

**LA POLYETHYLENEIMINE LACTOSYLEE COMME VECTEUR DE GENES
DANS LES CELLULES EPITHELIALES DES VOIES AERIENNES HUMAINES**

Grosse S¹, Aron Y¹, Bedouet L², Roche AC², Monsigny M², Fajac I¹

1 : Lab. Physio. Resp., Faculté Cochin, Paris

2 : Glycobiologie, CBM, CNRS-Université d'Orléans, Orléans

La polyéthylèneimine (PEI) est un polymère cationique ayant un pouvoir tampon important qui lui permet de déstabiliser la membrane des endosomes. La PEI permet un transfert de gènes efficace *in vitro* et *in vivo* dans différents types cellulaires, y compris dans les cellules épithéliales des voies aériennes. Pour permettre un ciblage cellulaire, la PEI peut être substituée par des résidus osidiques reconnus par des lectines membranaires présentes à la surface des cellules cibles. Nous avons précédemment montré qu'un autre polymère cationique, la polylysine substituée par du lactose permet un transfert de gènes efficace dans les cellules épithéliales des voies aériennes humaines, mais nécessite l'adjonction d'agents endosomolytiques. Nous avons développé une PEI lactosylée et étudié son efficacité de transfert de gènes dans les cellules épithéliales Σ CFTE des voies aériennes humaines mutées pour le gène CFTR.

Les complexes plasmide/vecteur ont été formés dans du NaCl 0,15 M en mélangeant le plasmide (5 μ g/ml) et la quantité adéquate de PEI non substituée (Aldrich) (25 kDa; branchée) ou de PEI lactosylée (5% des résidus d'éthylèneimine substitués par des résidus lactosyl-phénylthiocarbamyles) pour obtenir un rapport N/P=10 (azote de la PEI/phosphate de l'ADN). Les cellules Σ CFTE ont été incubées en présence des complexes pendant 1h à 37°C. Vingt-quatre heures après, le nombre de cellules transfectées a été déterminé par cytométrie de flux. Le trafic intracellulaire des complexes a été étudié en utilisant un plasmide biotinyllé et des PEIs fluoresceinylées. Les cellules Σ CFTE ont été incubées en présence des complexes pendant 1h à 4°C. La solution de complexes a ensuite été enlevée et les cellules incubées à 37°C et étudiées à différents temps, de 10 min à 48h. L'ADN biotinyllé a été révélé avec de la streptavidine rhodaminyllée et la localisation intracellulaire des complexes étudiée en microscopie confocale après marquage de certains organites intracellulaires par immunocytochimie.

Après une seule transfection, la PEI lactosylée et la PEI non substituée ont permis un transfert de gène dans 33,7 \pm 4,3% et 15,5 \pm 3,2% des cellules, respectivement ($p < 0,05$). Après 3 transfusions quotidiennes, la PEI lactosylée a permis un transfert de gène dans 60,8 \pm 1,7% des cellules. Avec la PEI non substituée, une toxicité cellulaire importante a été observée après une seule transfection, avec notamment une désorganisation du réseau de microtubules marqués par un anticorps (Ac) anti- α -tubulin, et après 3 transfusions, la toxicité cellulaire était trop importante pour déterminer le nombre de cellules transfectées. L'entrée des complexes dans les cellules Σ CFTE a été étudiée par cytométrie de flux : un plus grand nombre de complexes plasmide/PEI lactosylée fluoresceinylée étaient endocytés, comparés aux complexes plasmide/PEI non substituée fluoresceinylée (fluorescence moyenne par cellule (unités arbitraires) : 175 \pm 42 et 108 \pm 25, respectivement). Une localisation des complexes aux endosomes marqués par un Ac anti-récepteur à la transferrine a été observée entre 30 min et 2h, avec une localisation maximale à 30 min pour la PEI non substituée (27,2 \pm 4,1% des complexes intracellulaires) et à 2h pour la PEI lactosylée (34,9 \pm 4,5% des complexes intracellulaires). Une localisation des complexes aux lysosomes marqués par un Ac anti-Lamp1 a été observée entre 2 et 8h, avec une localisation maximale à 2h qui concernait 16,1 \pm 6,4% des complexes plasmide/PEI non substituée et 33,1 \pm 6,5% des complexes plasmide/PEI lactosylée ($p < 0,05$). La membrane interne du noyau a été marquée par un Ac anti-lamine A/C et une localisation nucléaire maximale des complexes a été observée à 6h et concernait 20% des cellules. Cependant, moins de 5% des complexes intracellulaires étaient localisés dans le noyau.

Nos résultats montrent qu'en dépit d'une localisation lysosomale plus importante, les complexes plasmide/PEI lactosylée sont plus efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules Σ CFTE que les complexes plasmide/PEI non substituée. Cette plus grande efficacité de transfert de gène de la PEI lactosylée pourrait être expliquée par une meilleure entrée cellulaire des complexes et une plus faible toxicité cellulaire. L'efficacité de transfert de gènes de la PEI lactosylée dans des cultures primaires de cellules épithéliales des voies aériennes humaines est en cours d'étude.

Supporté par l'Association Vaincre la Mucoviscidose.