therapy ». *IEEE Transactions on Nanobioscience* 7 (2): 111-19. <https://doi.org/10.1109/TNB.2008.2000742>.
- Yates, F., et G. Q. Daley. 2006. « Progress and Prospects: Gene Transfer into Embryonic Stem Cells ». *Gene Therapy* 13 (20): 1431-39. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302854>.
- Yoshizawa, Jyoji, Xiano-Kand Li, Masayuki Fujino, Hiromitsu Kimura, Ryoji Mizuno, Akihiko Hara, Syuichi Ashizuka, et al. 2004. « Successful in Utero Gene Transfer Using a Gene Gun in Midgestational Mouse Fetuses ». *Journal of Pediatric Surgery* 39 (1): 81-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2003.09.001>.
- Young, Jennifer L., Warren E. Zimmer, et David A. Dean. 2008. « Smooth Muscle-Specific Gene Delivery in the Vasculature Based on Restriction of DNA Nuclear Import ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 233 (7): 840-48. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-331>.
- Yu, Jinsui, Zhiyi Chen, et Fei Yan. 2019. « Advances in Mechanism Studies on Ultrasonic Gene Delivery at Cellular Level ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 142: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.012>.
- Yuan, Xiaoling, Bing Qin, Hang Yin, Yingying Shi, Mengshi Jiang, Lihua Luo, Zhenyu Luo, et al. 2020. « Virus-like Nonvirus Cationic Liposome for Efficient Gene Delivery via Endoplasmic Reticulum Pathway ». *ACS Central Science* 6 (2): 174-88. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01052>.
- Zauner, Wolfgang, Manfred Ogris, et Ernst Wagner. 1998. « Polylysine-Based Transfection Systems Utilizing Receptor-Mediated Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Non-viral Gene Delivery Systems*, 30 (1): 97-113. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00110-5).
- Zeskind, Benjamin J., Caroline D. Jordan, Winston Timp, Linda Trapani, Guichy Waller, Victor Horodincu, Daniel J. Ehrlich, et Paul Matsudaira. 2007. « Nucleic Acid and Protein Mass Mapping by Live-Cell Deep-Ultraviolet Microscopy ». *Nature Methods* 4 (7): 567-69. <https://doi.org/10.1038/nmeth1053>.
- Zhang, Leshuai W., et Nancy A. Monteiro-Riviere. 2009. « Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 110 (1): 138-55. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp087>.

- Zhang, Yan, et Long-Chuan Yu. 2008a. « Single-Cell Microinjection Technology in Cell Biology ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 30 (6): 606-10. <https://doi.org/10.1002/bies.20759>.
- . 2008b. « Microinjection as a Tool of Mechanical Delivery ». *Current Opinion in Biotechnology* 19 (5): 506-10. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.005>.
- Zhao, Nianxi, Jianjun Qi, Zihua Zeng, Parag Parekh, Chung-Che Chang, Ching-Hsuan Tung, et Youli Zu. 2012. « Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex ». *Journal of Controlled Release* 159 (1): 104-10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.007>.
- Zhi, Defu, Shubiao Zhang, Bing Wang, Yinan Zhao, Baoling Yang, et Shijun Yu. 2010. « Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery ». *Bioconjugate Chemistry* 21 (4): 563-77. <https://doi.org/10.1021/bc900393r>.
- Zhitnyuk, Yulia, Peter Gee, Mandy S. Y. Lung, Noriko Sasakawa, Huaigeng Xu, Hirohide Saito, et Akitsu Hotta. 2018. « Efficient mRNA Delivery System Utilizing Chimeric VSVG-L7Ae Virus-like Particles ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 505 (4): 1097-1102. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.113>.
- Ziady, Assem-Galal, Christopher R. Gedeon, Timothy Miller, William Quan, Jennifer M. Payne, Susannah L. Hyatt, Tamara L. Fink, et al. 2003. « Transfection of Airway Epithelium by Stable PEGylated Poly-L-Lysine DNA Nanoparticles in Vivo ». *Molecular Therapy* 8 (6): 936-47. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.07.007>.
- Zintchenko, Arkadi, Alexander Philipp, Ali Dehshahri, et Ernst Wagner. 2008. « Simple Modifications of Branched PEI Lead to Highly Efficient siRNA Carriers with Low Toxicity ». *Bioconjugate Chemistry* 19 (7): 1448-55. <https://doi.org/10.1021/bc800065f>.
- Zuhorn, Inge S., Ruby Kalicharan, et Dick Hoekstra. 2002. « Lipoplex-Mediated Transfection of Mammalian Cells Occurs through the Cholesterol-Dependent Clathrin-Mediated Pathway of Endocytosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 18021-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111257200>.

# Annexes

## Annexe A

### New developments in lentiviral vector design, production and purification

Maria Mercedes Segura, Mathias Mangion, Bruno Gaillet & Alain Garnier.  
Pages 987-1011 | Published online: 16 Apr 2013, in Expert Opinion on Biological Therapy.  
<https://doi-org.acces.bibl.ulaval.ca/10.1517/14712598.2013.779249>.

#### Abstract

**Introduction:** Lentiviruses are a very potent class of viral vectors for which there is presently a rapidly growing interest for a number of gene therapy. However, their construction, production and purification need to be performed according to state-of-the-art techniques in order to obtain sufficient quantities of high purity material of any usefulness and safety.

**Areas covered:** The recent advances in the field of recombinant lentivirus vector design, production and purification will be reviewed with an eye toward its utilization for gene therapy. Such a review should be helpful for the potential user of this technology.

**Expert opinion:** The principal hurdles toward the use of recombinant lentivirus as a gene therapy vector are the low titer at which it is produced as well as the difficulty to purify it at an acceptable level without degrading it. The recent advances in the bioproduction of this vector suggest these issues are about to be resolved, making the retrovirus gene therapy a mature technology.

Keywords: gene therapy, lentiviral vectors, production, purification, vectors design.

#### 1. Introduction

Gene therapy has been part of our reality for more than two decades and is still a rapidly evolving field. The first viral vector used for clinical applications has been constructed from the Moloney murine leukemia virus (MLV) [1], a  $\gamma$ -retrovirus (RV) from the *Retroviridae* family, also comprising the lentivirus (LV) genus. Recombinant MLV still represents the most prominent gene vector used for gene transfer clinical trials as it combines interesting properties for gene therapy such as a large tropism, an efficient



integration and a robust, stable expression in target cells. However, it is hampered by its poor ability to enter nondividing cells. An interesting alternative to this limitation are recombinant LVs, which share many characteristics with RVs, given their common family, while LV can also transduce nondividing cells. As a result, recombinant LV is one of fastest growing vector [2]. LVs constitute an attractive and promising tool for a wide array of gene transduction applications, notably for therapy [2]. The principal technological hurdle associated with lentiviral vector (LVV) is its low-titer production and the need for more efficient and selective purification methods. In the best cases  $10^5$  to  $10^7$  transducing units per milliliter (TU/mL) of cell culture are produced by standard methods (i.e., a transient transfection of a plasmid set or a packaging cell line [PCL]). These titers can be increased by centrifugation to generate  $\sim 10^9$  TU/mL, which is sufficient for certain *in vitro* experiments and *in vivo* testing in small animal models. However, these concentrations remain too low for gene therapy clinical trials, where the number of functional particles needed is at least  $10^{11} - 10^{12}$  per patient [3]. Over the past several years considerable improvements have been made in the fields of vector design, production system and purification method in an attempt to develop safe and cost-effective processes, amenable to large scale and compatible with good manufacturing practices. This review will provide an overview of the techniques recently made available for the design, production and downstream processing of LVVs, which should bring LV gene therapy to maturity.

## 2. Lentiviral vectors

### 2.1 Biology

LV and RV share many common features. As RV, LV genome constitutes a single-strand (ss) RNA of 7 – 12 kb in length. LV is a spherical virus between 80 and 120 nm in diameter [4]. The LV particle contains two copies of positive strand RNA, which are complexed with the nucleocapsid protein (NP) and the enzymes reverse transcriptase, integrase and protease (*pol*) [5]. A second protein shell formed by the capsid protein (*gag*) encloses the NP and delimits the viral core [6,7]. Matrix proteins form a layer outside the core and interact with a cellular-derived lipid envelope, which incorporates viral envelope glycoproteins (*env*), responsible for the interaction with specific host cell receptors. Two units form these glycoproteins: transmembrane (TM) that anchors the protein into the lipid bilayer and surface (SU), which binds to the cellular receptor.

The *Retroviridae* family can be divided into simple and complex genera, based on their genome organization. LVs are complex *Retroviridae* and include primate: human and simian immunodeficiency virus (HIV and SIV), as well as non-primate *Retroviridae*: feline immunodeficiency virus, bovine immunodeficiency virus, caprine arthritis encephalitis virus and equine infectious anemia virus (EIAV). Similar to the simple RV, the LV genome is primarily organized around the *gag*, *pol* and *env* genes. In addition, LV is composed of six other genes: two regulatory genes (*tat* and *rev*) and four accessory genes (*nef*, *vif*, *vpr* and *vpu*), that encode proteins playing important roles for viral replication, binding, infection and virus release [8]. Moreover, the retroviral genome contains *cis*-acting sequences such as two long terminal repeats (LTR), together with elements required for gene expression, reverse transcription and integration into the host chromosomes. Other important sequences are the packaging signal ( $\psi$  or  $\psi$ ), required for the specific RNA packaging into newly formed virions [9] and the *poly*purine tract (PPT), which is the initiation site of the positive strand DNA synthesis during reverse transcription [10,11].

The LV life cycle can be separated in several steps. i) Binding and entry: virus entry is mediated by the binding of the viral envelope glycoprotein gp120 to the CD4 receptor exposed on the target cell surface leading to the fusion of the viral envelope with the cell membrane. Subsequently, the viral core is released into the cytoplasm. ii) Reverse transcription: ssRNA is reverse transcribed into double-strand (ds) DNA within the core. iii) Trafficking and nuclear import: dsDNA is actively transported to the nucleus. iv) Integration: viral DNA is integrated into the host DNA as a provirus. v) Gene expression: viral genes are transcribed and spliced; full-length genomic viral RNA (gRNA), as well as viral mRNA are transported to the cytoplasm and translated. vi) Assembly and budding: gRNA and viral proteins translocate to the assembly site resulting in virion formation, maturation and budding [12].

## 2.2 Specific properties and applications

Besides being able to stably integrate their transgene in dividing and nondividing cells [13], LVVs have a lower insertional mutagenesis induction rate compared to RV vectors (RVV), possibly due to different integration patterns [14,15]. Indeed, several studies have shown that RVs preferentially integrate near the transcriptional start site of genes, while LVs preferentially integrate active transcriptional loci. However, LVs and RVs share common characteristics as they have a large packaging capacity (up to 10 kb) [16] and they allow long-term gene expression [17]. LVV are used for many applications such as for genome-wide function studies of gene expression [18-20], animal transgenesis [21,22], cell

engineering (genetic reprogramming to generate induced pluripotent stem cells [iPSs]) [23-25], recombinant protein production [26,27] and clinical gene therapy [28-30]. In gene therapy, the major interest of LVV compared to RVV in gene therapy is to treat genetic disorders in nondividing cells such as in the central nervous system. LVV are used to target several diseases such as adrenoleukodystrophy (ALD) [30], Parkinson's disease [31], sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia [32], cystic fibrosis [33], HIV [34] and cancer [35]. Current applications and clinical trial status have been reviewed in Refs. [36,37]. Up to January 2013, when 62 LV-based gene therapy trials have been performed (Table 1 [2]).

**Table 1. LVV-based clinical trials up to January 2012 [2].**

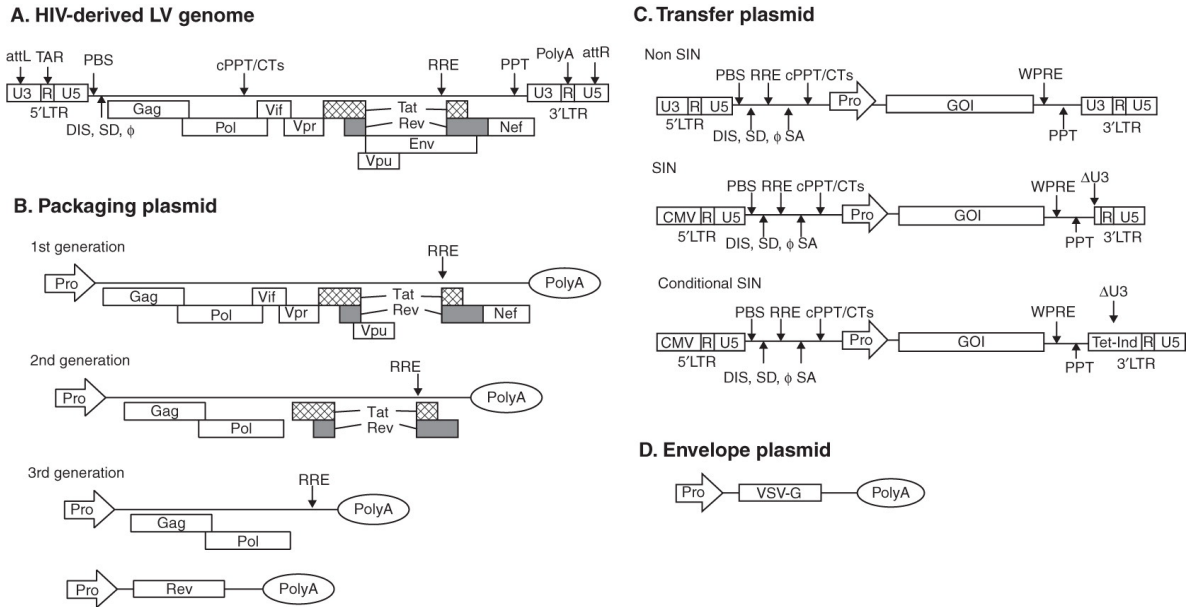
Disease	Category	Phase	Date approved / initiated	Gene
CD19+ B- lymphoid malignancies	Cancer disease	II	2012	CD19 antigen- specific chimeric antigen receptor (CAR)
HIV infection	Infectious diseases	I	2012	CCR5shRNA/RNA decoy for TAR/TRIM5 $\alpha$
CD19+ B- lymphoid malignancies	Cancer disease	I	2012	CD19 antigen- specific- zeta T- cell receptor
Thalassemia	Monogenic disease	I	2012	Human globin
Pediatric patients with high risk brain tumors	Cancer disease	I	2012	O -6- methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)
Netherton syndrome	Monogenic disease	I	2012	SPINK5
HIV infection	Infectious disease	II	2012	HIV- 1 Gag- Pol- Nef
Wiskott- Aldrich syndrome	Monogenic diseases	II	2011	Wiskott Aldrich protein
Stargardt macular degeneration (SMD)	Other	II	2011	ABCR
X- linked chronic granulomatous disease (X- CGD)	Monogenic diseases	II	2011	gp91phox
Retinitis Pigmentosa associated with Usher Syndrome type 1B	Ocular diseases	II	2011	N/A
Hemophilia A	Monogenic diseases	I	2011	Factor VIII
Fanconi anemia	Monogenic diseases	I	2011	Fanconi anemia complementation group A
HIV infection	Infectious diseases	II	2011	HIV genes C46
ADA- deficient individuals	Monogenic diseases	II	2011	ADA
Melanoma	Cancer diseases	I	2011	$\alpha$ - and $\beta$ - T- cell receptor specific for tyrosinase
Advanced myeloma	Cancer diseases	I	2010	High affinity T- cell receptor specific for MAGE- A3 or NY- ESO- 1
Metastatic melanoma	Cancer diseases	I	2010	High affinity T- cell receptor specific for MAGE- A3 or NY- ESO- 1
Age- related macular degeneration (AMD)	Ocular disease	I	2010	Endostatin angiostatin
Non- Hodgkin's lymphoma	Cancer diseases	II	2010	CD19 antigen- specific CAR
$\beta$ - thalassemia	Monogenic diseases	I	2010	Human $\gamma$ - globin gene
Synovial sarcoma	Cancer diseases	I	2010	High affinity T- cell receptor specific for NY- ESO- 1
Childhood cerebral ALD	Monogenic diseases	II/III	2010	ABCD- 1 gene (ALD protein)
Ovarian cancer	Cancer diseases	I	2010	$\alpha$ - folate receptor- scFv with signaling domains comprising TCR- zeta , and 4- 1BB
SMD	ocular disease	II	2010	Retina- specific ABC transporter (ABCR)
Parkinson's disease	Neurological disease	II	2010	Dopa decarboxylase tyrosine hydroxylase GTP- cyclohydrolase 1
Metachromatic leukodystrophy	Monogenic diseases	II	2010	Arylsulfatase A
Sickle cell disease	Monogenic diseases	I	2010	Human $\gamma$ - globin with $\gamma$ - globin exons gene
CD19+ acute lymphoblastic leukemia relapsed post- allogeneic stem cell transplantation	Cancer diseases	I	2010	CD19 antigen- specific- zeta T- cell receptor
Wiskott- Aldrich syndrome (WAS)	Monogenic diseases	I	2010	Human WAS gene
X- linked severe combined immune deficiency	Monogenic diseases	I	2009	$\gamma$ - c common chain receptor
HIV infection	Infectious diseases	I	2009	HIV- 1HXB2 gag , truncated pol , vpr , rev , tat , nef and envelope proteins
Ovarian cancer	Cancer diseases	I	2009	$\alpha$ - mesothelin- scFv with signaling domains comprising TCR- zeta , CD28 and 4- 1BB
Severe combined immune deficiency due to adenosine deaminase deficiency (ADA)	Monogenic diseases	II	2009	ADA
ALD	Monogenic diseases	III	2009	ABCD- 1 gene (ALD protein)
X- linked severe combined immune deficiency	Monogenic diseases	I	2009	$\gamma$ - c common chain receptor
Wiskott Aldrich syndrome	Monogenic diseases	I	2008	Human WAS gene
CD19- CMV+ Non- Hodgkin's lymphoma	Cancer diseases	I	2008	CD19 antigen- specific CAR
Fanconi anemia	Monogenic diseases	I	2008	Fanconi anemia complementation group A
Glioma	Cancer diseases	I	2008	MGMT
Parkinson's disease	Neurological diseases	II	2008	Tyrosinase GTP- cyclohydrolase 1 Dopa decarboxylase
$\beta$ - thalassemia	Monogenic diseases	I	2007	Human $\beta$ - globin gene
HIV infection	Infectious diseases	II	2007	HIV- 1 env
Mucopolysaccharidosis Type VII (MPS VII)	Monogenic diseases	I	2006	$\beta$ - glucuronidase
Malignant melanoma	Cancer diseases	I	2006	$\alpha$ - and $\beta$ - chains of T- cell receptor specific for MART- 1
CD19+ leukemia and lymphoma	Cancer diseases	I	2006	CD19 antigen- specific- zeta T- cell receptor
Sickle cell anemia, thalassemia	Monogenic diseases	II	2006	$\beta$ - globin
HIV infection	Infectious diseases	I	2005	RNAi targeted at HIV tat and rev RNA decoy for TAR ribozyme targeted at CCR5 cytokine receptor
X- linked ALD	Monogenic diseases	II	2005	ALD
HIV infection	Infectious diseases	II	2004	Antisense env
HIV infection	Infectious diseases	II	2004	VRX496
HIV infection	Infectious diseases	I	2001	HIV- 1 env

### 2.3 LVV design evolution

LVV are produced by the *trans*-complementation of three plasmids containing different genes from the recombinant LV, transfected in a cell line. This concept was originally developed for the  $\gamma$ -RVVs and based on the separation of *cis*- and *trans*-acting sequences in different plasmids. Following their evolving production technologies, these vectors are divided into generations according to the HIV-derived LV genome sequences used in the plasmids. The first generation consists in i) a plasmid providing all *trans*-acting sequences (packaging plasmid); ii) a plasmid encoding a heterologous envelope membrane protein; and iii) a plasmid containing all the *cis*-acting sequences and the transgene of interest, which expression is driven by a foreign promoter (transfer plasmid).

Due to its similarity to HIV, this first LVV generation has undergone several genetic modifications to improve its biosafety and performance. These improvements were achieved by i) limiting sequence overlap in order to strongly reduce spontaneous replication and the generation of replication-competent LV (RCLs) and ii) removing HIV accessory, unnecessary genes such as *vif*, *vpr*, *vpu* and *nef* [38,39]. This second LVV generation is produced from a packaging plasmid encoding the essential *trans*-acting LV proteins (*gag-pol*, *rev* and *tat*) and a transfer plasmid containing the transgene of interest with the minimal *cis*-acting sequences. In addition, the transfer plasmid has a self-inactivating (SIN) configuration where the homologous enhancer/promoter sequences in the U3 region of 3' LTR are deleted [40]. Consequently the deletion is reproduced in the 5' LTR during reverse transcription, causing transcriptional inactivation of the provirus. Otherwise, the conditional SIN (c-SIN) configurations harboring a minimal tetracycline-inducible promoter in the U3 region impart the SIN phenotype in target cells, thereby obviating vector mobilization [41].

Safety was further improved with the third generation LVV that represents the safest packaging system for clinical applications, since it contains only 10% of the viral genome sequence [42]. It consists of a split-genome packaging system in which the *rev* gene is expressed from a separate plasmid. Moreover, a chimeric 5' LTRs have been constructed in the transfer vector in order to make the LV promoter *tat*-independent. This has been achieved by replacing the U3 region of the 5' LTR by a strong *tat*-independent constitutive promoter [43]. This construction limits both genome mobility and possibilities of recombination in the host cell (Figure 1) [40].



**Figure 1. Evolution of the LVV design starting from HIV-1-derived LV. (A)** HIV-1 wild-type containing all *cis*- and *trans*-acting sequences. **(B) – (D)** Plasmids used to produce LVVs and based on the *trans*- and *cis*-acting sequence split. **(B)** Packaging plasmids. First generation of LVVs encoding all HIV proteins except the envelope protein. Second generation of LVVs only encodes *gag/pol*, *tat* and *rev*. Third generation LVVs split in two plasmids, one encoding *gag/pol* and the other encoding *rev*. **(C)** Transfer plasmids. Non-SIN configuration plasmid contains the HIV-1 wild-type 5' LTR and 3' LTR. SIN (self-inactivating) configuration plasmid contains a CMV promoter in the 5' LTR U3 region and a deletion in 3' LTR U3 region. The c-SIN configuration renders the transgene expression tissue specific and/or controllable compared to the SIN configuration. **(D)** Envelope plasmid. LVVs can be produced with different viral pseudotypes depending on the envelope protein used.

ΔU3: SIN deletion in U3 region of 3'LTR; φ: Packaging signal; CMV: Cytomegalovirus immediate-early promoter; cPPT: Central purine tract; CTS: Central termination sequence; DIS: dimerization signal; GOI: Gene of interest; pA: Polyadenylation signal; PBS: Primer binding site; PPT: Polypurine tract; Pro: Internal promoter for transgene expression; RRE: Rev response element; SA: Splice acceptor site; SD: Splice donor site; WPRE: Woodchuck hepatitis virus (WHV) post-transcriptional regulatory element.

The transfer plasmid also underwent several important modifications. The design of a safe and efficient LVV requires both deletions of non-necessary sequences from the backbone and insertions of elements that are proven to have a positive effect on vector titer or transgene expression. The central

PPT–central termination sequence reinsertion into HIV-1-derived vector strongly stimulates gene transfer efficiency in different cell types [44]. The post-transcriptional control element acts with the cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter enhancer to increase transgene expression [45]. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) increases transgene expression in mammalian cells from different viral vectors [46,47] and the viral vector titer from transiently transfected 293T cells and stable producer cells by 7- to 15-fold, as compared to WPRE-lacking retroviral constructs [48,49]. The replacement of the original *polyA* signal in the 3' LTR U5 region with a bovine growth hormone *polyadenylation* sequence significantly increases the efficiency of SIN vectors [46]. The chromatin insulators can help maintain long-term expression by suppression of transgene silencing [50]. The multimeric copies insertion of constitutive transport element (CTE) is able to replace the *rev* response element system to export RNA from the nucleus to the cytoplasm and produce equivalent titers. CTE elements into the transfer vector and the packaging plasmid would allow removing the cytotoxic *rev* gene expression during vector production [51].

Another major LVV modification is pseudotyping, the replacement of the native envelope protein by a heterologous one, resulting in a tropism change [52]. Pseudotyping can offer several significant advantages such as i) improved vector safety, due to the elimination of sequence homology with wild-type virus, ii) widen or more selective specificity of vector tropism toward target cells and iii) improve particle stability allowing virus concentration and long-term virus storage. The G protein of vesicular stomatitis virus (VSV-G) is the most used envelope protein to pseudotype LVVs as well as oncoretroviral vectors, because it is highly stable, allowing the concentration of the vector by ultracentrifugation, and because its receptors are ubiquitously expressed in mammalian cells conferring a very broad tropism. However, the VSV-G envelope comes with a number of limitations including the susceptibility to inactivation by human complement, toxicity and broad tropism with still unknown entry receptor(s) [53]. In order to avoid VSV-G drawbacks, several studies report LVV pseudotyped with other viruses envelop proteins, conferring a more selective tropism, such as Ebola virus for airway epithelium and skin [54], rabies virus for neurons [55], baculovirus (BV) [56] and hepatitis C [57] virus for hepatocyte, feline endogenous RV [58] for hematopoietic cells and measles virus for B cells and T cells [59]. Despite all of the above, VSV-G pseudotyping provides the highest titers and the most robust LVV particles [60,61].

The genetic engineering of the viral structural protein Pr55gag has shown a significant improvement of the viral production. Indeed, retroviral production and infectivity are regulated by the amino-terminal matrix domain (p17MA or MA) of Pr55gag (*gag*) [62-65]. The myristoylation (*myr*) signal in the MA domain is critical for efficient viral production by aiding *gag* trafficking to the plasma membrane (PM). It has been shown that substitution of the HIV-1 *gag* *myr* with the phospholipase C-d1 pleckstrin homology (PH) domain increased the production of the third-generation LVV in which the *gag-pol* was human codon-optimized [66,67]. Thereafter, it has been discovered that the *myr* signal motifs of several heterologous proteins could enhance viral production up to 10-fold and to a greater extent than PH-*gag* [68].

Non-integrative gene therapy can also be applied using LVV. This has been achieved with the development of non-integrating LVVs (NILVs) consisting of integrase-deficient LVs obtained by selective mutations within the integrase-coding region of the packaging plasmid. These mutations eliminate the integrase activity without affecting reverse transcription and transport of the pre-integration complex to the nucleus. The LVV DNA thus remains in the cell nucleus as an episome, leading to sustained expression in post-mitotic cells and tissues such as the retina [69], brain [69,70] and muscle [71]. The main advantage of this strategy is to avoid the oncogene activation risk caused by random LVV insertion in the genome [72,73]. Although LVVs have shown distinct target site preferences [74] and less genotoxicity compared to  $\gamma$ -RVVs [75], insertional mutagenesis risks still has to be considered when developing a clinical application [76].

Integrative strategy has to be envisioned when gene repair or knockdown are desired. In these circumstances, the generation of LV hybrid vectors encompassing non-genotoxic integration mechanisms combined with NILV is an interesting compromise. One of these LV hybrid vectors is the LV-transposon hybrid, using the Sleeping Beauty (SB) transposon system, allowing a stable and safe integration of the gene of interest in the genome. This transposition phenomenon requires the interaction between the SB transposon inverted repeats and the SB transposase [77-79]. Another LV hybrid vector used to target desired integration sites is based on the engineered zinc-finger nucleases (ZFNs) homologous recombination tool [80,81]. Engineered ZFNs has been coupled to NILV to be delivered to cells [82]. This hybrid LV-ZNF vector has shown gene correction at the human IL2RG locus.



### 3. Recent improvement in LV production process

#### 3.1 Cell lines

HEK293 cells and their genetic derivatives are the principal cell lines used for the production of LVVs [83] and RVVs [84] due to their properties [85]. This cell line is relatively highly transfectable (leading to 70 – 90% transfected cells upon LV infection [86]) and can be modified to stably express the SV40 T-large antigen (T-Ag), which enables replication of plasmids containing the SV40 replication origin (293T)(Table 2 [86]). It has been shown that 293T cells grow faster than their parental cell line and that vector productivity can be four times higher than with the parental cell line under the same conditions [87]. Another study reports the production of LVVs upon chromosomal integration in 293T cells with a 10-fold higher titer production compared to HEK293. It appears that low level of constitutive T-Ag expression improves stability and productivity of HEK293 producer cell lines [88]. The 293T cells can be adapted to suspension culture in serum-free medium (SFM) [87,89] which makes them easily amenable to large-scale production bioreactors and also, by reducing the complexity of the medium, simplifies the number of steps and the cost of downstream processing. The use of another HEK cell line derivative, called 293E, for the production of LVV has also been reported [86]. This cell line expresses the Epstein–Barr virus (EBV) nuclear antigen-1 and was scaled-up from shake flask to a 3-L bioreactor for LVV production. These cells promote episomal persistence of plasmids carrying EBV origin of replication oriP and consequently increase expression levels [87,89].

#### 3.2 Transient expression

Transient expression is the most commonly used method to produce LV and consists in the transient expression of one or more packaging plasmid(s) bearing i) the *gag-pol*, ii) *rev* and/or *tat*, an envelope glycoprotein-encoding plasmid and iii) the transfer plasmid containing the transgene and the minimal *cis*-acting sequences that are required for viral RNA production, processing and packaging [12]. Transient transfection allows avoiding the time-consuming, tedious and cumbersome process of developing stable PCLs and can be used to express cytotoxic transgene [90].

Significant improvements in LVV production by transient transfection have recently been described [86,89,91-94]. Some of these studies report scalable and industrial production systems generating > 10<sup>11</sup> LV particles per batch, which is sufficient for Phase I clinical trials. Some of these

improvements are the result of a combination of optimized parameters such as cell type, cell density, cell culture medium and supplements, cell culture process and plasmid transfer reagent. For instance, Kuroda *et al.* proposed a LV production protocol based on the adherent cell culture in a protein-free medium transfected with polyethylenimine (PEI) [95].

Tiscornia *et al.* described a LV production method with adherent cells, fetal bovine serum (FBS) and calcium phosphate (CaPO<sub>4</sub>) transfection [96]. Giry-Laterrière *et al.* presented a protocol using adherent cells cultured in SFM transfected with CaCl<sub>2</sub> [97]. Segura *et al.* have shown it is possible to improve LV production by using suspension culture in SFM additioned with Pluronic® and transfected with PEI [98].

The quality of plasmid DNA preparation and vector insert size also influence transfection efficiency. LV titer decreases with increasing vector size [99] and plasmid DNA used for vector production should be free of bacteria-derived impurities and should preferentially be in a supercoiled form [98]. High yields of good quality DNA preparations are usually achieved using commercially available kits. The total amount of DNA to be used for transfection (plasmid mix) depends on the cell culture scale and usually ranges between 1 and 10 µg/10<sup>6</sup> cells. Moreover, a proper ratio of vector, helper(s) and envelope plasmids must be established.

### **3.2.1 Transfection agents**

#### **3.2.1.1 Calcium-phosphate precipitation**

The CaPO<sub>4</sub> precipitation is traditionally used to produce LVV by transient transfection [13]. Briefly, the protocol consists in the transfection of 293T cells using calcium-phosphate/DNA coprecipitation with several plasmids. Cells are grown as monolayer in a culture dish in the presence of 10% FBS. At days 2 and 3 post-transfection, ~ 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> infective viral particles per milliliter (IVP/mL) can be recovered. Thereafter, supernatant is harvested and pooled, filtered through 0.45 µm membranes, and usually purified through two rounds of ultracentrifugation in order to improve vector potency and purity [94,96,100]. This method appears non-optimal for large LVV production since i) it requires the presence of serum or albumin to reduce the cytotoxicity of CaPO<sub>4</sub>, ii) the culture medium has to be changed 16 – 20 h after transfection to reduce the cytotoxicity of CaPO<sub>4</sub> and iii) this procedure is highly sensitive to small variations in pH. It has been demonstrated that the DNA–CaPO<sub>4</sub> complex solubility

and the transfection efficiency are affected by pH and phosphate concentration in the culture medium [101].

**Table 2. Recent protocols for LVV production.**

Titer before concentration	Titer after concentration	Concentration method	Cell line culture	LV generation	Plasmid transfer agent	Scale	Adjuvant medium	Refs.	
<i>Transient LVVs production</i>									
1x 10 <sup>6</sup> IVP/mL	10 <sup>10</sup> IVP total	Ultrafiltration, heparin affinity chromatography	HEK293-EBNA, suspension, 1x 10 <sup>6</sup> cells/mL	HIV-derived LV 3rd	25-kDa linear PEI, mass ratio	3 L bioreactor	Serum free, 0, 1% pluronic	[86,98]	
8 x 10 <sup>7</sup> TU/mL			HEK293SF-3F6, suspension, 4,5 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	HIV-derived LV 3rd	PEI, mass ratio	3 L bioreactor	Serum free, 5 mM sodium butyrate	[89]	
1x 10 <sup>7</sup> IVP/mL			HEK293FT, adherent, 2 x 10 <sup>6</sup> cells/25 cm <sup>2</sup>	HIV-derived LV 3rd	25-kDa branched PEI, N/P ratio	25 cm <sup>2</sup> T-flask	10% FBS	[106]	
6 x 10 <sup>7</sup> TU/mL	2.1x 10 <sup>10</sup> TU/mL	Ultracentrifugation	HEK293T, adherent, 1,6 x 10 <sup>7</sup> cells/150 cm <sup>2</sup>	HIV-derived LV 2nd	CaPO <sub>4</sub>	150 cm <sup>2</sup> T-flask	10% FBS, 1% glutamax, 25 μM chloroquine	[94,100]	
2.5 x 10 <sup>6</sup> TU/mL			HEK293T, adherent	HIV-derived LV 3rd	BV, MOI: 250 PFU/cell, transduction overnight		Serum free	[116]	
1x 10 <sup>6</sup> IVP/mL	1x 10 <sup>6</sup> IVP/mL	Ultracentrifugation	HEK293T, adherent, 80–90% cell confluence	HIV-derived LV 3rd	CaPO <sub>4</sub>	15 cm dish	2% FBS	[96]	
2 x 10 <sup>6</sup> TU/mL			HEK293T, adherent, 2 x 10 <sup>6</sup> cells	HIV-derived LV 2nd	CaPO <sub>4</sub>	1720 cm <sup>2</sup> HYPERFlask vessel	10% FBS, 1% glutamax, 25 μM chloroquine	[94]	
2.2 x 10 <sup>6</sup> TU/mL	1.1x 10 <sup>9</sup> TU/mL	Ultracentrifugation	HEK293T, suspension	HIV-derived LV 3rd	BV, MOI: 25 and 125 PFU/cell, transduction 4 h	490 cm <sup>2</sup> and 850 cm <sup>2</sup> roller bottles	1% FBS, 5 mM sodium butyrate	[93]	
1x 10 <sup>8</sup> IVP/mL			HEK293FT, suspension, 1x 10 <sup>6</sup> cells/mL	HIV-derived LV 3rd	EP, mass ratio	10 L wave bioreactor	Serum free, 10 mM sodium butyrate	[92]	
4 x 10 <sup>7</sup> TU/mL	6 x 10 <sup>9</sup> TU/mL	Ultracentrifugation	HEK293T, adherent, 3 x 10 <sup>7</sup> cells/15-cm plate	HIV-derived LV 2nd	40-kDa PEI, N/P ratio	15 cm plate	serum free	[95,105]	
	2 x 10 <sup>9</sup> IVP/mL	Ultrafiltration, size-exclusion chromatography	HEK293T, adherent	HIV-derived LV 3rd	CaPO <sub>4</sub>	Cell factory 10-tray stacks	10% FBS	[91]	
<i>Stable LVVs production</i>									
Titer before concentration	Titer after concentration	concentration method	Producer cell line culture	LV generation	Regulatory system	Stability	Scale	Adjuvant medium	Refs.
	1,3 x 10 <sup>8</sup> TU/mL	Ultracentrifugation	HEK293T, 8 x 10 <sup>6</sup> cells/10-cm dish	EIAV-derived LV	Tet-On	12 weeks without selective pressure	10 cm dishes	Serum free, 10 mM sodium butyrate	[120,121]
3 x 10 <sup>7</sup> TU/mL			HEK293T, adherent	HIV-derived LV 2nd	Tet-Off	94 days without selective pressure	10 cm dishes	Serum free	[123]
2 x 10 <sup>6</sup> TU/mL	1.2 x 10 <sup>8</sup> TU/mL	Ultracentrifugation	HEK293SF, suspension, 0,8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	HIV-derived LV 3rd	Tet-On + Cumate	18 weeks without selective pressure	3.5 7L bioreactor	Serum free	[118]
3.4 x 10 <sup>7</sup> TU/mL			HEK293SF, suspension, 1x 10 <sup>6</sup> cells/mL	HIV-derived LV 3rd	Tet-On + Cumate		Shake flask		

### 3.2.1.2 Commercial lipid-based approaches

Commercial lipid-based approaches can also be used to generate LVVs [102,103]. It has been described that the use of SuperFect®, an activated dendrimer-based transfection reagent allowed reproducible and efficient production of high-titer LVV at concentrations greater than 1 × 10<sup>7</sup> TU/mL prior to concentration step and required less than one-third of the total amount of DNA used in traditional CaPO<sub>4</sub> transfection [104]. However, the main lipid-based methods are still too expensive to use in an industrial context.

### 3.2.1.3 Polyethylenimine

Recently, studies proved that cost-effective PEI-mediated transfection were as efficient as CaPO<sub>4</sub>-based transfection methods to generate LVVs. LV titer of 10<sup>7</sup> TU/mL before concentration was reported with PEI [105,106]. In contrast to CaPO<sub>4</sub>, the PEI-based protocol does not involve medium replacement and is less sensitive to pH variations. In addition, a PEI-based transfection method resulted in LV particles production 40 to 120 times higher than that obtained with the standard CaPO<sub>4</sub>-based protocol [106]. However, the plasmids/PEI polyplex may be, like CaPO<sub>4</sub>, toxic to cells and the DNA:PEI ratio needs to be optimized. Two methods of ratio optimization have been described: one is simply based on the DNA:PEI mass ratio and the other one is based on the ratio of nitrogen content of PEI to phosphorous content in DNA [107].

### 3.2.2 Flow electroporation

Most electroporation (EP) systems are designed to transfect relatively small volumes of cells. Flow EP addresses this limitation by continuously passing the desired volume of cellular and DNA suspension between two electrodes [108]. The procedure can be effectively scaled-up for large bioprocessing applications, while maintaining regulatory compliance [109]. EP system can transfect a higher cell density suspension (1 × 10<sup>8</sup> cells/mL) [92] than BV (see Section 3.2.3) (4 × 10<sup>6</sup> cells/mL) [93] or PEI (1 × 10<sup>6</sup> cells/mL) [89]. Interestingly, flow EP requires one-third less DNA than the CaPO<sub>4</sub> method in a corresponding volume. LV production in a 2 L volume using EP transfected cell has been successfully achieved with a titer of 8.8 × 10<sup>7</sup> to 1.3 × 10<sup>8</sup> TU/mL, under non-optimized conditions, corresponding to a total production of 2 × 10<sup>11</sup> TU [92].

### 3.2.3 Baculovirus infection

BV, an insect virus, is able to transduce mammalian cells [110,111] and has been previously used for the production of several viruses such as influenza [112], adenovirus [113], adeno-associated virus [114] and viral-like particles [115]. Recently, recombinant BVs have been used to generate LVV in suspension or adherent cell cultures [93,116]. Four recombinant BVs have been constructed which encode all elements needed for the LVV generation in mammalian cells. No RCL formation was detected. Titers obtained with this method were low (2.2 × 10<sup>6</sup> TU/mL before concentration). However, BV is an interesting alternative to PEI and CaPO<sub>4</sub>-transfection: Indeed, i) the construction and

production of BV in insect cells are easy to perform at large scale and high titer, ii) they are a safe transfer agent since they do not have the ability to replicate in mammalian cells, iii) BV transgene capacity can be as large as 40 kb, iv) they can be cultured in suspension under serum-free conditions and v) the BV system has been approved by the Food and Drug Administration and European Medicines Agency for the production of vaccines [\[117\]](#).

### 3.3 Packaging and virus-producing cell lines

The major difficulties of transient transfection come from i) the risk of recombination between the transfected plasmids, ii) the medium contamination with the transfected plasmids complicating the purification process and iii) the difficulty to identify optimal multiple transfection conditions leading to variability between different batches. As an alternative, RVV PCLs and virus-producing cell lines (VPCL) have been developed. The development of a PCL consists in the generation of a cell line that stably expresses all *trans*-acting elements and envelops protein (*gag-pol*, *env*, *rev*) for LVV packaging. The final step consists in the transfection of the transgene-containing transfer plasmid that will be packaged to produce the desired LVV. Typically, the transfer plasmid is transfected using PEI [\[118\]](#), a lipid agent or CaPO<sub>4</sub> precipitation [\[41,119\]](#). The development of a VPCL consists in the creation of a cell line that stably expresses all components used to produce LVVs. This can be achieved from either transfection of all packaging elements and the transfer vector, or infection with LVVs previously produced. By doing so, a VPCL can express LV particles during a prolonged period (superior to 5 – 6 days) [\[120,121\]](#). However, it has been proven that infection method to generate high titer and stable VPCLs is more efficient than transfection method [\[122\]](#). In addition, although a non-SIN VPCL producing stable and high LVV titer ( $< 10^7$  TU/mL) can be easily generated by infection, it appeared more cumbersome to perform this with a SIN configuration, due to the inactivated LTR. Consequently SIN-based LVVs must be produced by transfection. However to solve this problem, VPCL generation from infection can be achieved with a c-SIN configuration in which LTR enhancers and promoters are regulated.

Ideal PCLs and VPCLs must be stable, produce large quantities of LV and grow in i) suspension culture, to simplify scale-up and ii) SFM, for both safety reasons and downstream processing streamlining. However, PCL present relatively low yield compared to transient production. LV titers produced with PCL and VPCL are generally comprised between  $10^5$  and  $10^7$  TU/mL before concentration [\[120,121,123\]](#). Moreover, the selection procedure to establish such a stable cell lines

expressing all the vector components at sufficient level is a long and tedious process (typically > 6 months). Also, several of the proteins required to assemble LVVs are toxic to cells when overexpressed, including VSV-G, Rev, and protease. This problem has been overcome by the use of inducible expression systems for cytotoxic proteins. The tetracycline (Tet)-dependent regulatory system in a TET<sub>off</sub> configuration has been used to generate PCLs and VPCLs by regulating the cytotoxic protein expression. LV titers obtained from these cell lines are > 10<sup>7</sup> TU/mL before concentration and after a 3-day culture [123,124]. However, a long-term analysis of such a system has shown that the cells are genetically [125] or transcriptionally [83] unstable after 2 – 3 months of culture. In addition, the TET<sub>off</sub> configuration requires the removal of tetracycline or its analog, doxycycline (Dox) from the culture medium to induce gene transcription. For this reason, a TET<sub>off</sub> configuration is not compatible for large-scale production of LVVs.

In contrast, the TET<sub>on</sub> configuration is a scalable regulating system because the induction is triggered by the addition of Dox or tetracycline. A recent study reports that a PCL in which VSV-G and *gag/pol* expressions are regulated by a TET<sub>on</sub> system can produce a stable titer during 7 weeks without selective pressure [121]. In another study, a similar system could provide stable LVV during 16 weeks without the use of an antibiotic [120]. Nevertheless, for both these studies, titers were relatively low compared to other transient transfection systems (4.4 × 10<sup>5</sup> TU/mL).

An interesting advance for a scalable LVV-producing PCL was described by Broussau *et al.* In this study, *rev* and VSV-G expression were tightly regulated by a double tetracycline/cumate switch. Moreover PCL and VPCL were constructed with a Tet-inducible c-SIN providing additional safety. The PCL and VPCL systems, derived from HEK293 (HEK 293 SF-PacLV), provided vector titers as high as 2.6 × 10<sup>7</sup> and 3.4 × 10<sup>7</sup> TU/mL, respectively. In addition, these PCL and VPCL were stable for 18 weeks without selective pressure. The HEK 293 SF-PacLV cell line was adapted to SFM and could be cultivated in suspension allowing the easy scale up of the process. For example, in a 2.8-L bioreactor, HEK 293 SF-PacLV produced by transfection 2 × 10<sup>6</sup> TU/mL, 3 days after induction [118]. Although not as high as titers obtained in the most productive transient transfection systems, this consists in the most promising, scalable LVV-producing PCL.

### 3.4 Production process, scale-up and culture adjuvants

Culture process optimization can also lead to substantial LVV yield improvements. Since LVVs can be produced either in adherent or suspension cultures, different scalable processes have been proposed for the two culture types.

#### 3.4.1 The cell factory system

The cell factory system (Nunc, ThermoScientific) consists in a superposition of multiple culture plates in a single unit, 200 cm<sup>2</sup> per plate and up to 40 plates, for a total culture surface area of 24,000 cm<sup>2</sup>. This system has been successfully used with CaPO<sub>4</sub>-mediated transient transfection of adherent culture to produce LVV for clinical *ex vivo* gene therapy application [91]. This process was scaled-up to harvest 50 L of viral stock per batch. After a 200-fold volume concentration, 2 × 10<sup>9</sup> IVP/mL were obtained, generating up to 6 × 10<sup>11</sup> IVP per batch.

#### 3.4.2 The HYPERFlask™ (Corning)

The HYPERFlask™ (Corning) consists of 10 interconnected growth surfaces, each containing a membrane, pretreated to allow improved cell adherence. The membrane is gas permeable, allowing exchange of oxygen and carbon dioxide, resulting in an improved gas exposure of the culture. The usefulness of the HYPERFlask for LVV production has been tested for CaPO<sub>4</sub>-mediated transfection and compared to the productivity of 150 cm<sup>2</sup> culture dish. Results indicate that the titers of unconcentrated LVVs produced using HYPERFlask were up to 2.3 × 10<sup>8</sup> IVP/mL, while the titers of LVVs produced in 150 cm<sup>2</sup> dishes were lower, up to 6.9 × 10<sup>7</sup> IVP/mL. This corresponds to a productivity per surface available of 7.5 × 10<sup>7</sup> IVP/cm<sup>2</sup> for the HYPERFlask, 10-fold more than for the standard flask, 8 × 10<sup>6</sup> IVP/cm<sup>2</sup>. The higher productivity observed with HYPERFlasks may be related to better gas exchange during LVV production [94].

#### 3.4.3 Microcarriers

Microcarriers can be used for mass production of LVVs. This technology is currently used to produce recombinant proteins [126-130], adenoviruses and RVs [131,132] and other viruses [128-131]. However, although microcarriers provide a more scalable means of cell culture, the literature shows

that they do not allow productivity improvement compared to adherent flask culture ( $8.5 \times 10^6$  TU/mL) [132].

#### 3.4.4 LVV production in cell suspension

LVV production in cell suspension was reported for the first time by Segura *et al.* The process consisted in a PEI-mediated transient transfection of suspension 293E culture in SFM. It was successfully scaled-up from shake flasks to a 3-L bioreactor allowing to generate an average of  $1.1 \times 10^6$  IVP/mL from day 3 to day 6 post-transfection [86].

#### 3.4.5 Bag bioreactors

Bag bioreactors have also been described for LVV production. In a 2-L WAVE bioreactor (GE Healthcare) using flow EP, it was reported that a total of  $2 \times 10^{11}$  IVP was harvested after 2 days of production [92]. Compared to T-flask, Cell Factories and other adherent cell culture devices, the WAVE bioreactor can easily be scaled-up by changing the bag size, allowing a single, closed system, suitable for current good manufacturing practices (cGMP) production.

#### 3.4.6 Sodium butyrate

Sodium butyrate inhibits histone deacetylase activity causing hyperacetylation of histone leading to chromatin decondensation which in turn allows higher transcription and expression of the transfected DNA [133]. It has been reported that the transcriptional silencing of the transfected plasmid transgene occurs in LV production [83,134]. Experiments have shown that the addition of sodium butyrate in a range of concentration between 2 to 20 mM increases LVV productivity [60,105,135,136]. It appears that sodium butyrate effect is envelope protein-dependent. For instance, in opposition to other pseudotyping, VSV-G-pseudotyped LV production would not be enhanced by sodium butyrate [60]. However, when testing the effect of sodium butyrate on vector production improvement with a group of surface proteins, the best titer were obtained with VSV-G ( $1 \times 10^{10}$  TU/mL after concentration). Stewart *et al.* has argued that the removal of sodium butyrate would reduce the production cost and the number of manipulations required during the manufacturing process [121].



### 3.4.7 Chloroquine

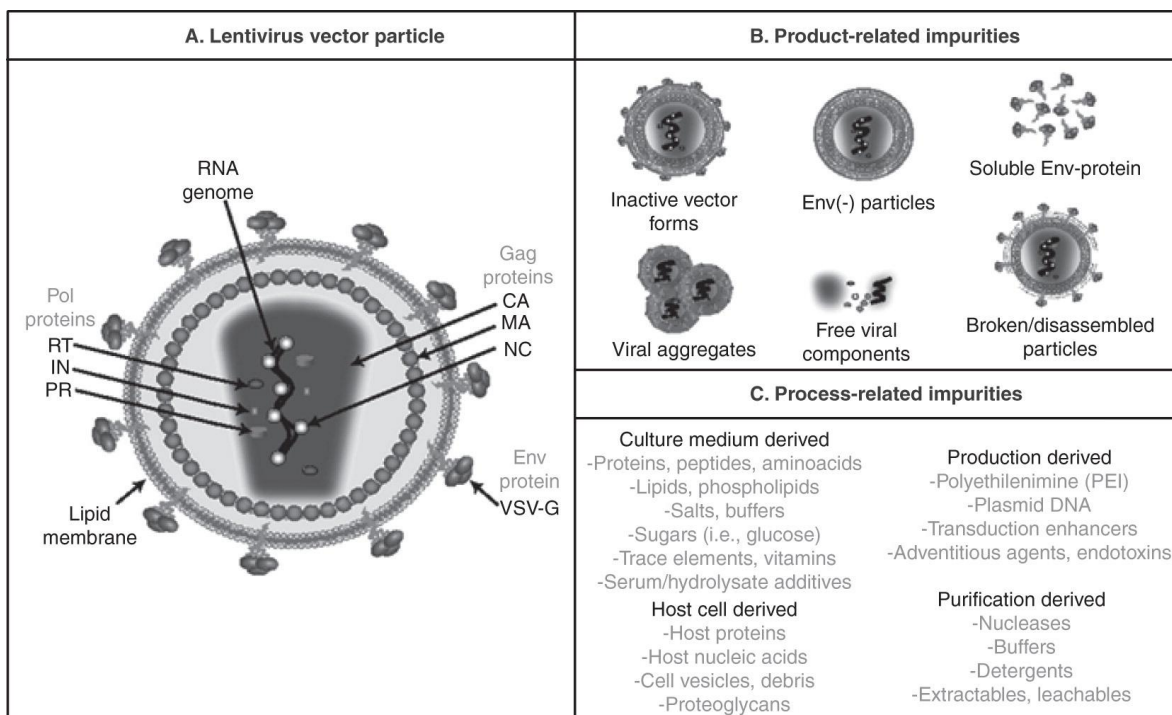
Chloroquine has been used for the production of LVVs. Chloroquine is an amine that raises the pH of endosomes and lysosomes [137]. The increase in lysosomal pH presumably inhibits the degradation of transfected DNA by neutralizing lysosomal enzymatic activity [138]. However, long cell incubation periods with chloroquine are described as toxic for the cells causing a decreased virus titer [139]. Otherwise, some publications reveal that chloroquine addition effect is transfection reagent-dependent. For instance, it has been reported that LVV titers were not improved by chloroquine when cultures were transfected using PEI [105,135].

### 3.4.8 Caffeine

Caffeine has been also shown to increase the titer of both integrative-competent LV and integrative-deficient LV by 3- to 8-fold with the addition of 2 – 4 mM for 48 or 72 h during viral production. Caffeine mechanism of action is not yet known [140].

## 4. Downstream processing of LVVs

Downstream processing of LVVs is aimed at removing all impurities, while maintaining vector activity. Accomplishing this goal can be a very challenging task considering the fragile nature of LV particles, their size and complex structure (Figure 2A) in addition to the variety of contaminants that may be present in harvested supernatants.

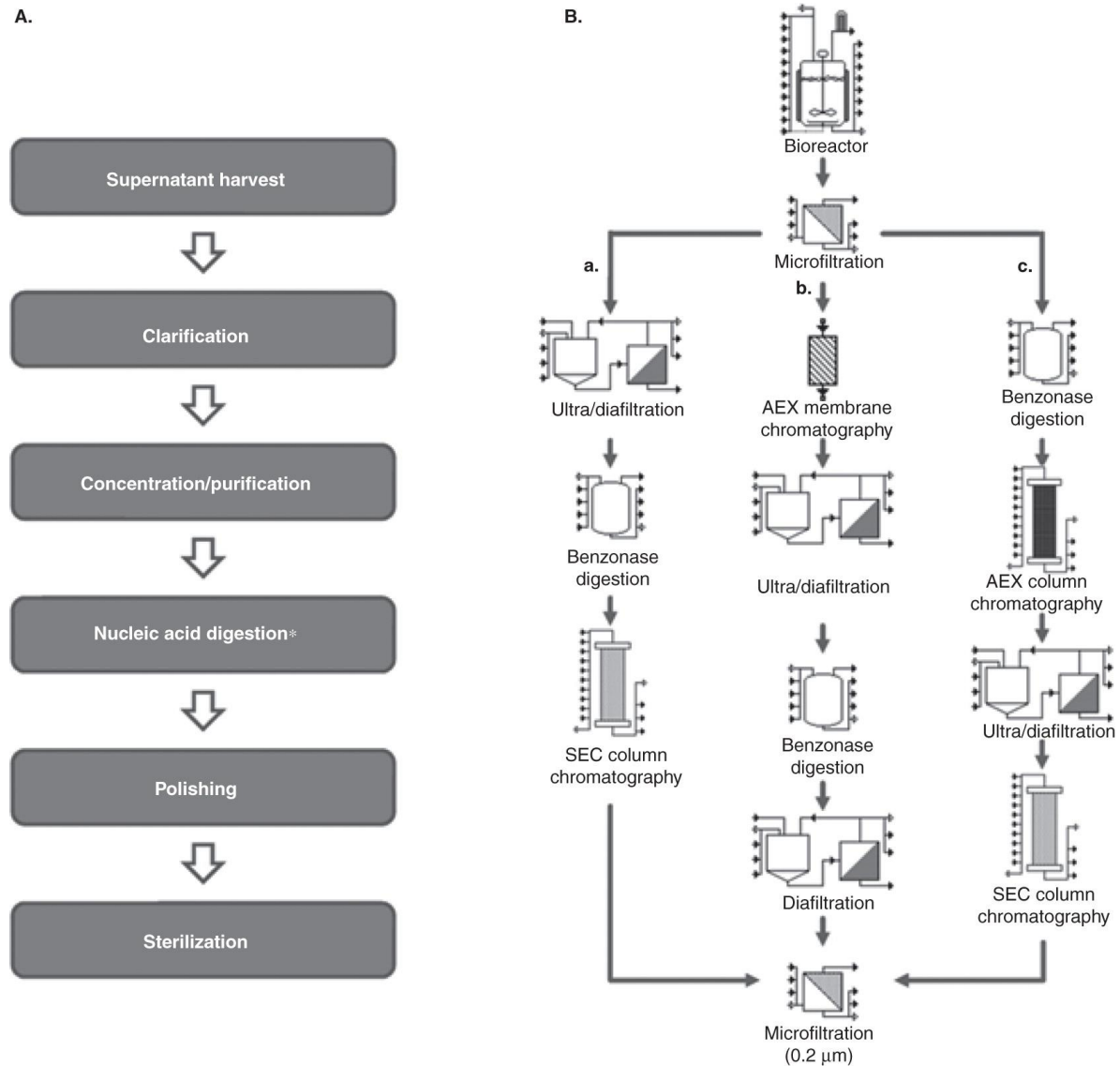


**Figure 2. LV particle structure and commonly found impurities.** (A) LV particles are composed of a lipid bilayer derived from the host cell, an RNA genome and proteins mainly derived from the proteolytic cleavage of precursor polyproteins (*gag*, *gag-pol* and *env*) encoded by three viral genes (*gag*, *pol* and *env*). Env may be replaced by the envelope protein of another virus, typically the VSV-G, in a process known as pseudotyping, (B) product-related impurities, (C) process-related impurities.

CA: Capsid protein; Env: Envelope protein; MA: Matrix protein; NC: Nucleocapsid protein; RT: Reverse transcriptase; IN: Integrase; PR: Protease; VSV-G: Vesicular stomatitis virus glycoprotein.

Two types of impurities can be distinguished. Product-related impurities are molecular variants of the product that do not show comparable activity, efficacy or safety. These include inactive vector forms, viral aggregates and soluble envelope proteins (Figure 2B). These impurities are typically difficult and sometimes impossible to eliminate since they share common physicochemical characteristics with functional LV particles. Process-related impurities are impurities that may derive from the culture medium (e.g., serum), the host producer cell (e.g., cell debris, cellular nucleic acids and proteins), the production process (e.g., plasmid DNA) or the purification process itself (e.g., nucleases, buffers, leachables) (Figure 2C). Contamination can often be avoided or, at least, minimized using optimized

bioprocessing strategies and/or top quality purification reagents/supports, thus facilitating downstream processing operations.



**Figure 3. Downstream processing of LVVs.** (A) General flow scheme of downstream processing steps. \*Nuclease digestion may be introduced at different steps along the purification process as depicted in 1B. (B) Combinations of unit operations employed at large-scale for the purification of LVVs for clinical trials (Super-ProDesigner). (a, b) Virxys DSP strategies, approximate overall yields 30% [150] (c) Généthon/MolMed DSP strategy, average overall yield 13% [91].

AEX: Anion exchange chromatography; SEC: Size exclusion chromatography.

The use of disposable technology in downstream processing (also known as single-use or limited-use technologies) is gaining popularity for recombinant proteins and virus vectors in particular. In this sense, it is important to consider that viral vectors cannot be subjected to classical virus inactivation/removal steps used for recombinant proteins and thus, it is critical to minimize potential sources of contamination with adventitious agents throughout the process. Disposable bags are commonly used for storage of buffers and intermediate products. The adoption of disposable systems for buffer preparation is growing. The filters used at different stages of the downstream process are typically single-use components. Most chromatography supports used for LV purification are available in disposable format including membrane adsorbers (Sartorius Sartobind®, Pall Mustang®), monoliths (Bia Separations CIM®) as well as conventional columns (GE Ready-to-Process™).

In recent years, a number of kits for the concentration and purification of LV particles and other viral vectors have been introduced in the market (Millipore, Sartorius, Clonetech, Lamda Biotech, abm, Cell Biolabs and Biocat kits, among others) [143]. These commercial kits usually achieve concentration by centrifugal ultrafiltration or precipitation methods, whereas purification is mainly achieved by means of anion exchange chromatography on membrane adsorbers. Purification of LVVs can be performed in a few hours. However, the kits are intended for small/medium-scale purification and can be used for research purposes only.

Downstream processing strategies for purification of  $\gamma$ -RVVs [142,144,145], LVVs [141,142] and viral vectors in general [143,146,147] have been reviewed in depth in the past. This review intends to provide an update of the methods used at the different stages of the downstream processing of LVVs, highlighting current trends.

#### **4.1 Clarification**

Clarification is required to eliminate producer cells and cell debris from crude harvested supernatants. Clarification is typically achieved by centrifugation, either in batch or continuous mode. In cases where ultrafiltration or chromatography steps follow, this operation is complemented with microfiltration to achieve greater clarification and avoid filter or column clogging. For practical reasons, a single-step clarification process based on dead-end membrane filtration is usually preferred at large scale ([Figure](#)

[3B](#)). Proper membrane chemistries should be selected in order to avoid loss of virus particles bound to the membrane. Clogging of the pores with cell debris over time results in reduction of the actual membrane pore size and consequently, virus entrapment [\[148\]](#). To minimize filter clogging and loss of vector particles, membranes with moderately large pore sizes (0.45 – 1  $\mu\text{m}$ ), often disposed in series of decreasing pore size, are used [\[91,148-150\]](#). Using suitable membrane supports, yields exceeding 90% are frequently attained.

## **4.2 Concentration, purification and polishing**

Following clarification, supernatants typically undergo a series of processing steps with the objective of concentrating and purifying the viral vector stock ([Figure 3](#)). In the initial concentration/purification step(s), viral particles are separated from the most abundant contaminants, including water. Concentration of clarified vector stocks at early stages of the process is advantageous to reduce the volume of feed and consequently, the size of the equipment required in later operations (pumps, filters, columns and vessels). A polishing step is further introduced to reduce remaining impurities. In principle, centrifugation, ultrafiltration and chromatography could be used in these steps since all of these operations allow concentration and purification of viral particles to different extents. However, the great majority of large-scale LV purification protocols are based exclusively on membrane filtration and chromatography technologies [\[141,142,146\]](#).

### **4.2.1 Centrifugation**

Ultracentrifugation is the most widely used method for isolation of virus particles in standard research laboratories. Although extremely helpful for generation of small quantities of highly purified material, this purification method is associated with several practical disadvantages that limit its use at the manufacturing scale. The main drawback of ultracentrifugation is the limited capacity of commonly available laboratory ultracentrifuges. Alternatively, taking advantage of the larger capacity of normal speed centrifuges, long low-speed centrifugation methods (typically, 6,000 – 7,000  $\times g$  for 16 – 24 h) can be used to purify and concentrate RV particles by pelleting [\[142\]](#). This procedure was employed for the large-scale purification of LVVs for clinical trials [\[151\]](#). Important disadvantages of these technologies include the long processing times and the harsh purification conditions, particularly when pelleting of viral particles takes place. These may result in disruption of virus particles, loss of viral

envelope surface proteins or virus aggregation, all of which will result in the concomitant loss of LVV potency [\[150,152\]](#).

#### **4.2.2 Ultrafiltration**

Ultrafiltration is the method of choice for the concentration of viral particles. Membrane processes are easily scaled-up and adapted to good manufacturing practices (GMP) manufacturing. Ultrafiltration allows gentle volume reduction of viral stocks in a relatively short time. This is particularly appealing when dealing with labile LV particles. Ultrafiltration processes offer the possibility of washing off impurities, thus purifying the vector stock based on size differences to some extent. The larger the pore size, the greater the purity that can be attained and the shorter the processing time. Typically, pore sizes ranging from 100 to 500 kDa are employed for ultrafiltration of LV particles [\[142,145\]](#). It is important to empirically determine the optimal membrane pore size, flow rate and TM pressure (TMP) to avoid loss of viral particles [\[142,145\]](#). Membrane fouling is the main problem faced during ultrafiltration, particularly when used at early stages of the process, since it causes the TMP to increase and the flow rate to decrease over time. Following concentration, the retentate fraction can be diafiltered using the same ultrafiltration unit. Diafiltration provides a fast and convenient means for buffer exchange into a suitable equilibration buffer for subsequent chromatography steps or into a final formulation buffer [\[91,150\]](#). Ultrafiltration can be carried out using different filtration modes (dead-end and tangential-flow filtration [TFF]) and devices (cassettes, hollow fibers, etc.). TFF is widely used for LV particles since it allows effective virus concentration and good yields with minimal membrane fouling [\[91,147,153,154\]](#).

#### **4.2.3 Chromatography**

Chromatography is widely used in the industrial setting for the downstream processing of biological products because it provides an efficient means of achieving the high level of purity required for human therapeutics. Like membrane processes, chromatography is easily scaled-up and adapted to GMP manufacturing. A number of chromatography methods have been reported for purification of LVV particles (Table 3). A clear trend toward the adoption of alternative chromatography supports has been observed over the past years. Among them, membrane adsorbers and monoliths have been evaluated for the purification of LVVs (Table 3) [\[93,94,150,155-157\]](#). This is due to the fact that most conventional chromatography resins have been designed for the purification of proteins rather than large virus

particles. Using classical resins, nanoparticle-binding areas are restricted to the bead surface area, whereas most contaminating proteins will also have access to the pore area inside the particle [158]. As a result, the virus-binding capacity and purification efficiency using conventional supports are severely compromised. Binding capacity is a critical parameter since it determines the throughput and concentrating potential of a chromatography resin [147]. Using alternative chromatography supports, virus particles have access to the majority of ligands on the adsorber surface, which typically results in increased binding capacities [157]. In addition, mass transport through the pores or channels of membrane adsorbers and monoliths, respectively, takes place mainly by convection overcoming slow nanoparticle diffusion issues encountered with conventional chromatography supports [158,159]. This permits the use of higher flow rates, which is particularly attractive for large-scale bioprocessing [150,157,160]. A further advantage of these chromatography technologies is that they do not require packing, thus eliminating the problems associated with this procedure.

**Table 3. Chromatography purification methods.**

Purification method	Viral vector	Phase	Chromatography support	Desorption	Yield (%)*	Refs.
<i>Ion-exchange chromatography</i>						
Anion exchange chromatography	LV LV LV LV LV LV LV LV	Membrane Column resin Membrane Monolith Membrane Membrane Column resin	Fractoflow® 80-6 (Merck)‡ HiTrap™ Q (GE Healthcare) Mustang® Q (Pall) CIM® DEAE (Bia Separations) Sartobind® D (Sartorius) LentiSELECT (Sartorius) DEAE resin (Tosoh Bioscience)	2 M NaCl 0.5 and 1 M NaCl§ 1.5 M NaCl 0.45 and 0.6 – 0.7 M NaCl§ - 0.75 M NaCl	45 ± 15† 33 and 17 65 – 56 65 (first peak) 29 44 ± 9 -	[94,150,155,161] [91,93,156]
<i>Affinity chromatography</i>						
Heparin affinity chromatography IMAC Avidin-biotin affinity chromatography	LV His <sub>6</sub> LV DTB LV	Tentacle resin Column resin Monolith Column resin	Fractogel® EMD Heparin (Merck)‡ Ni-NTA agarose (Qiagen) CIM®-IDA Ni (Bia Separations) Monomeric avidin (Pierce)	0.35 M NaCl 0.25 M imidazol 0.15 M imidazol 2 mM biotin	53 ± 1 > 50 - 68	[86,157,166,167]
<i>Size exclusion chromatography</i>						
	LV	Column resin	Sephacryl S-500 (GE Healthcare)	N/A	70 – 80	[150]

\*Refers to step yield published in terms of infectious viral particles, unless otherwise stated.

‡Discontinued products.

§The authors found two peaks of activity using linear NaCl gradients.

†Based on qPCR.

DTB: Desthiobiotin-tagged; His<sub>6</sub>: Hexahistidine-tagged; N/A: Not applicable.

#### 4.2.3.1 Anion exchange chromatography

LV particles are negatively charged at physiological pH. This feature can be exploited for the isolation of LVVs by anion exchange chromatography. Indeed, anion exchange chromatography is widely used for the purification of LVVs (Table 3 and [Figure 3B](#)) [91,93,94,150,155,156,161]. The method offers high selectivity and allows simultaneous concentration of LV particles. Yields from 30 to 65% of active vector particles have been reported (Table 3). Typically, high salt concentrations (0.5 – 1 M NaCl) are necessary to elute virus particles from the anion exchange columns/filters (Table 3). RV susceptibility to high salt concentrations may explain in part losses in viral activity observed during anion exchange chromatography. Previous studies with RVVs have shown that virus activity is negatively affected by NaCl salinity [149]. A virus dilution or desalting step immediately after chromatography needs to be considered to minimize the time of exposure of vector particles to high ionic strength [162]. Interestingly, some reports have shown that two distinct peaks containing active LV particles are obtained upon elution using linear salt gradients (Table 3) [93,161]. This chromatography behavior was observed regardless of the LVV production system (either transiently transfected or BV vector



transduced 293T cells) and regardless of the chromatography support employed (CIM or conventional columns) [93,161]. These research studies highlight the heterogeneity of LV particles in terms of binding strengths to anion exchange matrices. Of note, the majority of the active virus particles are recovered from a first peak eluting at lower salt concentrations (Table 3) [93,161]. The nature of virus particles eluting in a second peak at higher salt concentrations is intriguing. It is tempting to speculate that it comprises either a population of virions possessing a higher number of negatively charged molecules on the surface or small aggregates displaying a larger number of binding sites accessible for multipoint ligand binding. In support of the first idea, an interesting study was reported by Rodrigues *et al.* showing that surface protein-free virus species (obtained by proteolytic digestion) can be separated from intact  $\gamma$ -RV and LV particles by anion exchange chromatography since they bind the chromatography gel less strongly [163]. On the other hand, the presence of virus aggregates that bind anion exchange supports more strongly than single virions cannot be discarded. This phenomenon has been described for monoclonal antibodies [164,165].

#### 4.2.3.2 Affinity chromatography

Affinity chromatography separates biomolecules from complex mixtures based on a highly specific interaction between a target molecule and a selected ligand. The high selectivity of affinity chromatography offers the possibility of reducing the number of purification steps and increasing product yields. In addition, binding capacities, purity and concentration effects are usually high as there are less contaminants competing for binding sites. There are a few reported studies showing purification of LVVs by affinity chromatography (Table 3) [86,157,166,167]. The most straightforward approach is to exploit the natural ability of LV particles to interact with specific ligands. Heparin, an inexpensive generic affinity ligand, has shown to be useful for the purification of LVVs [86]. Using heparin affinity chromatography, LVV particles can be captured directly from clarified supernatants allowing vector concentration and removal of the great majority of impurities. Elution of LV particles from the column is achieved under mild conditions (0.35 M NaCl) resulting in good recoveries of active vector particles (53%) [86]. Of note, heparin interaction with the vector particle has shown to be independent of the viral envelope protein and RVV type. Indeed, the same chromatography purification strategy was successfully applied to the purification of  $\gamma$ -RVVs pseudotyped with VSV-G and RD114 envelope proteins, obtaining similar yields [149,168]. The evaluation of alternative heparin affinity supports with comparable or superior binding capacities, than the tentacle matrix used in the cited

reports, should be explored, as the Fractogel® heparin chromatography resin (Merck) use has been discontinued. Alternatively, LVVs can be engineered to display affinity tags on their surface enabling purification by other affinity chromatography methods. This is the case of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and avidin-biotin affinity chromatography, both of which have been successfully used to purify LV particles [157,166,167]. Several functional VSV-G variants containing randomly inserted hexahistidine affinity tags (His<sub>6</sub>) were identified and could be purified by Ni-NTA affinity chromatography resulting in pronounced reduction of protein and DNA contaminants with good yields (Table 3) [166]. More recently, IMAC monolithic adsorbents were evaluated for the purification of VSV-G pseudotyped His<sub>6</sub>-tagged LVVs [157]. The authors reported that best results in terms of elution efficiency (number of eluted/number of captured vectors) (69%) and concentration factor (1.3×) were obtained using CIM-IDA-Ni<sup>2+</sup> adsorbents. Important losses of functional RV particles due to vector inactivation during chromatography have been repeatedly reported as a concern with IMAC purifications [157,169]. The exact mechanism responsible for LV inactivation was not elucidated but could be attributed to high imidazole concentrations and/or metal-mediated oxidation reactions [157,169]. Alternatively, LVVs have also been metabolically biotinylated, enabling highly efficient affinity-mediated capture by streptavidin paramagnetic particles [170]. Biotinylated LV particles were generated by an engineered 293 T PCL (BL15) in the presence of free biotin in the culture medium. Importantly, because the biotin tag is carried by a host protein that is incorporated into LV particles, the strategy allows the generation of biotinylated LVVs regardless of the viral envelope glycoprotein used for pseudotyping. This technology was improved by Chen *et al.* [167] who further modified the BL15 cell line to generate desthiobiotin-labeled LV particles that could be purified using monomeric avidin-coated chromatography columns (Table 3). By using this modified strategy, they eliminated problems related to the contamination with competing free biotin that reduced the efficiency of viral capture and moderated the binding strength of the column, allowing for gentle elution strategies and high recovery of active LV particles (68%).

#### 4.2.3.3 Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography, also known as gel permeation chromatography, profits from the large size of LV particles (~ 100 nm) compared to most contaminating biomolecules for separation. Using this method, viral particles are excluded from the internal pores of the chromatography gel and recovered in the void volume of the column, whereas most contaminants are retarded inside the pores

and elute later. This chromatography method is commonly introduced in the purification scheme as a polishing step (Table 3 and [Figure 3B](#)). Importantly, size exclusion chromatography allows simultaneous sample desalting and buffer exchange eliminating the need for an additional formulation step [\[91,150\]](#). Because no virus binding occurs during the run and no change in the buffer composition is required for virus elution, this method offers a gentle and straightforward method for viral vector purification [\[147\]](#). However, the use of size exclusion chromatography is also associated with a few practical disadvantages, most prominently its low loading capacity (< 10% bed volume) when operated in conventional peak mode. Moreover, size exclusion chromatography tends to operate at low linear flow rates and typically results in product dilution [\[142\]](#). Some of these caveats can be minimized by operating in group mode [\[171\]](#), although at the expense of method selectivity. Careful selection of the chromatography media is required since the use of resins with pore sizes in the range of the virus size may lead to entrapment of virus particles inside the pores [\[172\]](#). Using suitable chromatography supports, recovery of ~ 70 – 80% LV particles have been reported [\[150\]](#).

**Table 4. Quality assessment tools.**

	Target	Example assay(s)	Refs.
Purity/Identity	Total proteins	SDS-PAGE, Colorimetric assays (Bradford, Lowry)	[91,175]
	Total nucleic acids	Agarose gel electrophoresis, fluorimetry (Picogreen <sup>®</sup> )	[91,151]
	Specific viral proteins or contaminants (e.g., <i>benzonase</i> , <i>host proteins</i> , <i>BSA</i> )	ELISA, Western blot	[91,151,175]
	Specific viral sequences or contaminating nucleic acid sequences from producer cells (e.g., <i>E1A/E1B</i> , <i>SV40 T antigen</i> ) or plasmids (e.g., <i>VSV-G</i> , <i>Gag-Pol</i> , <i>Nef</i> )	qPCR, Southern blot	[91,151,175]
Safety	RCL	RCL amplification in suitable cell line by serial passages followed by suitable quantitation assay	[91,151,175]
	Adventitious agents	(e.g., cell-based assay, PCR)	[91,151,175]
	Mycoplasma	<i>In vitro</i> viral testing, PCR-based test for specific human pathogens	[91,151,175]
	Endotoxins/Pyrogens	Culture-based assay, PCR-based assays	[91,151,175]
	Sterility	LAL test, Rabbit pyrogen test Bacterial and fungal sterility	
Potency	Total virus particles	p24 ELISA, qRT-PCR	[91,151,175,176]
	Active virus particles	Gene transfer/gene expression assays in suitable cell line	[91,151,175,176]
Others	Physicochemical characteristics	pH	[91,151,175]
		Osmolarity	[91,175]
		Appearance	[151,175]

BSA: Bovine serum albumin; ELISA: Enzyme-linked immunosorbant assay; LAL: Limulus amoebocyte lysate; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; PCR: Polymerase chain reaction; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction.

### 4.3 Nucleic acid digestion

LVV stocks are typically contaminated with various amounts of nucleic acids. An important source of DNA contamination is the plasmid used for transient transfection [173]. In addition, cellular DNA and RNA may be released into cell culture supernatants by broken producer cells. Host nucleic acid concentrations in the supernatant typically increase with harvest time [149]. Contamination with nucleic acids not only is undesired from the safety point of view (see Section 4.5) but also increases sample viscosity causing difficulties in different purification steps. In addition, separation of DNA from LV particles is not trivial since they both share common characteristics such as a strong negative charge and a large size. In order to reduce DNA contamination, the use of nucleases such as Benzonase® [173] is commonly introduced at some time during the downstream process (Figure 3B) [91,150]. Optimal nuclease treatment conditions affecting nucleic acid removal (e.g., enzyme concentration, digestion time, temperature) need to be determined case by case since the initial amount of contaminating nucleic acids may vary depending on the particular process being considered. Benzonase reduces DNA to small fragments that along with the enzyme itself need to be removed or reduced to acceptable limits in subsequent purification (residual DNA < 500 bp and residual Benzonase < 100 ng/mL) [151,166]. Introducing the nuclease digestion step early in the process, prior to any concentration step, may be advantageous to maximize the possibility of removal of these digested contaminants in subsequent steps such as TFF, which proved to be efficient [91]. However, the amount of enzyme required to treat unconcentrated virus stocks is higher, which will adversely affect the manufacturing cost [141].

### 4.4 Sterile filtration and storage

Membrane filtration through 0.2 µm pores (sterile filtration) is typically the last operation in the generation of clinical grade biologicals including LVVs [141]. As with other membrane-based operations described above, careful selection of membrane chemistry should be performed in order to avoid virus binding. However, important losses in viral titers may still be observed upon filtration through 0.2 µm pores and some manufacturers prefer to omit this step and instead take every precaution to ensure product sterility at all steps of the manufacturing process [151]. LVVs are usually stored at -80°C to protect the virus from thermal inactivation. Viral vector stocks should be formulated under conditions that guarantee maximum stability during storage. Some manufacturers formulate the purified vector stocks in the protein-containing medium used for *ex vivo* cell culture [91]. Little work about these

critical aspects has been reported. An interesting study reported by Carmo *et al.* revealed that the half-life of LVVs at 4°C can be increased by addition of recombinant human albumin and lipoproteins to the storage buffer [174].

#### 4.5 Quality assessment of purified LVV stocks

Any LVV preparation intended for human use must be fully characterized to guarantee product quality, safety and efficacy. Characterization tests are required in GMP manufacturing and to enter clinical trials but only a few studies of clinical-grade LVVs have been reported so far [91,151,175]. In all cases, the LVV preparations analyzed were destined to *ex vivo* gene therapy applications, as is the case with most LVVs being evaluated in clinical trials. Because of the lack of sufficient information with novel applications such as the use of LVVs for *ex vivo* treatments, limited regulatory guidelines specific for LVVs are presently available and in most cases the directives are quite broad [176]. In the reported studies mentioned above, results from purity, safety and potency analyses of LVV lot(s) are shown. The methods used to evaluate these parameters are reviewed in Table 4. Purity tests include determination of residual levels of total proteins and nucleic acids. Also, residual levels of specific protein contaminants are reported, such as benzonase, host 293 proteins and culture medium-derived bovine serum albumin (BSA) as determined by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Regarding vector safety, of particular concern is the presence of E1A and/or SV40 large T-antigen DNA sequences that may be released by producer cells as they possess oncogenic traits [91]. In addition, the presence of contaminating plasmid-derived sequences, particularly VSV-G or *gag/pol*, is undesired. Quantitative detection of these nucleic acid sequences can be performed by real-time polymerase chain reaction (PCR). The absence of RCL must also be demonstrated using a suitable assay. More common safety testing including adventitious agents, mycoplasma, endotoxins, sterility tests as well as analyses of the physicochemical characteristics of the final vector stock (e.g., pH, conductivity, etc.) are carried out. Finally, to demonstrate vector transducing activity (potency) and lot-to-lot consistency, viral vector concentration measurements (functional and non-functional) are reported.

As LVVs progress into clinical trials, more applications are found (both *ex vivo* and *in vivo*) and more knowledge is accumulated and regulatory requirements and specifications will most likely increase. The complex nature of LV particles complicates a thorough evaluation of final vector purity. In contrast with other widely used vectors for gene therapy, there is no international standard reference material

for LVV products [91]. Regarding the composition of LV particles, it should be noted that besides known viral proteins (Figure 2A), minute amounts of host proteins can be incorporated on the virus surface or inside the virus particles. Extensive studies have been performed to identify host proteins incorporated into wild type HIV-1 virions [177,178]. More recently, proteomic analyses of highly purified  $\gamma$ -RVVs [179] and LVVs [180,181] allowed the identification of cellular HEK 293 proteins associated with VSV-G pseudotyped vector particles. The nature and quantity of these proteins will likely vary depending on the cell line used for vector production and/or specific vector pseudotype being considered. In addition, RV particles are known to unspecifically package host RNA species [182,183]. The presence of these host components associated with LV particles should be taken into account when evaluating vector purity. The possible implications of having these host components in purified vector preparations (either incorporated or adsorbed to the vector surface) for product quality and safety are rarely discussed at the moment. Removal of host components located in the interior of the LVV particles seems unfeasible using current technologies. Another critical aspect is the availability of suitable quantitation assays. Because active viral titers are affected by multiple assay variables (e.g., target cell, inoculum volume, incubation time, etc.), it is difficult to compare results obtained by different laboratories in the absence of standardized quantitation methods and LV reference materials [91]. The concentration of total vector particles is usually estimated by an immunosorbent determination of p24 concentrations, even though most p24 ELISA kits cannot distinguish between assembled and disassembled p24 protein. Other commonly considered total quantitation methods include assessment of reverse transcriptase activity and determination of genomic RNA [184]. Interesting tools for determination of total viral particle count and size distributions are available (e.g., ES-DMA, AF4, NanoSight and qViro instruments), although they are still rarely used for viral vector quantity or quality (e.g., aggregates) assessment. The ratio between total and active particles provides a good indication of vector quality. LV particles, and RVs in general, are produced with poor ratios (over 100:1) that could be further affected during purification [142,145]. Monitoring this parameter could help identify critical downstream processing steps.

## 5. Expert opinion

LVVs are powerful tools to stably modify genome in dividing and nondividing cells. For instance, these vectors have been used with success to generate IPS cells [185-187] and are promising tools for gene therapy [28,30]. At present, no gene therapy product has received the regulatory authority approval yet, but a rapidly growing number of advanced clinical trials using gene therapy-based LV are initiated [2] and at least one company developing these products has emerged (Oxford BioMedica, Ark therapeutics).

Safety has been the first objective in the LVV production for therapeutic applications and the vector design has now led to the third generation of these vectors. However, a single clinical trial treatment can require as much as  $10^{12}$  LVV particles [3], which at the average production titer represents hundreds of culture liters. Consequently, LVV production process intensification is one of the major challenges to meet for the maturation of LVVs as a relevant gene therapy vector.

Despite improvements made to this day, few new scalable efficient systems to produce LVVs have been developed. The most efficient ones produce up to  $10^{11}$  particles per batch after concentration into relatively low culture volume [91,92]. These production systems combine improvements of the design vector, the transfection agent, the stable cell line selection and the cell culture process resulting in at least a  $10^4$ -fold increase in productivity compared to the average method [13].

Stable and transient productions have each their own drawbacks. The development of stable cell line is still laborious and the transient production, although undoubtedly faster and cheaper than stable production, is difficult to scale up because of important batch-to-batch variability. Consequently stable production appears as the best system to produce LVVs at large clinical and commercial scale.

One of the inconveniences in LVVs stable production is the expressed viral protein cytotoxicity. At present, to get around this problem, gene regulation mechanisms are used in stable production systems [118,121,124]. Nevertheless, current regulation systems depend on either addition or removal of an induction agent complicating the purification process. Yet, other regulating systems, not requiring administration or removing of an exogenous chemical, could be engineered. Indeed, photon inducible expression systems have been identified [188-192] and could be applied to LVV production. One of these systems is based on the red light-induced binding of the plant photoreceptor phytochrome to the



protein PIF3 and the reversal of this binding by far-red light. Authors have developed a promoter system in yeast cells that can be induced, rapidly and reversibly, by short pulses of light [190]. Another strategy for the photoregulation of gene expression is the use of photoresponsive DNA binding to a photoisomerizable molecule. By covalently attaching azobenzene as a photoswitch to the T7 promoter, the transcriptional reaction can be photo-controlled based on the reversible *cis-trans* photoisomerization of azobenzene [188].

Among all the cytotoxic viral proteins in LV, only the protease is useful to allow the virus packaging. HIV protease promotes its cytotoxicity by cleaving and activation of procaspase 8 leading to the release of cytochrome c from the mitochondria, resulting in caspases 9 and 3 activation followed by nuclear fragmentation (apoptosis) [193,194]. It is now well established that many viruses such as HIV act on molecular mechanisms involved in apoptotic processes. Otherwise, VSG protein used to pseudotype LVVs is also cytotoxic. Consequently, cell lines overexpressing antiapoptotic genes should be seriously considered to extend the LVV production. Such experiments have already been reported for recombinant protein expression and have shown their potential to increase productivity [195-200].

In the same way, metabolic engineering of producing cell lines has shown positive effect on recombinant protein production [201-203] and could be used to optimize LVVs yield.

It is widely accepted that stirred bioreaction systems using suspension cultures offer more advantages compare to adherent systems. Furthermore, the most efficient culture systems such as bag bioreactor, cell factory system and HYPERFlask are expensive and destined to single use. These systems can therefore not be considered to produce LVVs for late phase clinical trials and commercial applications. At present, bioreactor appears to be the best system to produce LVVs and other biomolecules because it can be used repeatedly, scaled to large volume, operated in fed-batch mode to improve yields and be strictly monitored and controlled.

The cell culture parameters used in the bioreaction may have a profound effect on the virus titer by affecting cellular productivity and vector stability. Moreover, the optimal cell culture parameters have been shown to be producer cell line and viral vector-dependent. Therefore, identifying and controlling these parameters are useful to elaborate a robust production process. Previous works have already analyzed the impact of physiochemical parameters [204-209] and medium components [209-211] mainly for the RVV production. Most of these publications have reported that the PCL metabolism



influences the productivity performances, in particular lipid biosynthesis, thus suggesting it to be an important target for further improvement of RVVs and LVVs. However, no LVV production study so far has reported the simultaneous analysis of multiple parameters. This could be achieved using statistical design of experiments, classically used to optimize biomolecule production [\[212\]](#) or cellular growth [\[213\]](#). This could lead to much more efficient production and purification systems in the future, with better characterized and more stable products.

### **Declaration of interest**

The authors state no conflict of interest and have received no payment in preparation of this manuscript.

### **Acknowledgment**

MM Segura and M Mangion contributed equally to this review.

## Annexe B

### **Non-viral nucleic acid delivery methods**

Igor Slivac, David Guay, Mathias Mangion, Juliette Champeil & **Bruno Gaillet**

Pages 105-118 | Received 20 May 2016, Accepted 12 Oct 2016, Accepted author version posted online: 14 Oct 2016, Published online: 09 Nov 2016, in Expert Opinion on Biological Therapy.  
<https://doi-org.acces.bibl.ulaval.ca/10.1080/14712598.2017.1248941>

#### **Abstract**

**Introduction:** Delivery of nucleic acid-based molecules in human cells is a highly studied approach for the treatment of several disorders including monogenic diseases and cancers. Non-viral vectors for DNA and RNA transfer, although in general less efficient than virus-based systems, are particularly well adapted mostly due to the absence of biosafety concerns. Non-viral methods could be classified in two main groups: physical and vector-assisted delivery systems. Both groups comprise several different methods, none of them universally applicable. The choice of the optimal method depends on the predefined objectives and the features of targeted micro-environment.

**Areas covered:** In this review, the authors discuss non-viral techniques and present recent therapeutic achievements in *ex vivo* and *in vivo* nucleic acid delivery by most commonly used techniques while emphasizing the role of 'biological particles', namely peptide transduction domains, virus like particles, vesicles and exosomes.

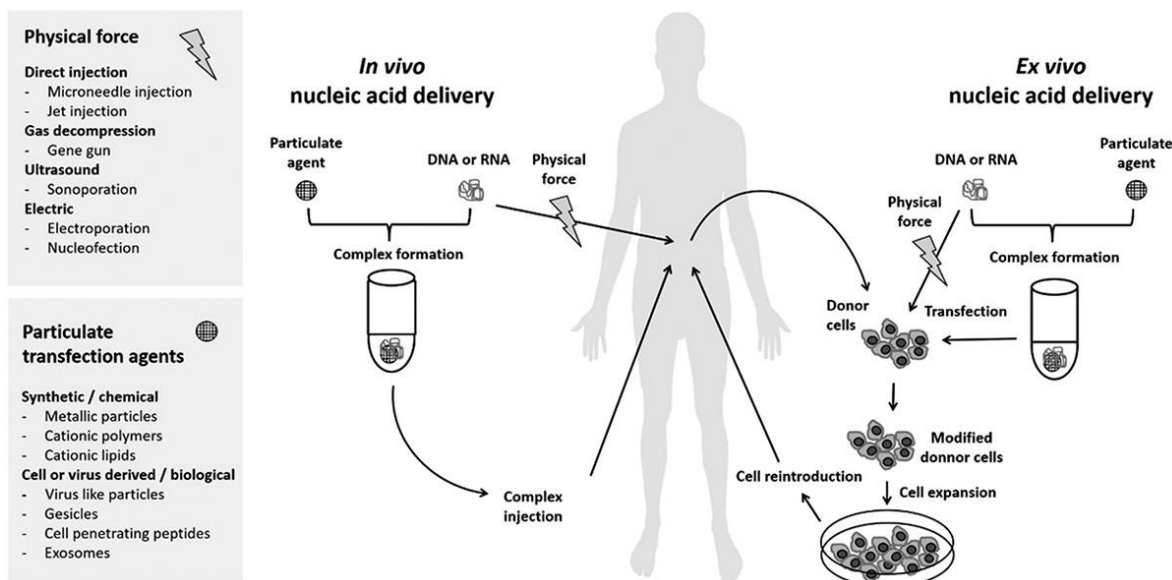
**Expert opinion:** The number of available non-viral transfection techniques used for human therapy increased rapidly, followed by still moderate success in efficacy. The prospects are to be found in design of multifunctional hybrid systems that reflect the viral efficiency. In this respect, biological particles are very promising.

**KEYWORDS:** Nucleic acid delivery, physical transfection, particle mediated transfection, peptide transduction domains, virus derived particles, exosomes.

## 1. Introduction

DNA delivery methods, commonly referred as DNA transfection, comprise insertion of a foreign gene into eukaryotic cell nucleus for expression of an encoded protein. More recently, following the elucidation of silencing RNA mechanism, RNA has emerged in the market of nucleic acid delivery systems mainly in the form of small interfering RNA (siRNA), small hairpin RNA (shRNA), and micro RNA (miRNA). Despite respective structural and functional differences between DNA and RNA, both molecules are negatively charged and thus may share delivery methods. The transfection journey of RNA aims the cytosol when DNA needs to transit up to the cell nucleus to be effective. However, RNA molecules are more fragile and more likely to degrade than DNA, hence relatively high doses are needed to achieve the desired level of gene silencing, and the treatment must be ongoing. Nucleic acid delivery systems are commonly used in cell culture technology (e.g. cell line development and recombinant protein production), vaccination, as well as regenerative medicine and gene therapy. Gene therapy approaches may target nucleic acid delivery in a specific tissue or in the whole body (*in vivo* therapies) or be applied on extracted cells (*ex vivo* therapies) where modified cells are reintroduced in the patient (see [Figure 1](#)). Favored by millions years of evolution, viruses are currently the most efficient nucleic acid delivery method used to developed human therapy. Despite their demonstrated efficiency, the application of virus is restricted by their immunogenicity, tissue tropism, costly production, and biosafety constraints. Even with more than 25 years of industrial and academic researches, companies failed to bring virus-based gene therapy on market in the United States or European Union [1]. While being aware of recent progresses with *Glybera* and *Strimvelis*, earlier failures in gene therapy still shadow the use of virus as system delivery [2]. To overcome virus limitations, nonviral nucleic acid delivery systems raise as a promising alternative. Two main classes of nonviral delivery methods have been developed, aiming to overcome cellular and immunogenic challenges. One involves physical force administered on cells for the uptake of naked nucleic acid molecule. The other is based on formation of composite structures made of nucleic acids and substances of natural or synthetic origin. Clinical trial status (from 2010 onward) of nonviral delivery methods of DNA and RNA molecules is summarized in Supplementary Tables 1 and 2, respectively [3]. These methods make just one quarter of all gene therapy trials, a value that reflects the performance superiority of viral particles. Treatments using plasmid DNA with therapeutic gene of interest dominate in quantity over RNA-based gene silencing. Injectable physical methods, often followed by electroporation (EP), are largely applied in trials using DNA for immunization against

infectious diseases. DNA conveyance by highly functionalized cationic lipids and polymers is currently tested for several cancer treatments and viral infections. Because RNAs are relatively unstable, the pharmacokinetics of a particle-based mediation approach delivered most commonly used cell-penetrating red systemically is usually much effective than a naked RNA approach. Consequently, therapeutic siRNA is often complexed with conjugated liposomal particles and administered by injection for various cancer, viral infection, and physiological disorder therapies. Despite the abovementioned, naked RNA is still being tested after direct application on the target tissue or when conveyed by EP *ex vivo*, as demonstrated by clinical trials for certain ocular diseases, viral infections, and tumors. Depending on the biological environment and route of delivery, vectors for nucleic acid trafficking deal with several challenges before reaching the target cells. Successful *in vivo* gene conveyance is regularly more complex than *in vitro* (*ex vivo*) due to the larger number of extracellular/physiological obstacles. Applying physical force for cell transfection in both types of treatments is a nonspecific cell procedure with mostly localized effects. On the other hand, particle-based systems are ideally designed for broad and active systemically delivery with a great potential to precisely target tissue or organ. During treatments *in vivo*, vectors have to overcome clearance from the organism and protect the nucleic acids from degradation during their journey through the bloodstream and extracellular matrix. Once they reach the target cells, the forthcoming challenge is crossing the cell membrane by mechanical disruption, lipid fusion, or charge affinity. When internalized, large molecules such as nucleic acids are likely to remain trapped and eventually eliminated through the endosomal and lysosomal systems. To circumvent such undesired outcome, commonly employed nonviral delivery strategies are developed to avoid endocytosis or favor rapid endosomal escape. Unlike RNA, DNA delivery must also provide transport into the nucleus to allow access to the transcriptional machinery. Before nuclear localization, the molecules are susceptible to enzyme degradation and cytoskeleton networks entrapment in cytosol. Furthermore, intracellular accumulation of delivery agents is often associated with cell toxicity. Development of transfection compounds properly degraded and recycled by cells should decrease toxicity but it still remains challenging. Constant progresses and investments have been achieved but still no nucleic acid delivery system, viral and nonviral, succeeded to fully meet current scientific and clinical needs.



**Figure 1. Concepts of *in vivo* and *ex vivo* non-viral nucleic acid delivery.** A nucleic acid molecule binds to a particulate agent mostly in charge-based interaction and forms a condensed complex suitable for accessing the cells. The alternative approach is delivery of naked nucleic acid molecules into the cells by applying external physical force that transiently destabilizes cellular membrane. *In vivo* nucleic acid delivery is introduction of nucleic acid into a patient's body where the molecule modifies cells after reaching the target tissue. *Ex vivo* approach involves transfection of donor cells isolated from a target tissue. The transfection is done *in vitro* using generated complexes or a physical force and is followed by reintroduction of modified cells into the patient's body.

## 2. Physical methods

These methods involve induction of transient mechanical disruption of cell membrane for localized delivery of naked nucleic acid molecules. The genetic material is introduced into cells without necessity for complexation with any supporting chemical agent.

### 2.1. Microneedle and jet injection

The concept of microneedle technique is direct DNA injection into a target tissue through a syringe with an array of tiny needles. Delivery of DNA is mostly localized in the area around the needle track, suggesting that the molecule uptake is driven by physical damage induced through needle insertion together with pressure required for solution injection. In order to avoid tissue damaging effects of jet-

pressure, experts developed microneedles coated with therapeutic DNA. More recent improvement, especially in terms of method scalability and disposability, was a design of polymeric microneedle arrays that dissolve in treated tissue and release entrapped nucleic acid [4]. The efficiency of technique depends mostly on therapeutic molecule quantity loaded, coated, or entrapped in microneedles. Various water-immiscible and nonionic agents, as well as grouping with other physical methods, have been tested to enhance the overall gene expression [5]. The method's potential for gene therapy is briefly summarized in a paper by Chen et al. [6]. So far, many tissues have been transfected by DNA needle injection, with considerable number of clinical trials for cancer and certain vascular disorders therapy currently going on (Supplementary Table 1). The method has been useful in evaluation and development of various aspects of DNA-based vaccination [7] with human immunodeficiency virus (HIV) and influenza treatment being in the clinic. The needle-free variant of delivery is called jet injection. This approach uses nucleic acid solution distributed *in vivo* by a fine stream of high pressure gas that generates pores in cell membranes. Variants of procedures developed for immunization and local tumor treatment with naked DNA proved to be efficient [8]. Currently, it is used for clinical studies of viral infections and lymphomas as well as ovary and breast cancer treatments (Supplementary Table 1).

## 2.2. Gene gun

This method is based on application of heavy metal nanoparticles (gold, tungsten, silver) that are coated with DNA and then directed into a target tissue or cells. The particles are accelerated to adequate velocity by highly pressurized inert gas or high-voltage electronic discharge [9]. In combination with microneedle injection on skin surface, it can be even more efficient because it delivers DNA deeper into the target tissue where it is less tissue damaging due to the lower gas pressure required [10]. Besides numerous tests *ex vivo*, using gene gun *in vivo* has been extensively assessed for intramuscular, intradermal, intra-tumor, and *in utero* DNA delivery [11,12]. Used for vaccination, this technology produces stronger immune response with lower doses applied compared to microneedle injection. Delivery of plasmids coding for HPV oncoproteins fused to herpes virus glycoprotein D resulted in full prophylaxis and tumor growth arrest in mice models. Interestingly, the gene gun approach proved feasible for intradermal delivery of an Alzheimer's disease DNA vaccine, which resulted in strong humoral effect against amyloid- $\beta$  peptide and amyloid plaques in mouse brain tissue [13].

### 2.3. EP

EP is an exposure of biological membranes to electric field that leads to a rapid increase of their permeability by forming transitory aqueous pores. The size and duration of pores allow trafficking of variety of molecules inside cells. Performing a cell-specific optimization is essential and so far it has been done for many cell lines *in vitro*, including some primary and difficult-to-transfect cells [14]. There are growing number of reports regarding the methodology of nucleic acids transfer using *in vivo* EP. Most of them involve physical tissue modifications to enhance transfection level and DNA or RNA distribution. Moreover, DNA vaccines delivered into the muscle or directly into the tumor tissue by EP are effective in stabilizing cancer progression. Safe and efficient protocol for bone regeneration therapy applying EP was also reported [15]. EP of melanoma and other solid tumors after plasmid injection or *in ex vivo* therapy with RNA has reached clinical trials [16]. A single plasmid coding for a transgene and shRNA is used for personalized immunotherapy (*Vigil*<sup>TM</sup>) preventing tumor advancement [17]. Despite the achievements in cancer treatment, EP currently dominates in trials on DNA vaccination against several viral infections and malaria. In a HIV DNA vaccine study, the level of HIV specific immune responses was increased 70-fold by using intramuscular *in vivo* EP as compared to intramuscular delivery alone [18]. A more recent type of EP is known as nucleofection. It uses a precise combination of electrical parameters with cell-type specific reagents to enable transfer of nucleic acids directly into the nucleus. This method allows for transfection of nondividing and difficult to transfect cells including primary cells, mammalian neurons, etc. *Ex vivo* human myoblasts nucleofection resulted in 60% of eGFP transfectants and showed 15-fold increase in stable expression of another transgene [19]. Compared to lipofection, nucleofection-mediated plasmid delivery into primary human keratinocytes resulted in higher and faster  $\beta$ -galactosidase expression, but lower cell viability [20].

### 2.4. Sonoporation

Sonoporation employs ultrasound to briefly permeabilize cell membrane and introduce exogenous nucleic acid molecules into cells. The presence of microbubbles, tiny gas-filled spheres (1–10  $\mu\text{m}$ ) stabilized with shells, assists in sound scattering and lowers the threshold of membrane cavitation. Localization of gene delivery is achieved by ultrasound-induced collapse of microbubbles that are passing together with nucleic acid molecules through a target area via bloodstream. A report of Browning et al. on using needles of progressively smaller gauge for intravenous microbubble injection showed a threefold increase in transfection efficiency [21]. Sonoporation has been used *in vitro* as well

as *in vivo* in animal models to treat diabetes, cardiovascular diseases, and certain cancers. It has also shown to enhance the permeability of blood–brain barrier [22] as well as to stimulate bone tissue regeneration [23]. Modification of microbubbles through polymer coating leads to increased transfection efficiency. In that manner, Un et al. used lipoplex bubbles with mannose to perform DNA vaccination against metastatic melanoma [24]. Targeted gene delivery can be achieved through microbubbles equipped with site specific ligands that ensure gene transfer to certain tissues and its nuclear import [25].

### 3. Particle mediated methods

Transfection based on particulate carriers that bind charge dependently to nucleic acids and form condensed complexes is currently the most extensively used nonviral nucleic acid delivery approach. The carriers differ in their size, shape, physical, and chemical properties, hence their diverse transfection efficiency. They are engineered to protect molecules from degradation and denaturation as well as to be minimally toxic and immune-responsive when applied *in vivo*. In many cases, efficiency of one particulate agent can be improved by modification with another one (functionalization). The most ‘natural’ transfection particles include peptides and cell-derived vesicular structures that owing to their biological background can mimic either physiological or viral strategies in accessing target cells and cargo trafficking. Their transfection efficiency can be improved by means of molecular biology techniques used to redesign the particle composition.

#### 3.1. Metallic particles

The properties of metallic particles are well explored, particularly those made of gold. Platinum and silver particles have also been studied, but due to their toxicity, they are of limited interest. The surface of golden particles can be covalently functionalized by various techniques, mostly using thiols. These particles can form clusters of defined size and strongly interact with DNA for gene delivery [26]. Nanorods form particles having photothermal properties. When irradiated with the near infrared light, the nanorods are locally exothermic. Therefore, a controlled release of DNA loaded on the particle surface is achievable. By detaching denaturated ssDNA in this manner, cancer cells can be selectively destroy *in vivo* [27]. Specific gene inhibition using siRNA on golden nanoparticles in melanoma patients has also been reported [28]. The manner of particle delivery depends on its functionalization, and it is achieved by either intravenous or direct injection. Recently, topical delivery of covalently bound siRNA



proved to be a very efficient method for potential clinical application [29]. Metallic particles such as magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) that possess high magnetic moments are relatively nontoxic and simple to prepare for gene delivery purposes. Application of magnetic field on these particles linked with DNA has been performed in numerous *in vitro* and *in vivo* models and proved effective for spatial transfection targeting. This method is referred as magnetofection. Functionalized magnetic particles suggested a great potential in inhalation therapy when used in the form of an aerosol for targeted delivery of plasmid DNA to the lungs [30]. Nevertheless, it is still necessary to improve particle properties in order to prevent excessive agglomeration as well as to ensure conditions for nucleic acid loading and sustainability. Recent status and prospects of magnetofection were broadly reviewed by Plank et al. [31].

### 3.2. Cationic polymers

The capacity for functionalization and hybridization makes cationic polymers an attractive tool in the gene delivery domain. Early trials were performed using vector properties of poly-L-lysine (PLL). This polymer however had poor transfection efficiency because of its insufficient buffer capacity to disrupt endosomal membranes [32]. Numerous modifications of PLL, mainly containing polyethylene glycol (PEG), enhance *in vivo* cargo conveyance and reduce toxicity. PEGylated PLL was tested as a vector to treat cystic fibrosis and showed certain evidence of safety and efficacy [33]. The most broadly studied cationic polymer is poly(ethyleneimine) (PEI). This polymer of aziridine with high amino group density has a strong buffering potential over a wide pH range. This property is a crucial factor for efficient nucleic acid release from endosomes during transfection [34]. Branched and linear forms of PEI can be obtained and used for transfection of numerous cell types *in vitro* and *in vivo* linear PEI is extensively applied *in vivo* mostly in direct tumor treatment. However, the results obtained are still not satisfactory and somehow contradictory to preliminary *in vitro* studies [35]. The transfection efficacy of both PEI forms largely depends on their molecular weights and the most commonly used polymers are of 25 and 22 kDa, respectively. Dense positive charge however often makes them cytotoxic and nonbiodegradable. A low molecular weight PEI (LMW PEI < 10 kDa), despite being less efficient as transfection agent than its heavier variance (HMW PEI), also showed to be less toxic [36]. A strategy explored by several laboratories consisted in the conversion of LMW PEIs into HMW PEI through cross-linking with biodegradable linkages. The point was to allow the transfected cells to convert a HMW PEI into LMW PEI fragments that could be eliminated from cytosol more easily [37]. Both covalent and non-

covalent modifications of PEI with sugars, peptides, and lipids have been performed to improve its physicochemical properties and cell-specific uptake [38]. Standardly, PEG is often used to shield the excessive positive charge, reducing cytotoxic effects, and postpone bloodstream clearance effects [39]. In the clinic recently, PEI has not been very successful (Supplementary Table 1). HIV immunotherapy based on topical application of DNA complexed with PEI and glucose yielded no clinical benefit, despite promising preclinical results [40]. PEI poliplex upgraded with PEG and cholesterol has been used in four cancer therapies with plasmid coding for IL-12, a cytokine known to promote strong immune response against tumor cells. However, the majority of trials involving the cytokine failed so far to show sustained antitumor response and were associated to toxic side effects [41]. Complexation of PEI with siRNA exhibits promising results in cancer research. *In vivo* experiments on bio-distribution and cellular uptake of siRNA mediated by PEI or its derivatives show that gene knockdown can serve as a relevant approach in treating lung tumor [42] and work synergistically with agents against tumor angiogenesis development [43]. Another attractive polymer with strong potential in controlled drug release is chitosan. This polysaccharide is derived from chitin, a natural polymer abundantly found in certain invertebrates and fungi. Its origin ensures good biocompatibility and excellent *in vivo* toxicity profile. An extensive review on chitosan properties and its use for *in vitro* and *in vivo* nucleic acid delivery was recently given by Buschmann et al. [44]. Chitosan and its functionalized derivatives have been increasingly studied for delivery of plasmids expressing therapeutic proteins in animal models for variety of applications including cancer, diabetes, blood conditions, osteoarthritis, corneal disease, burn injuries as well as in DNA vaccination using various route of administration. Similarly, recent reports on chitosan-based siRNA mediation *in vivo* show interesting progress in gene silencing for cancer therapies [45] and suggest improvements in blood–brain barrier drug delivery [46]. A unique category of cationic polymers with globular structure is represented by dendrimers. They are highly complex molecules with well-defined configuration separable in three major regions: a central core (one or several atoms of similar properties), layers of branched repetitive units emerging from the core (polymers), and functional end-groups which play a key role in oligonucleotide complexation. The most widely used are poly(amidoamine) (PAMAM) and poly(propylenimine) dendrimers. Their chemistry is quite adaptable thus offers incorporation of a broad range of molecules with different functionality, including those for gene delivery. Dendrimer properties and application in gene delivery are extensively described in [47]. Due to the reduced efficiency when introduced via intravascular administration, many tests *in vivo* have focused on local or *ex vivo* administration in various tumor, brain, liver, lungs, and

ocular tissue. A detailed review on siRNA gene silencing using dendrimers is given by Wu et al. [48]. A second generation of cationic carbosilane complexed with specific siRNA reduced HIV-1 infectivity by targeting expression of HIV virulence factor Nef in primary human astrocytes without cytotoxic effects. The same dendriplex tagged with FITC entered the brain crossing an *in vivo* blood–brain barrier model [49]. Certain conflicting data about transfection efficiency of commonly used cationic polymers were puzzling researchers for years. However, very recently a thorough chemical, physical, and *in vitro* characterization of PEI, PLL, and PAMAM has pinpointed polymer-specific variations and found that the plasmid concentration in the culture medium is a key parameter affecting gene delivery [50]. Cationic polymers have been widely used for design of a new generation of structurally complex drug delivery vehicles with composition and behavior modifiable by specific physical or chemical signals from the target cells or their environment. Action of other biomolecules, changes of redox potential, pH, local pressure, and temperature have shown the potential to precisely trigger structural modulations of these stimuli-responsive nanoparticles, facilitating the location appropriate release of nucleic acid cargo [51]. For instance, researchers have recently conjugated phenylboronic acid (PBA) with a sugar molecule attached to LMW PEI which enabled the polymer crosslinking and formation of HMW PEI. The resulting particle was additionally PEGylated and as such had a strong affinity for DNA and a capacity to target cancer cells by interaction with highly sialylated membrane glycoproteins. Inside the cells, the bond of PBA and sugar was disrupted by either acidic endosomal pH or intracellular ATP, so the gene payload was released effectively [52].

### 3.3. Cationic lipids

Due to its efficiency, the transfection mediated by cationic lipids, also referred to as lipofection, is the most widely studied nonviral gene delivery method. At present, hundreds of lipid-based formulations have been developed and investigated for gene transfer and some of them made to clinical trials as referred in Supplementary Tables 1 and 2. When mixed with nucleic acids, lipid-based agents charge dependently form structures called lipoplexes that surround the cargo and shield it against extracellular or intracellular nucleases. All cationic lipids (DOTMA) share the common property to spontaneously form small spherical structures known as liposomes. They are composed of positively charged hydrophilic head and hydrophobic tail that are connected via a linker structure. The most frequently engaged hydrophilic head groups are primary, secondary and tertiary amines, or quaternary ammonium salts. The hydrophobic tails are largely made of two types of hydrophobic components,

aliphatic chains, and compounds of steroid structure. The link between the hydrophilic and hydrophobic fraction forms ether, ester, carbamate, or amide bond. It determines the level of compounds biodegradability. Neutral lipids (DOPE) and cholesterol are frequently included in liposomal formulation as 'helper lipids' to promote transfection efficiency and particle stability. DOPE has fusogenic properties and is frequently used in pH-sensitive liposomal formulations of stimuli-responsive particles. Upon endocytosis of DOPE-containing formulations, the acidic environment triggers DOPE's fusion with the endosomal membrane leading to its destabilization. Therefore, incorporation of fusogenic DOPE in the cationic liposomes significantly improves the endosomal escape by membrane fusion and destabilization resulting in the higher transfection efficiency and gene downregulation [53]. To date, lipofection has been administered successfully to deliver nucleic acids in numerous cell types *in vitro* as well as in lung, muscle, brain, skin, and various tumors by local administration or intravenous injection *in vivo*. However, major obstacles for practical use of lipoplex-mediated transfection *in vivo* are acute toxicity and triggered immune response that reduces the lipoplex half-life inside treated organism. Therefore, surface coating through application of hydrophilic and charge neutral polymers such as PEG to reduce excessive interaction seems very effective in stabilizing functionality of lipoplexes in blood stream [54]. In that manner, a major advance has been achieved with PEG-incorporated lipid-based particles such as the stabilized nucleic acid lipid particles that have shown a great potential in siRNA cancer therapy [55]. Yet, in many cases, PEG-modified liposomes have lower transfection efficiency due to reduced contact of lipid component with the cell membrane or due to the inhibited endosomal escape. To bypass these problems, conditionally diffusible PEG–lipid complexes were designed, including various forms of pH-sensitive chemical bonds that facilitate decomplexation inside acidified endosomes [56]. Vaxfectin® is a proprietary cationic lipid-based formulation composed of a cationic lipid (GAP-DMORIE) and a neutral phospholipid (DPyPE) which, when combined in aqueous solution, self-assembles to form liposomes. Besides being a transfection agent, the product has also shown adjuvant properties in DNA-based vaccination. Recent clinical trials have evaluated efficiency of influenza, dengue, and genital herpes simplex DNA vaccines formulated with Vaxfectin® [57]. For effective tumor targeting, complex lipid structures coated with receptor ligands or monoclonal antibodies were tested with successful outcome [58,59]. In that manner, lipoplexes labeled with folate proved to be very efficient for *in vitro* and *in vivo* DNA and RNA mediation to cancer cells that standardly overproduce folate receptor [60]. The clinical trials testing liposomes coupled with anti-transferrin single-chain antibody for therapeutic plasmid trafficking in patients with advanced solid

tumors demonstrated favorable dose response and successful overexpression of the transgene in tumors compared to normal tissue [61] (Supplementary Table 1).

### 3.4. PTDs

PTDs, also referred as cell penetrating peptides, are short protein sequences, generally containing less than 20 amino acids and carrying a net positive charge, that independently mediate direct internalization of diverse molecules across cellular membranes. First, PTDs were isolated from the *Antennapedia* homeodomain protein of *Drosophila melanogaster* [62] and the transactivator of transcription (TAT) protein of the HIV [63]. Other PTDs derived from virus, bacteria, insect, or computational designs have been since described (Table 1). PTDs have become widely used to develop tools for cell delivery of high molecular molecules, namely proteins, phage vectors, liposomes, and, in the scope of this review, DNA and siRNA. Chemical and automated methods can be used to synthesize high purity PTDs to deliver nucleic acid either by direct covalent linkage or by non-covalent interactions through charged amino acids [64]. Moreover, peptides have been incorporated into existing transfection reagents, such as cationic lipids [65] or PEI [66], improving delivery. However, pricing of chemical synthesis rapidly increases with quantity required and length of the peptide. One alternative is to produce protein containing PDT using recombinant DNA technology. Recombinant proteins containing PTD fused to DNA or RNA binding domain succeeded to deliver DNA in cells [67]. Both synthetic peptides and recombinant proteins allow design of virtually any amino acid sequences opening possibility in computational optimization and domain combinations to improve nucleic acid delivery efficiency. Moreover, peptide modifications, like using D-amino acids or chemical modifications such as stearylation, have been proven useful to improve *in vivo* stability or delivery efficiency [68,69]. Promising future of PTD as DNA delivery tool *in vivo* is based on the rapid and homogeneous internalization in a large number of cell types. Study shown passage of PDT across the blood–brain barrier indicates advantage over current delivery methods [70]. Comparatively to chemicals and lipids, which tend to accumulate in cells and to be toxic [71], synthetic peptides and recombinant proteins are degraded by regular cell mechanisms resulting in amino acids recycling. *In vivo* biodistribution of PTD-containing protein was confirmed following portal vein, intravenous, or intraperitoneal injections in mice and shown accumulation in liver and bowel, spleen, lung, and brain [72]. Injection in mouse with 1 mg of a TAT PTD fusion protein per kilogram of body weight during 14 consecutive days produced no systemic distress opening the possibility of *in vivo* therapy. In addition, no adverse effects have been

reported over 25 clinical trials implicating PTD-mediated macromolecule delivery, suggesting that an approach based on PTD will be safe for clinical trial development [73]. Although controversial, PTDs could penetrate cell membrane through all identified endocytic pathways, and at certain conditions, they use direct penetration bypassing endocytic routes. However, PTD, in association with large molecular weight molecules, such as DNA, tends to remain trapped in the endosomes leading to lysosomal degradation and limiting its availability [74]. Despite it is still early to properly evaluate the complete potential of PTD in nucleic delivery for clinical therapy because of the potential risk of immune response, cell toxicity, or lack of efficiency due to endosomal entrapment, it is reasonable to assume that PDT might be an alternative of current nucleic acid delivery methods for therapeutic applications. Initial studies about siRNA delivery using PTDs were focused on the mechanism of electrostatic interaction between the two partners [75]. A successful downregulation of tumor growth was followed by injection of novel PTD–siRNA complex in a prostate xenograft mouse model [76]. Subsequently, the covalent attachment of PTDs to siRNAs to achieve a soluble, monomeric siRNA was investigated. However, the control of localized siRNA dissociation from the complex seems to be the major difficulty [77]. PTDs can be covalently linked to siRNA duplexes through disulfide bond formation in which PTDs containing N-terminal cysteines are conjugated to siRNA molecules with a 5'-thiolmodified siRNA sense strand [75].

**Table 1. List of most commonly used cell-penetrating peptides.**

Name	Amino acid sequence	Reference(s)
SP	AAVALLPAVLLALLAP	[78]
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	[63,79,80]
Antennapedia (penetratin)	RQIKWIFQNRRMKWKK	[81]
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	[82]
M918	MVTVLFRRRLRIRACGPPRVRV	[83]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	[84]
Pep-2	KETWFETWTEWSQPKKKRKV	[85]
Xentry	LCLRPVG	[86]
Arginine stretch	RRRRRRRRR	[87]
Transportan	WTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	[88]
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	[89]
SynB3	RRLSYSRRRF	[89]

### 3.5. Virus-derived particles

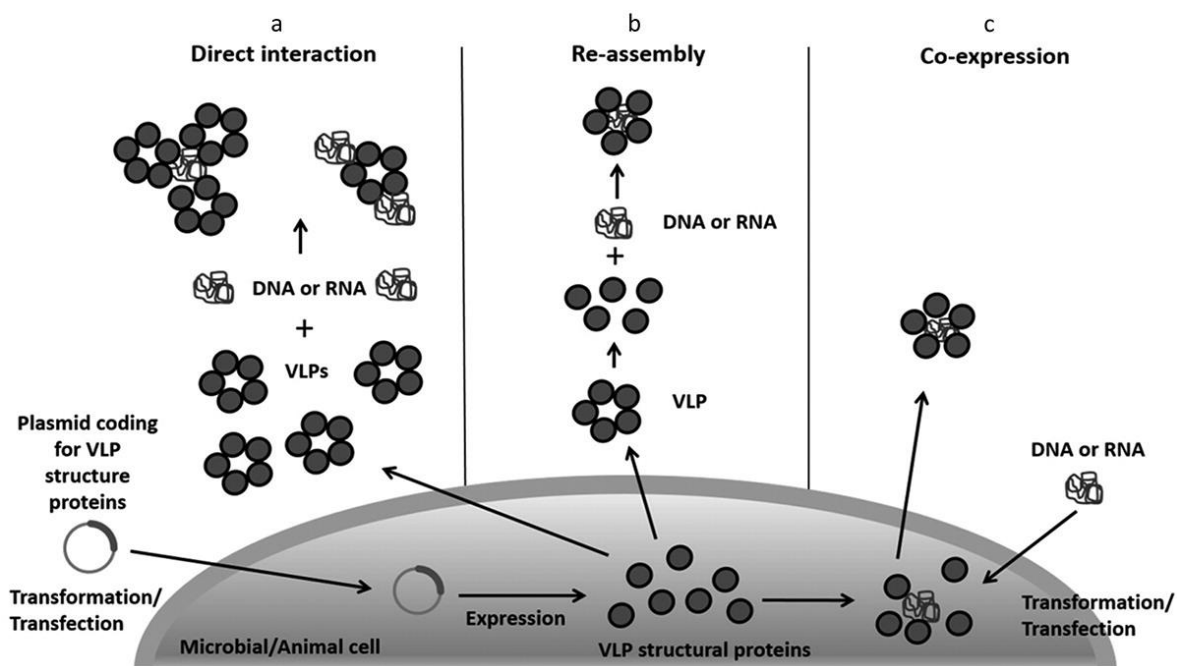
Virus-derived particles (VDPs) are replication deficient assemblies of one or several viral structural proteins mimicking the coat of natural viral agent and lacking the nucleic acid molecule. They are noninfectious but have similar morphology, tropism, and cellular uptake as the virus they originate from. The formation of such structures can be technically obtained using animal or plant cell culture as well as microbial expression systems. Experts nowadays differ two groups of particles within VDP category: virus like particles (VLPs) and gesicles. Unlike VLPs, which can be made up of viral capsid proteins sometimes including other virus components, gesicles contain a single kind of viral envelope protein that promotes membrane budding in its producing cells and forms fusogenic, membrane-containing nano- and microvesicles. Most widely explored such structures are made of spike glycoprotein of vesicular stomatitis virus G (VSV-G) and are thus called gesicles [90]. Their biosynthetic pathway is not well understood, but they do not show markers indicative of endosomal origin. The initial drive for VDP investigation was creating direct immunogens for vaccination [91]. However, an additional benefit was conceptualized and these particles were considered for exogenous DNA and RNA delivery. Currently, there are many types of viral capsid proteins used for VLP formation exhibiting capacity to bind nonspecifically to nucleic acid molecules. The most common are L1 from human papilloma virus and VP1 from polyomavirus [92]. Since the first experiments showing that VLPs could package DNA and transduce it into cells, a variety of *in vitro* and *in vivo* studies have been performed for evaluation and optimization of the technique [93,94]. Polyoma JC virus is able to infect several human tissues including brain, kidneys, and lung. Delivery of a gene of interest into the natural viral host thus gives a great therapeutic potential to JC VLPs. Many recent studies have focused on development of JC VLP vectors, but the immunogenicity of the virus proteins and difficulties in tissue targeting are impeding their advancement [95]. The choice of the VLP production system depends mostly on virus type and the particle complexity. Expression in *Escherichia coli* and yeast is highly efficient but sometimes requires additional steps for proper protein folding. Therefore, complex VLPs consisting of several different proteins that need to be co-expressed in order to assemble into a particle are commonly produced using animal cells. For example, human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells were used for the expression of BK, murine, and Merkel polyomavirus VLPs consisting of VP1 + VP2 [96] while murine polyomavirus-based VLPs constituted of VP1, VP2, and VP3 structural components are generated from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells [97]. Majority of VLPs are generated in insect cells using baculovirus/Sf9 expression system, although the yield is still relatively low [98], and the product



contaminated with host cell DNA [99]. Production in animal cells results in even lower yield. There are reports on use of HEK 293 cell line for VSV-G gescicles production [72,100] as well as avian polyomavirus VLPs harvested from chicken embryo cells culture [101]. Another critical issue for gene delivery is incorporation of nucleic acid molecules into the VLPs: the size of the incorporated molecules and VLP type are the key parameters. As presented in Figure 2, VLP interaction or loading with DNA can be done in three different ways: reassembly, direct interaction, and co-expression. Reassembly technique involves creating specific conditions that allow particles to fully dissociate and reassociate in the presence of nucleic acid molecules. Consequently, these molecules get entrapped into reassembled structures. This method was applicable using papilloma derived VLPs [102]. Direct interaction is a spontaneous binding reaction of VLPs with nucleic acid molecules [96]. Co-expression is technique in which both the expression plasmid encoding VLP structural protein and the cargo plasmid are transformed into Yeast or *E. coli*. The protein is then produced, and the cargo plasmid gets integrated while the particles assembly. VLP contamination with VLP protein coding plasmid is very probable in this case. In a recent report, JC polyomavirus VLPs, packaged by co-expression with a herpes simplex virus thymidine kinase gene, very efficiently targeted human colon carcinoma cells in a nude mouse model [103]. The same team applied similar method for treatment of xenografted human bladder tumor nodules *in vivo* [104]. The uptake of VLPs by host cells is generally not well understood, especially if particles do not contain envelope proteins that determine tropism and cell-specific binding. Hence, the majority of VLPs, except for some polyoma particles, is taken up by receptor-dependent endosomal route, as many other nonviral particles. The size of the particle may play a key role in the process [92]. In some cases, forming a more complete assembly of capsid proteins and nucleosomal condensation of cargo DNA can improves VLP uptake. It stays to clarify if gescicles bind to LDL family of receptors as shown for VSV [105]. Although RNA molecules are naturally not packaged by polyomavirus VLPs, there are reports on successful delivery of synthetic RNA molecules for gene silencing *in vitro* [106]. Recently, an application of JC polyomavirus VLPs packed by co-expression with shRNA for silencing a large tumor antigen in BK polyomavirus-infected human kidney cells decreased the number of viral genome expressing cells for more than 50% [107]. Spontaneous and highly efficient *in vitro* packaging of a heterologous RNA in VLPs is reported for capsid proteins of the plant virus named Cowpea Chlorotic Mottle Virus. The RNA was delivered successfully into cytoplasm of adherent Baby Hamster Kidney cells in culture. Furthermore, the particles showed to be resistant against nuclease degradation [108]. Most of VLPs have the same tropism as their originating viruses.



However, the VLPs, lacking viral envelope proteins, although potentially less immunogenic, are more unstable and have difficulty in reaching target cells. In order to compensate for the missing viral envelope proteins, murine leukemia virus-like particles were electrostatically complexed with chitosan or fused with synthetic liposomes. Optimized fabrication conditions and compositions made these biovectors noncytotoxic *in vitro* and provided sustained transgene expression for at least 3 weeks [109,110]. In other cases, more precise cell targeting was assessed and structural modifications were part of particle assembling process. Chemical conjugation of Simian Virus 40 VLP with human epidermal growth factor (hEGF) resulted in greater particle uptake and transgene expression in A431 cells overexpressing hEGF receptor [78]. A gene transfer using a VP1 variant, coupled with the antibody fragment of the tumor-specific antibody B3 of the antigen expressing in breast cancer cells *in vitro*, was also reported [111]. Similarly, VLPs composed of VP1 fused with antibody-binding domain of protein A and decorated with the mAb Herceptin™ lead to strict type-specific targeting of a Herceptin™ receptor-positive cell line [112]. In both cases, antibody-based cell targeting was highly efficient, but the transgene expression was relatively low presumably due to the inability of VLPs to release pDNA from endosomes. While the potential of gesicles to deliver an exogenous protein to recipient cells has already been explored [90], significant advancement in understanding their capacity for nucleic acid mediation is needed. Gesicles were shown to promote pDNA uptake and luciferase gene expression in several mammalian cell lines *in vitro* [100]. Very recently, an active loading platform has been developed based on gesicles having their envelope protein (VSV-G) fused with a bacteriophage RNA-binding protein [113]. This system, named TAMEL, generated gesicles with 40-fold increase in mRNA content compared to the gesicles undergone passive RNA loading. Actively loaded particles were then successfully internalized into prostate cancer cells *in vitro*. However, the RNA cargo was rapidly degraded in the cells indicating inefficient endosomal fusion or escape.



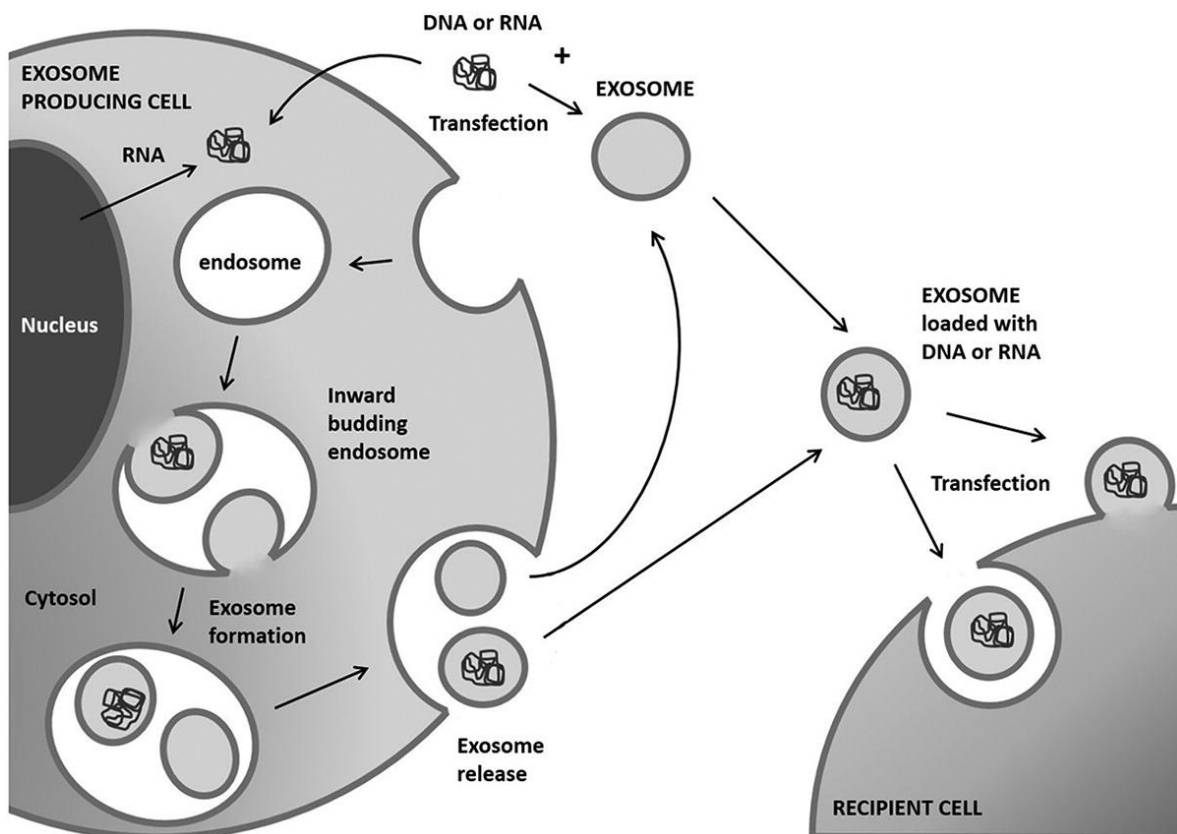
**Figure 2. Three proposed ways of nucleic acid interaction/entrapment in VLPs.** (a) Direct interaction is a spontaneous binding reaction of VLPs with nucleic acid molecules. (b) Reassembly method involves entrapment of nucleic acids in VLPs while creating specific conditions that allow particle dissociation and subsequent reassociation. (c) Co-expression is a technique in which both, the expression plasmid coding for VLP structural proteins and the cargo nucleic acid molecule are introduced into a host cell. After the VLP proteins are produced, they form a particle containing entrapped cargo nucleic acids.

### 3.6. Exosomes

Exosomes are spherical vesicles, 30–100 nm in diameter, formed by inward membrane budding of endo-lysosomal compartments in different types of cells and tissues. They have an important role in cell-to-cell communication by being carriers of various molecules including coding and noncoding RNAs with ability to induce *de novo* transcriptional and translational changes in target cells. The mechanism of exosome assembly involves coordination of so-called endosomal-sorting complex required for transport machinery and related proteins [114]. Stimulation of sphingomyelinase and subsequent ceramide formation seems to play role in a different endosome budding mechanism [115]. Intercellular mediation of RNAs made exosomes a very attractive tool for studies of controlled gene silencing for therapeutic purposes [116]. The mode of RNA delivery into target cell cytoplasm depends

on exosome origin and the type of recipient cells. It is suggested that released exosomes can bind via specific receptors on the recipient cell surface, fuse directly with the recipient cell membrane, or be internalized by the recipient cell ([Figure 3](#)). The source of exosomes for RNA delivery could be regular cell lines as HEK 293 or bone marrow dendritic cells. The exosomes derived from immature dendritic cells do not induce immune activation. Exosomes production containing desired cargo and targeting properties is still critical. Exosomes isolation procedures generally consist to ultracentrifugation and size exclusion methods as well as ultrafiltration and chromatography. Alternative technology commercially available from System Biosciences (SBI) is based on precipitation of exosomes in polymers and simple bench-top centrifugation [[117](#)]. For loading RNAs into isolated particles, an EP protocol has been developed. Alvarez-Erviti et al. electroporated siRNA into exosomes derived from dendritic cells and achieved up to 60% RNA and GAPDH enzyme knockdown in the mouse midbrain, cortex, and striatum upon intravenous delivery of electroporated exosomes [[118](#)]. As an alternative, *Exo-Fect*<sup>™</sup> from SBI is a chemical transfection reagent that delivers nucleic acids into pre-isolated exosomes. Targeted cells are subsequently exposed to the transfected exosomes. Another exosome-loading strategy is transfection of exosome producing cells with RNA of interest and subsequent harvest of secreted exosomes. An improved version of this technique is the use of RNA zip codes, which are sequence motifs in the 3' untranslated region that direct mRNA localization within microvesicles [[119](#)]. Similarly, SBI marketed a technology termed XMIRs/AXMIRs to induce cell-mediated package of RNAs into exosomes. Researchers can transfect small RNA oligos that include an 'XMotif' sequence into a producer cell line, and then isolate exosomes containing high levels of their small RNA of choice. Using this system, both miRNAs (XMIRs) and anti-miRNAs (AXMIRs) have been shown to be efficiently delivered and retain bioactivity within target cells [[117](#)]. Viruses can modify exosomes content thus have the potential to become a tool in exosome design [[120](#)]. Barreto et al. showed that infection of epithelial cells with rotavirus increases the release of membrane vesicles with typical exosome markers. These exosomes showed a higher T-cell inhibition than exosomes from noninfected cells, suggesting that the content of exosomes of infected cells is different from the exosomes of noninfected cells [[121](#)]. Several strategies for enhanced cell targeting have been developed, based mostly on the display of proteins known to confer site specific delivery. A model for treatment of B-cell malignancies proposes using exosomes engineered to display EBV glycoprotein 350 that target and deliver protein antigens to CD19+ B cells but not to other peripheral blood mononuclear cells [[122](#)]. Exosomes displaying another viral protein, central nervous system-specific

rabies virus glycoprotein, served as a targeting vehicle to deliver siRNA cargo across the blood–brain barrier in a mouse model [118]. For EGFR targeting, modified exosomes with the GE11 peptide or EGF on their surfaces delivered miRNA to EGFR-expressing cancer tissues, while intravenously injected exosomes delivered a tumor suppressing miRNA (let-7a), specifically to xenograft breast cancer cells in RAG2<sup>-/-</sup> mice and inhibited their proliferation [123]. In addition to RNA, DNA has also been detected in exosomes [124]. Moreover, there are reports on successful internalization of exogenous DNA into particles that seems to be both agents' size dependent [125]. However, a gene expression in recipient cells after the DNA conveyance via exosomes has not been established yet, indicating that substantial obstacles must overcome to establish exosomes as applicable DNA delivery vehicles.



**Figure 3.** Description of exosome loading with nucleic acid and exosome transfection of a target cell. Nucleic acid of interest can enter exosomes by being introduced into the cytosol of exosome producing cells either from the cell exterior (transfection) or as an endogenous RNA from the cell's own nucleus. Direct transfection of secreted (and harvested) exosomes is also suggested as a technique. Exosomes used as transfection vehicles can deliver nucleic acid of interest by internalization or direct fusion with the recipient cells.

## 4. Conclusion

Biological effects occurring after nucleic acid delivery into a tissue or cells in culture are reliant to the choice of delivery method. Due to the safety limitations associated with viral vectors, nonviral nucleic acid conveyance has always kept researchers' attention as an alternative system, even more in later years since the variety and the quality of nonviral transfection particles have developed rapidly, in certain extent thanks to better understanding of viral modes of action. Introducing foreign genetic material into a living tissue, by physical force or an exogenous particle, in many aspects is hampered by defensive physiological action that diminishes wanted outcome and eventually devalue the transfection method applied. Currently, various strategic modifications of nonviral agents have been employed to avoid such events, but despite all efforts it seems that they are still not efficient enough to entirely substitute viruses. Therefore, the priority should be given to the identification of mechanisms governing transfection process and factors affecting its efficiency. Being classified as biological transfection mediators, PTDs, VDPs, and exosomes have potential to undergo structure–function-based design that could make their efficacy comparable to that of viruses. The assets these biomolecular particles offer include effective shielding of nucleic acid from degradation, modifiable cell-specific targeting, and distinct cell penetration properties. However, the results of preclinical studies are still far from satisfactory, especially considering immunogenicity and intracellular trafficking. Furthermore, an additional effort is needed to develop a standardized production process that can yield particles of consistent quality and quantity, suitable for controllable loading of exogenous nucleic acids. Investigations approaching these issues by combining various particles, both biological and synthetic in a complementary manner, may eventually derive hybrid substances well primed for the clinic.

## 5. Expert opinion

During the last few decades, development of nonviral nucleic acid delivery methods diverged into several directions. Testing physical, chemical, and biological properties of various substances emerged with many potentially advantageous solutions, but the majority of them limits to *in vitro* applications. *In vivo* studies are promising, but still not entirely satisfactory and thus the upgrade to the clinical level seems to have stuck delayed. As mentioned previously, there is scarce understanding of molecular mechanisms occurring during various phases of the transfection process. Therefore, the design of suitable agents engaged in nucleic acid delivery should ideally be based on precise functionality. At

the same time, it is essential to identify the type of genetic material to be used, the way of administration as well as the target site. This may require cell type and therapy-specific approaches, but the diversity of methods and constant improvements of techniques raise hope that the tasks will be accomplished. Combination of several gene delivery agents, each covering shortcoming(s) of the other, can lead to synergistic multifunctionality and thus results in a desired transfection success [126]. In that sense, one approach would be designing nonimmunogenic virus-like structures that can well protect their cargo and traffic it successfully all the way into the nucleus, after successful host cell recognition [127]. Viruses, by being 'experts' in this domain, offer us a template for the design of similarly effective artificial carriers. These structures should contain elements that mimic the tropism of viral particles by containing surface domains that safeguard against undesired biological interactions and enable specific host cell receptor binding. Activation of each domain has to be achieved in dynamic mode, triggering conformational changes or bond cleavage in the relevant milieu. The complete particle could be precisely assembled in a multistep process, developed by close collaboration of experts from several disciplines: chemists, biologists, medical, and material science specialists [128]. The closest reflection on the idea may be the transfection particles of biological origin described in this review: PTDs, VLPs, gesicles, and exosomes. Their efficiency may still be lower than exhibited by their chemically synthesized counterparts, but there is certainly space for improvements. Initially, these particles served as drug carriers, signal mediators, or vaccines, thus their switch to nucleic acid trafficking came as a reasonable next step. Construction of multifunctional peptides for targeted gene delivery is an attractive concept that is still far from the efficiency these agents are supposed to exhibit. On account of their biological background, they have the potential to cause less trouble considering cytotoxicity and biodegradability than chemically designed particles. The possibility of selecting suitable peptide-based carriers or functional domains of human origin could greatly minimize the immune response particularly during repeated systemic application in gene therapy. Elimination or modification of immunogenic epitopes and other undesired structures might give rise to the efficient and safe peptide-based nucleic acid vehicles. Although quite laborious, combinatorial approach in the investigation and selection of various peptide domains aimed for stepwise surpassing of transfection pathway obstacles is still the most suitable approach in this field [129]. Optimization of PTDs gene delivery mostly relies on an empirical approach, nevertheless if combined with *in silico* protein modeling, it could render reliable answers on efficacy of the new peptide arrangements. Similar concerns define the use of VDP transfection mediators. As mentioned earlier, viruses possess molecular tools for adopting the host cell

machinery for efficient delivery and expression of their own genes. To elucidate the mechanism of virus–host interaction, certain interdisciplinary approaches have been developed based on stochastic models at molecular level. Further improvement in the field may similarly help to deduce improvements in VDP transfection capacity. Creating ‘changed’ VDPs by introducing random mutation in their peptide-coding genes will speed up finding the best DNA/RNA vehicle candidate. Then, an attempt to assemble in a single particle various peptide derivatives or even peptides of different viral origin seems rather imminent. Additionally, a more profound understanding of molecular principles in nucleic acid delivery will ensure a more rational and strategic, mechanism-based design of future transgene carriers [130]. This entails defining an adequate biological candidate after intense cell physiology and pathogen studies, and if necessary, subsequent development of techniques for consecutive modification of a chosen particle with aims to further improve its performance. In that sense, after being available through standard recombinant protein production, PTDs and VDPs might undergo functional decoration with natural ligands or synthetic active groups that will come out with enhanced or even completely new properties found acceptable for obtaining expected biological effects. Moreover, a bioprocess production of chimeric particles in the form of viral capsid proteins fused with adequate PTD domains, if cleverly designed, might result in structures that will enhance bioavailability of therapeutic nucleic acid molecule. Being efficient RNA carriers, exosomes may benefit from the targeting properties of VDP building peptides as well as the functionality of certain PTDs. For that purpose, a hybrid construct composed of lipid vesicle and surface-presenting VDP- or PTDs-derived molecules should be precisely engineered and produced in suitable cell lines. The further interest would be to increase the yield of produced particles which might require an additional intervention in homeostasis of the chosen expression system. Alternatively, a technique of well-controlled cell extrusion followed by affinity-based separation may result in lipid particles of desired size and composition. Loading the obtained particles with nucleic acid of interest may be carried out by EP or some chemical agents.

In summary, rapid and diverse progresses in nucleic acid delivery techniques currently offer a great number of choices that comply more or less successfully with a broad sphere of applications. Nevertheless, more advanced methods are still required considering high standards in design of therapeutic bioproducts.

## Annexe C

# **Evaluation of novel HIV vaccine candidates using recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vector produced in serum-free Vero Cell Cultures**

Mathias Mangion; Jean-François Gélinas; Anahita Bakhshi Zadeh Gashti; Hiva Azizi; Sascha Kiesslich; Nasha Nassoury; Parminder S Chahal; Gary Kobinger; Rénaud Gilbert; Alain Garnier; Bruno Gaillet; Amine A. Kamen

### **Abstract**

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) in humans is a result of the destruction of the immune system caused by Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. This serious epidemic is still progressing world-wide. Despite advances in treatment, a safe and effective preventive HIV vaccine is desired to combat this disease, and to save millions of lives. However, such a vaccine is not available yet although extensive amounts of resources in research and development have been invested over three decades. In light of the recently approved Ebola virus disease vaccine based on a recombinant vesicular stomatitis virus (rVSV-ZEBOV), we present the results of our work on three novel VSV-vectored HIV vaccine candidates. We describe the design, rescue, production and purification method and evaluate their immunogenicity in mice prior to preclinical studies that will be performed in non-human primates. The production of each of the three candidate vaccines (rVSV-B6-NL4.3Env/SIVtm, rVSV-B6-39 NL4.3Env/Eb1m and rVSV-B6-A74Env(PN6)/SIVtm) was evaluated in small scale in Vero cells and it was found that production kinetics on Vero cells vary depending on the HIV gp surface protein used. Purified virus preparations complied with the WHO restrictions for the residual DNA and host cell protein contents. Finally, when administered to mice, all three rVSV-HIV vaccine candidates induced an HIV gp140- specific antibody response.

### **Introduction**

The epidemic of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) has seen 70 million people infected, resulting in 32.7 million deaths as of 2020 according to the United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) [1]. The epidemic is still



progressing with around 38 million people currently living with HIV/AIDS, 1.7 million new yearly infections and 690,000 deaths per year, despite advances in treatment that have been able to greatly reduce virus-related deaths. Developing a safe and effective preventive HIV vaccine has proven to be an exceptional challenge [2], even a low-efficiency vaccine would save millions of lives [3]. The recombinant vesicular stomatitis virus (rVSV) platform is based on a cytopathic virus member of the Rhabdoviridae family. The wildtype virus, VSV, causes a vesicle inducing disease similar to foot-and-mouth disease in livestock [4]. Unlike foot-and mouth disease, however, VSV is infectious in humans [5] but the infection is usually asymptomatic in human hosts or associated with a mild febrile illness lasting 2–5 days [6]. The rVSV platform can be used as a replication competent vaccine that has been shown to generate both cell-mediated and humoral immunity to expressed foreign antigens [7]. The recently WHO-prequalified vaccine for the prevention of Ebola virus disease (rVSV-ZEBOV) [8], EMA and FDA-approved and sold under the brand name Ervebo, is based on an attenuated, replication-competent, rVSV. rVSV-ZEBOV induces the production of viral particles similar to VSV in which the VSV glycoprotein has been replaced with the glycoprotein from a Zaire strain of the Ebola virus (ZEBOV). The ZEBOV glycoprotein is responsible for receptor binding and membrane fusion with the host target cells and induces antibody expression [9]. The vaccine causes a transient systemic infection after a single injection leading to a rapid immune response against the Ebola virus surface protein [10,11]. It is safe to administer to humans [10,12–15] and has shown protective efficacy against Ebola virus in a human phase III clinical trial [16]. In the 2018 outbreak, according to a preliminary report, the estimated vaccine efficacy was of 97.5% [17]. The rVSV platform is also being used to develop an HIV vaccine (rVSV-HIV) [18,19]. Preclinical vaccine studies from the International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) testing an HIV-1 Env spikes pseudotyped rVSV vector (VSVΔG/HIVenv) showed that it could induce anti-Env binding antibodies and cell-mediated immune responses in mice [20] and resulted in 67% protection in a non-human primate model of infection [21]. There is, however, no clear evidence yet for a neutralizing antibody response and the vector was difficult to propagate in vitro as it relied on CD4 and CCR5 receptors in cell lines for vector expansion [22]. Here, we describe the design, rescue, production and purification method of three novel VSV-vectored vaccine candidates and evaluate their immunogenicity prior to preclinical studies in non-human primates. To counter the propagation issue, rVSV-ZEBOV was used as a base to construct the vaccine candidates allowing propagation in cells without CD4 and CCR5 expression. To maximize immunogenicity, different chimeric HIV glycoproteins were compared to improve the low surface expression of the HIV-1 envelope on the VSV vector [23,24].

More specially, a chimeric HIV-1 envelope composed of a shortened SIV transmembrane domain were generated since SIVmac has a higher gp120 spike density than HIV-1 [25] and the native SIV cytoplasmic tail makes the viral rescue impossible. Although literature reports that vaccines can be efficiently produced from different cell lines such as the HEK293-SF [26], Vero cells are still the gold standard cell line for the vaccine production [27]. Hence, we evaluated candidate vaccines produced in Vero cell cultures supported by analytical methods to develop improved production and purification processes to achieve cost-effective mass production. The rVSV-based HIV vaccine candidates were formulated and evaluated for immunogenicity in preliminary mice experiments.

## **Material & Methods**

### **Cells**

The adherent Vero cell line CCL-81.5 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. The cells were maintained in static culture using VP-SFM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in an humidified incubator. Cells were passaged twice weekly using TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) as a dissociation reagent, centrifuged at 500 g for 5 minutes, resuspended in fresh medium and seeded at a cell density of 2 × live cells per 150-cm<sup>2</sup> dish with 20 mL of fresh media.

HEK 293A cells [28] (ATCC) were maintained in cell culture dishes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), in an humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine and 5% Fetal Bovine Serum (FBS) (GE Healthcare) without antibiotics. Cells were passaged twice a week. They were detached using a cell scraper, centrifuged at 500 g for 5 minutes, resuspended in fresh medium and seeded at a 1:10 dilution.

### **Plasmids**

The original stock of virus was generated by viral rescue using the genome plasmids pATX.V2.B6.Full, pATX.B6-NL4.3Env/SIVtm, pATX.B6-NL4.3Env/Ebotm or pATX.B6- A74Env(PN6)/SIVtm encoding VSV genes in the antisense orientation and additional plasmids pBS-N, pBS-L, pBS-P and pCAGGS T7. The genome plasmid pATX.V2.B6.Full and additional plasmids were described previously [26]. To generate the genome plasmids used in this study, the ectodomain of HIV-1 clones NL4.3 (HIV-1 strain

NL4-3 clone SPL7013p44 envelope glycoprotein (env) gene, complete cds: GenBank: JQ975395.1) and A74 [29] envelope glycoprotein sequences fused to SIV or Ebola GP transmembrane domain were synthesized by GenScript and inserted into the pATX.V2.B6.Full plasmid via MluI-AvrII restriction sites using the In-Fusion cloning kit (Takara Bio, Mountain View, CA, USA).

### **Viral rescue**

Viral rescue of rVSV-ZEBOV has been described previously [26]. The same procedure was followed with pATX.V2.B6.Full being replaced by the other genome plasmids to generate rVSV-B6-NL4.3Env/SIVtm, rVSV-B6-NL4.3Env/Ebotm and rVSV-B6- A74Env(PN6)/SIVtm. These original stocks were then amplified over 72 hours on Vero cells using an MOI (multiplicity of infection) of 0.001. The supernatant was harvested by centrifugation at 500 g for 5 minutes to generate a larger stock.

### **TCID50 and digital polymerase chain reaction (dPCR)**

The functional viral titer was measured by TCID50 [30] and the method was described previously [31]. The TCID50 value shown for the titres at the time of infection was calculated from the titre of the vial used to infect the culture rather than from samples taken after infecting the cells and this is reflected by using open symbols in the figures. To estimate the total number of viral particles present in culture samples, the copy number of viral genomes was assessed by dPCR as described previously [31].

### **Viral infection conditions**

To establish optimal virus production, 6 well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were plated with  $1.0-1.2 \times 10^6$  Vero cells per mL in 2 mL and incubated overnight. Independent infections were performed at multiplicity of infection (MOI) of 0.01, 0.001 and 0.0001 with the appropriate virus stock and incubated at 34 °C. Samples were harvested at the indicated time points every 24 hours following infection.

### **Production and purification of VSV constructs for the animal study**

Vero cells at  $2.0 \times 10^7$  cells were seeded and incubated overnight in 150-cm<sup>2</sup> dishes. They were infected with 20 mL of fresh media containing one of the NL4.3 variants at MOI of 0.001 or the A74 variant at MOI of 0.01. The cell culture was harvested two (NL4.3 variants) or four (A74 variant) days post infection. The produced virus was recovered in the supernatant by pelleting cellular debris by

centrifugation at 3,500 g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatant was filtrated using a 1.2 µm filter (Sartorius). The filtrate was then concentrated 40 times in volume using the KrosFlo® Research Ili Tangential Flow Filtration System (KR2i) (Spectrum, Rancho Domingez, CA, USA). A hollow fiber cartridge (750 kDa MWCO; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) was used for tangential flow filtration (TFF). The concentrated virus was then purified on an Optiprep (iodixanol) density gradient medium (MilliporeSigma), by underlaying 5 mL and 8 mL layers containing 13% and 35% Iodixanol solutions (made in 0.9% NaCl, 10mM Tris at pH 7.2 (BioShop, Burlington, ON, Canada), respectively, in Optiseal ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The virus was partially purified by separating it from other cellular contaminants using the rotor 70Ti in an Optima L-80XP (Beckman Coulter) ultracentrifuge. After 3.5 h of centrifugation at 30,000 rpm, 4 mL were collected using a syringe from the side of the tube where the appropriate band showed up. The iodixanol was then removed using TFF and the sample was concentrated to 10 mL. This was followed by diafiltration with 5 volumes against the injection buffer consisting of 10 mM Tris supplemented with 4% sucrose (Bioshop). For samples not reaching the desired dose, a further concentration was performed using a Centricon or Amicon filter (Millipore) made of reconstituted cellulose and with a 100 kDa molecular weight cut-off.

### **Electron microscopy**

Viruses were diluted and fixed in 4% paraformaldehyde in water containing 10 mM Tris and 1 mM EDTA overnight at 4 °C. Then, viruses were adsorbed to carbon-coated formvar grids for 30 min at RT on 400 mesh nickel with support film and carbon coated grids. The grids were then blotted and stained with 2% aqueous uranyl acetate for 1 minute. After blotting the grids were dried overnight before observation with a Tecnai G2 Spirit BioTwin (120 KV) transmission electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Images were acquired with an Orca HR (Advanced Microscopy Techniques, Woburn, MA, USA) bottom mount camera.

### **Quantification of host cell protein (HCP)**

The concentration of HCP was quantified using the Vero Cell HCP ELISA kit (Cygnus Technologies, USA), following the manufacturer's instructions. A total amount of 50 µL of diluted samples (1:250) was added to microtiter strips coated with goat anti-VERO cells polyclonal antibodies. The HRP conjugated affinity purified goat anti VERO cell antibody (100 µL) was added to wells and incubated for 2 hours at

25 °C with shaking at 580 rpm. The wells were washed 4 times with wash buffer. An amount of 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB) solution was immediately added to the plate and incubated at 25 °C for 30 mins. The reaction was stopped using 100 µL of stop solution and the absorbance was read at 450/650 nm using Synergy HTX multi-mode reader (BioTek). The Vero cell lysates were used as positive control.

### **Detection of residual DNA level**

DNA content was determined using the Quant-iT™ PicoGreen™ ds DNA assay kit (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. In brief, the samples were diluted in 20 mM DNase free Tris buffer for 1:10 and 1:20 dilutions. An amount of 100 µL of Quant-iT™ PicoGreen® reagent was added to each well and incubated for 5 min in dark, at room temperature. The fluorescence of the samples was then measured at 520 nm using Synergy HTX multi mode reader (BioTek). The calibration curve was plotted using Lambda DNA (supplemented in the kit) at concentrations ranging from 1 to 1000 ng per mL. The samples were tested in triplicate.

### **Mice experiments**

Female, 6 to 8-week-old C57BL/6 mice (Charles River, Wilmington, MA, USA) were used in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and all protocols were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Université Laval. Groups of 7 mice were bled via saphenous vein one day prior to immunization and 4 weeks after immunization. Sera were isolated and kept frozen until used.

### **Humoral immune response (ELISA assay)**

Half-area 96-well flat-bottom high-binding polystyrene microtiter plates (Corning, Corning, NY, USA) were coated with 2 µg/ml recombinant HIV-1 consensus clade B gp140 trimeric glycoprotein (NIH AIDS Reagent Program; Cat No. 12577) [32,33], 212 overnight at 4 °C. Plates were blocked for 1 hour with blocking buffer (KPL Milk Diluent/Blocking Concentrate Kit, SeraCare, Milford, MA, USA) at room temperature. 1:250 dilutions of sera were prepared in KPL diluent buffer and added to each well, then incubated for 2 h at room temperature. The plates were washed 3 times with PBS (Corning) containing 0.05% Tween 20 (VWR). Then, a goat anti-mouse IgG-HRP conjugated secondary antibody (Tonbo Bioscience, San Diego, CA, USA) was added to a final concentration of 1:2,000 and incubated for 1

hour at room temperature. The ELISA plate was then washed 3 times with PBS-Tween 20, 0.05%. Finally, horseradish peroxidase substrate (SeraCare) was added and the signal left to develop while incubating for 30 min at 37 °C. Reactions were stopped by addition of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (MilliporeSigma). The signals were then measured using a Synergy HTX microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The data is reported as the optical density at 405 nm.

### **Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ELISpot assay**

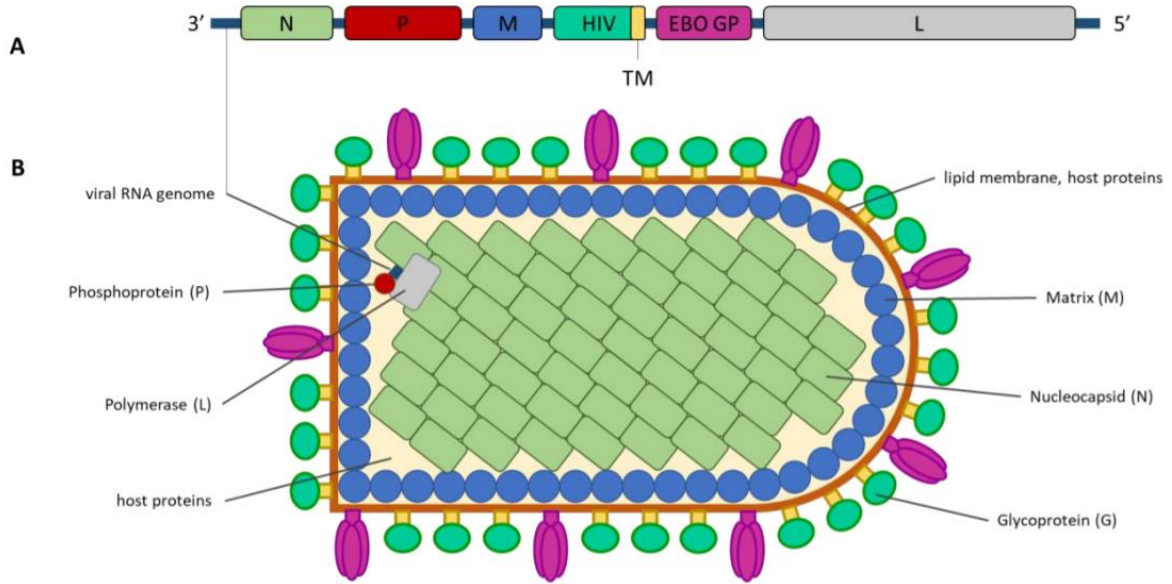
Splenocytes were assessed for HIV antigen responses via IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay, performed according to the manufacturer's instructions (DB Biosciences). Briefly, 96-well ELISPOT plates (Millipore, Billerica, Massachusetts) were coated overnight with 5  $\mu$ g anti-mouse interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Ab, diluted in 50  $\mu$ L phosphate-buffered saline (PBS). The ELISpot plate was then blocked with Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) containing 10% FBS. Splenocytes from 3 mice of each group were assessed for T-cell responses. A total of  $5 \times 10^5$  splenocytes in RPMI-10% FBS, 1% Pen/Strep and L-glutamine were used per well and stimulated for 16 hours with a peptide pools at a concentration of 2  $\mu$ g/ml. Peptide set was obtained from Aidsreagent repository (Cat no. 9480) The pool comprises of 34 15-mer peptides with 12 overlapping amino acids which corresponds to V2, C2 motives of gp120. All plates were placed for overnight incubation at 37 °C in a humidified incubator supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. The following day, cells were aspirated and the plate was washed twice with MilliQ water with 3 min incubation in between, followed by three more washes with PBS-0.1% Tween, before incubation with biotinylated anti-mouse IFN- $\gamma$  Ab for 2h at room temperature. The plate was then washed 3 times with PBS-0.1% Tween, and incubated with streptavidin–horseradish peroxidase (HRP) for an hour. Finally, after 4 more washes, IFN- $\gamma$ –secreting cells were detected using AEC Chromogen (BD biosciences). Spots were counted with an automated AID EliSpot Reader.

## **Results & Discussion**

### **rVSV-HIV production kinetics in Vero cells vary depending on the HIV gp surface protein used**

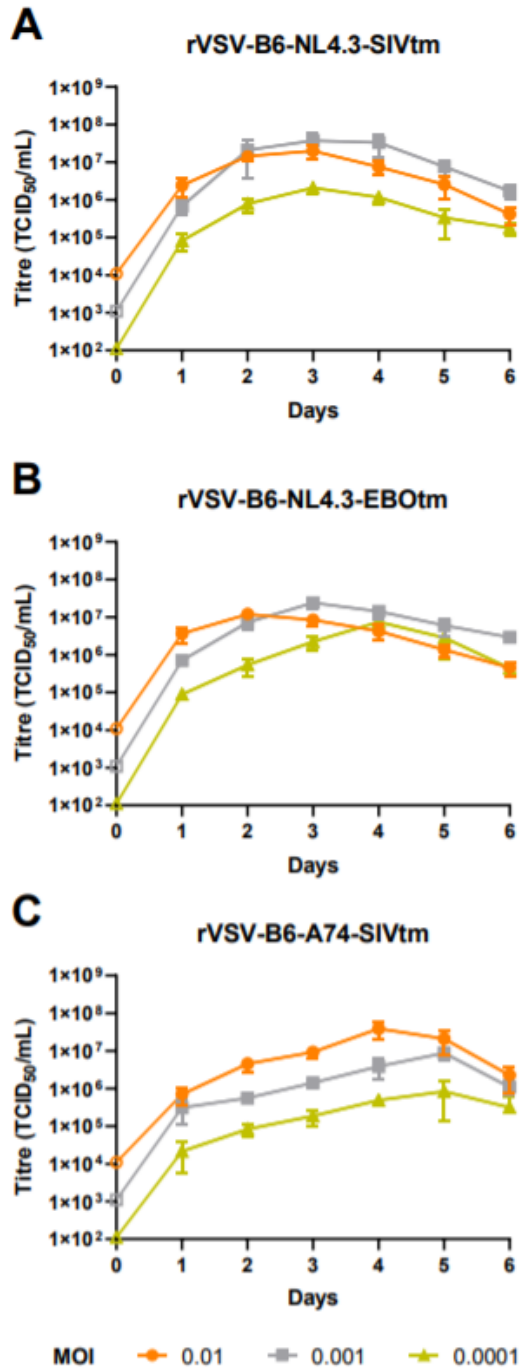
The production of each of the three candidate vaccines (Figure 1) rVSV-B6- NL4.3Env/SIVtm, rVSV-B6-NL4.3Env/Ebtlm and rVSV-B6-A74Env(PN6)/SIVtm was evaluated in small scale in Vero cells to establish the ideal production conditions. It was previously shown that a temperature of 34 °C rather

than 37 °C used during the production of rVSV-ZEBOV had a positive impact on virus production (6-fold increase at 48 hours) in HEK 293SF cells [26] and a VSV-g pseudotyped rVSV had similar temperature requirements in Vero cells [34]. The benefit of the temperature shift was recently confirmed for rVSV-ZEBOV in Vero cells at a MOI of 0.01 [35]. A temperature shift to 34 °C at the initiation of the infection was therefore maintained throughout all following experiments with the above mentioned rVSV constructs. To evaluate the impact of MOI and to determine the optimal time of harvest (TOH), infections were performed at MOIs of 0.01, 0.001 or 0.0001 and samples were harvested every 24 hours for 6 days. Figure 2 shows the results of the titration of these samples. Depending on the MOI and surface protein, the optimal harvest times were determined to be between 48 and 72 hours post-infection for NL4.3-expressing vectors, similar to rVSV ZEBOV results. Production was delayed for the A74-expressing vector with peak production occurring between 96 and 120 hours post-infection. Under these conditions, average titers of  $3.76 \times 10^7$  TCID50/mL (rVSV-B6-NL4.3Env/SIVtm, MOI 0.001, harvested at 72 hours),  $2.39 \times 10^7$  TCID50/mL (rVSV-B6-NL4.3Env/Ebotm, MOI 0.001, harvested at 72 hours) and  $3.91 \times 10^7$  TCID50/mL (rVSV-B6-A74Env(PN6)/SIVtm, MOI 0.01, harvested at 96 hours) were reached. These numbers compare favorably to the  $2 \times 10^7$  plaque-forming units per dose needed to vaccinate humans against the Ebola virus disease with rVSV-ZEBOV [16] although the required dose for Ebola could not be representative for HIV vaccination. However, the peak titers observed here are lower and come at a later time compared to the  $8.79 \times 10^7$  TCID50/mL of rVSV-ZEBOV produced in Vero cells after 36 hpi at 34 °C in a previous study at the same scale [35]. Further, it has previously been reported that VSV-GFP production reached higher titers in HEK293SF cells than rVSV-ZEBOV [34], which was likely due to the presence of the more potent native VSV glycoprotein on VSV-GFP compared to the Ebola glycoprotein on the surface of rVSV-ZEBOV. Hence, it can be assumed that the addition of the HIV glycoprotein to the rVSV-ZEBOV in all 3 constructs slightly impairs the overall replication kinetics. Nevertheless, a large operation window in terms of MOI and time of harvest was also reported for the current production protocol of the rVSV-ZEBOV vaccine in Vero cells [36] and in production using HEK 293SF cells [26].



**Figure 1. Illustration of a VSV-HIV variant.** A) Genome organization of VSV-HIV variant containing the following sequences: nucleocapsid (N), phosphoprotein (P), HIV ectodomain (NL4.3 or A74) fused with the transmembrane (TM) domain of Ebola or SIV glycoprotein, Ebola glycoprotein (GP) and polymerase (L). B) Diagram of an expected VSV-HIV variant NL4.3 or A74 pseudotyped by Ebola GP.





**Figure 2. Effect of initial MOI on functional titre.** Production yields for 6 independent infections at MOI 0.01, 0.001 and 0.0001 in 6 well plates with  $1.0-1.2 \times 10^6$  Vero cells per mL in 2 mL per well with A) rVSV B6-NL4.3-SIVtm, B) rVSV-B6-NL4.3-EBOtm, C) rVSV-B6-A74-SIVtm. Samples were harvested at indicated time points every 24 hours following infection. Functional titres were measured by TCID<sub>50</sub>. At the time of infection, the TCID<sub>50</sub> values was calculated from the titre of the vial used to

infect the culture (open symbols). Bars represent the mean of triplicate production studies  $\pm$  standard deviation.

### **rVSV-HIV production, purification, concentration and characterisation**

The different rVSV-HIV variants were produced in Vero cells using the conditions established above, i.e. MOI and TOH. After a purification process, these vectors were then concentrated and the resulting titres are listed in Table 1. Some vectors had insufficient titres to be used at this step and were further concentrated using Centricon or Amplicon filters (marked with \*). Production of rVSV-B6-NL4.3-SIVtm and rVSV-B6- 301 NL4.3-EBOtm resulted in higher titres than the production of rVSV-B6-A74-SIVtm. The ratio of total viral particles to infectious particles for rVSV-B6-NL4.3-SIVtm, rVSV-B6- NL4.3-EBOtm and rVSV-B6-A74-SIVtm were 52.83, 90.85 and 153.14 VG/TCID<sub>50</sub> respectively.

**Table 1 – Titre of Vero derived productions before and after concentration**

	Before concentration	After concentration
rVSV-B6-NL4.3-SIVtm	4.2x10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	3.27 × 10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> /mL 1.73 × 10 <sup>10</sup> VG/mL
rVSV-B6-NL4.3-EBOtm	1.0x10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	1.64 × 10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> /mL * 1.49 × 10 <sup>10</sup> VG/mL
rVSV-B6-A74-SIVtm	5.6x10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	6.53 × 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL * 1.00 × 10 <sup>10</sup> VG/mL

\*Further concentration using Centricon or Amplicon filters was performed on these samples.

Global recoveries with respect to the concentration of the virus in the supernatant were as high as 45% for the first centrifugation, 21% recovery after the 1.2  $\mu$ m filtration, 21% after the bezonase treatment,

50% following the TFF, 50% after the overnight incubation, 42% for the ultracentrifugation, and finally, overall up to 31% recovery after the final concentration using Amicon.

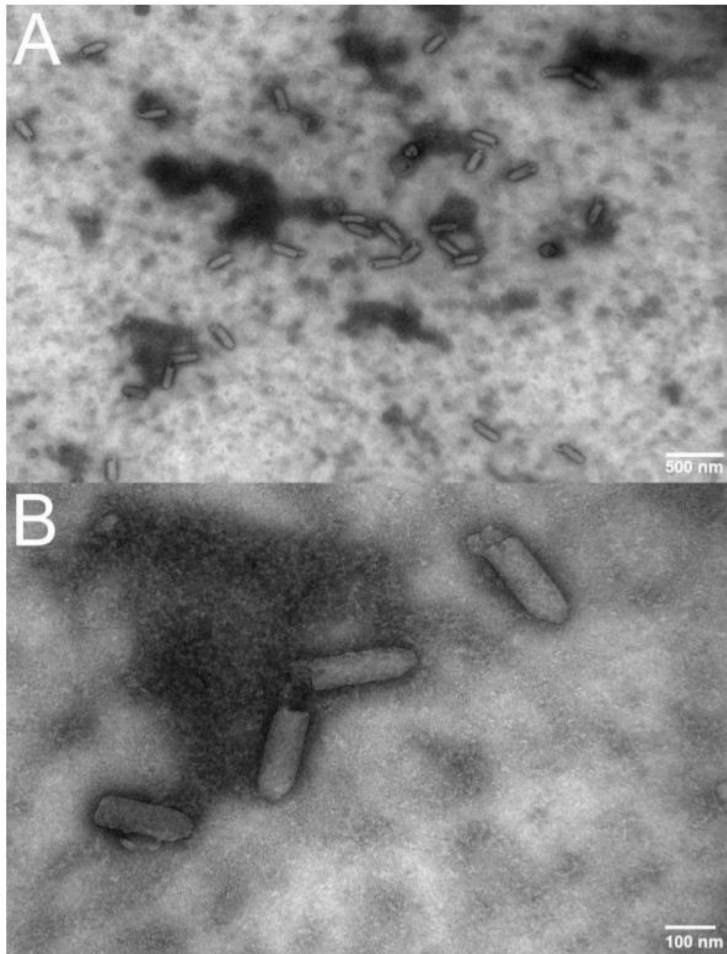
The quality of the purified virus preparations were analyzed prior to the mice injection. For this purpose, the quality control tests consisted of quantification of total protein contents by Bradford assay, the detection of residual DNA contents using Quant-iT™ Picogreen™ ds DNA assay and measurement of VERO cell host proteins using the Vero Cell HCP ELISA Kit of Cygnus technologies. As presented in Table 2, the purified virus preparations complied with the WHO restrictions for the residual DNA contents of less than 10 ng per vaccine dose. The host DNA contents in the purified samples ranged from 1.9 to 2.8 ng/mL. The partial purification approaches employed for rVSV resulted in removal of up to 69% of the HCPs with remaining HCP concentration of about  $65 \pm 20$  ppm varying based on the initial HCP concentration at the time of harvest. The remaining HCPs are probably a part of the VSV membrane (budding virus) and cannot be eliminated through the purification process and are hence detected after purification.

The level of HCP in the purified preparations was lower than 100 ppm, thus meeting the requirements of regulatory agencies.

**Table 2 – DNA and host cell protein contents of concentrated virus preparations**

	Total DNA contents (pg/mL)	Host cell protein (HCP) contents (ng/mL)		
	Purified	Supernatant	Purified	Removal of HCP(%)
rVSV-B6-NL4.3-SIVtm	2,763.8	104,519	56,694	46
rVSV-B6-NL4.3- EBOtm	1,941.2	163,778	50,583	69
rVSV-B6-A74-SIVtm	2,813.4	174,704	87,157	50

Electron microscopy was used to analyze the morphology of purified rVSV-B6- NL4.3Env/SIVtm produced in Vero cells. As shown in Figure 3, the virions exhibited the typical bullet shape of approximately 70 x 200 nm that matched the diameter and length of wild-type strain particles measured by TEM [37,38].



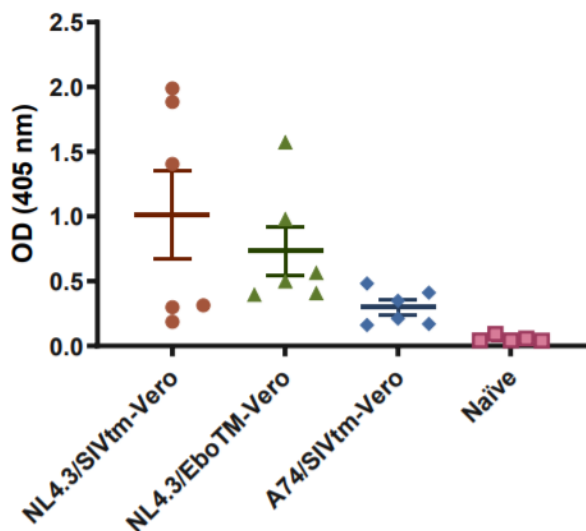
**Figure 3. Electronic microscopy visualisation of rVSV-B6-NL4.3Env/SIVtm sample produced in Vero cells.** A) rVSV-B6-NL4.3Env/SIVtm virions visualization at a 11000x magnification. B) Further magnification of a portion of the same field at a 49000x magnification.

#### **rVSV-HIV generates an immune response to HIV gp in mice**

To assess immunogenicity of different variants produced in Vero cells, mice were injected intramuscularly with 50  $\mu$ L of vaccine formulation containing  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of each vaccine candidate diluted in storage/injection buffer (10 mM Tris in PBS with 4% sucrose and 2.5 g/L human serum

albumin) and total IgG antibodies directed against HIV gp140 glycoprotein were measured by ELISA and the results (Figure 4) demonstrate the presence of anti-HIV gp140 glycoprotein-specific antibodies in these mice 4 weeks after immunization. It also shows a better performance of NL4.3-based vectors versus the A74-based vector. The low level of anti gp140 antibodies, in mice immunized with A74 vectors might in fact be due to low expression level of A74 env, compared to the highly expressed lab strain NL4.3 which results in incorporation of A74 env on the surface of the VSV-A74/SIVtm vectors (unpublished data).

We also looked into the cellular immune response in two groups of mice immunized with VSV-A74/SIVtm vectors to better characterize the immune response outcome at days post immunization, in addition to humoral immune responses. We chose only those groups of mice immunized with VSV-A74/SIVtm, because A74 env represents the env of a clinical isolate and will eventually be selected as the vaccine candidate for later studies in macaques. Therefore, IFN-g secretion was measured from splenocytes using ELISpot assay. The T-cell response was  $48.67 \pm 10.26$  spot-forming units (SFU) per million splenocytes in mice immunized with the vector produced in Vero cells. Altogether, our data suggests successful induced immunogenicity by the vectors produced in Vero cells.



**Figure 4. Mouse total IgG binding antibody titers against HIV gp 140 at 4 weeks post immunisation.** An ELISA plate was coated with recombinant HIV gp140 protein to a final concentration of 2 µg/mL in PBS. 1:250 dilution of sera from immunised mice or pre-immune sera was used to detect

the total IgG antibodies against HIV gp140 antigen. Error bars represent the standard deviation among the seven mice.

## **Conclusion**

This report describes the generation of three different and novel rVSV-based HIV vaccine candidates, identified the growth conditions and evaluated their immunogenicity in a mouse model. The production conditions included a temperature shift to 34 °C after infection and the optimal harvest time was determined to be after two (NL4.3 variants) or four (A74 variant) days post infection in adherent Vero cells. The production of rVSV- ZEBOV in adherent Vero cells on microcarriers in a bioreactor as well as in a fixed-bed bioreactor was recently demonstrated and would allow for a more efficient bioprocess compared to the production in tissue culture flasks [35]. A concentration process with partial purification was performed, but a more robust high recovery yield downstream process remains to be developed. When administered to mice, rVSV-HIV produced on adherent Vero cells induced an HIV gp140-specific antibody response. Additional rVSV HIV variants will be developed and evaluated to determine the most relevant variants that will be further assessed for protection in a non-human primates study.

## **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper

## **Acknowledgment**

We thank Jannie Perderson from the Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, who performed the original rVSV ZEBOV rescue. The following reagent was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 gp140 Recombinant Protein (M.CON-S gp140CFI) from Drs. Barton F. Haynes and Hua-Xin Liao. This research was funded by Canadian Institutes of Health Research Grant OVV 152411 awarded to Gary P. Kobinger (Nominated Principal Applicant). JFG is funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) postdoctoral fellowship. SK is funded by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS). The funding sources had no

involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report or in the decision to submit the article for publication.

### **Author Contributions**

JFG and MM designed and performed the cell culture experiments. JFG, NN and PSC designed the purification protocol and ABZG, NN and PSC performed it. MM, JFG, ABZG, HA and SK performed the analytical assays. HA designed and performed the animal studies. GK, RG AG, BG and AAK provided material and financial support. JFG, MM, SK, AK wrote the manuscript and all authors revised the final version.