

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :

Thomas SONNTAG

soutenue le : **3 Décembre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

**Développement de lipides mucolytiques
pour la thérapie génique par voie pulmonaire**

THÈSE dirigée par :

Madame **PONS Françoise**

Directeur

PU, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur **FATTAL Elias**

Rapporteur externe

PU, Université Paris-Saclay

Madame **MERCIER-BONIN Muriel**

Rapporteur externe

DR INRAE, Université de Toulouse

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Monsieur **ZUBER Guy**

Examineur interne

DR CNRS, Université de Strasbourg

Remerciements

En préambule, je souhaite **vous** remercier, qui que vous soyez, pour l'intérêt que vous porterez à ce document.

Ce travail a été effectué dans l'équipe V-SAT (Vecteurs : Synthèse, Applications & Toxicologie), qui fait partie du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives de la faculté de pharmacie d'Illkirch. La réalisation de ces travaux de thèse a bien entendu nécessité que je sois intégré dans cette structure, et je tiens pour cela en premier lieu à remercier pour leur accueil le **Docteur Luc Lebeau** et le **Professeur Françoise Pons**, directeur et co-directeur de l'équipe V-SAT, et le **Docteur Jean-Serge Remy**, directeur du laboratoire.

Démarrée en octobre 2017 et initialement prévue sur 36 mois, ma thèse a finalement pu s'étendre jusqu'à presque 50 mois. J'adresse mes remerciements aux **soutiens financiers** qui ont rendu ces travaux de recherche et leur extension possibles : l'Agence Nationale de la Recherche, la Fondation pour la Recherche en Chimie, l'association Vaincre la Mucoviscidose, les financeurs de la prolongation accordée à la suite du confinement et de la crise sanitaire, le Centre National de la Recherche Scientifique, et l'Université de Strasbourg.

J'aimerais remercier le **Professeur Elias Fattal** et les **Docteurs Muriel Mercier-Bonin** et **Guy Zuber**, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier le **Professeur Maxime Lehmann** et le **Docteur Antoine Kichler** d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir ainsi apporté un regard extérieur et critique pour orienter les travaux.

J'ai eu le privilège d'effectuer à la fois mon stage de deuxième année de master et ma thèse dans une équipe à l'interface entre la chimie et la biologie. J'ai par conséquent dépassé les « noces de bois » avec les piliers de celle-ci.

Je souhaite remercier vivement ma directrice de thèse, le **Professeur Françoise Pons**. Des remarques toujours pertinentes, les pieds sur terre, une accessibilité comme, je pense, tous les doctorants en rêveraient pour leur propre directeur de thèse. Quelle aubaine de n'avoir que quelques pas à faire pour vous poser mille questions ! Vous avez rapidement su m'intégrer dans l'équipe dès mon stage de master et m'avez initié aux nanotechnologies et à la toxicologie dans le contexte pulmonaire. L'histoire a failli s'arrêter là, et pourtant, grâce à votre confiance et après plusieurs aller-retours avec l'ANR et l'école doctorale, j'étais de retour quatre mois plus tard pour une nouvelle aventure dans l'équipe. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, même quand il s'agissait (encore ?!) de commander des inserts, merci pour votre encadrement, merci pour tout.

Je remercie également le **Docteur Anne Casset**, qui a encadré ma thèse. Quand les résultats balayaient froidement les hypothèses, les espoirs, et les plans des manips qui étaient prévues dans les semaines à venir, rien n'était totalement perdu tant que ce n'était pas encore passé par la tête de Anne. En un rien de temps, les échecs se transformaient en nouvelles hypothèses ! Lors de nos longues discussions, nous étions en équilibre parfait entre enthousiasme et retenue, entre excitation et prudence – et j'ai le sentiment que c'est exactement ce qu'il fallait pour affronter ce sujet ! Merci pour ton écoute, ta confiance, ton implication dans le projet, et bon courage pour la suite des aventures sur le mucus (et n'oublie pas qu'avec Calu, on n'est jamais déçu) !

J'exprime toute ma gratitude au **Docteur Luc Lebeau**. La partie chimie de ce projet aurait bien entendu été totalement impossible sans son implication. Merci de ne pas avoir hésité à mettre la main à la pâte pour concrétiser le concept des lipides polysoufrés, et d'avoir toujours consacré de ton temps pour éclairer les points de chimie qui étaient obscurs.

Je remercie encore une fois le **Docteur Carole Ronzani**, notamment pour le temps qu'elle a sacrifié dès mon arrivée dans l'équipe pour me donner les bons réflexes en culture cellulaire.

Merci aussi au **Docteur Aurélie Bourderieux**, toujours prête à me conseiller (et avec le sourire, en plus !) lorsque je m'infiltrais dans le labo de chimie pour manipuler des trucs.

Si son personnel permanent est indispensable à la pérennité de l'équipe V-SAT, toutes les autres personnes qui y ont fait halte pendant plus ou moins longtemps ont contribué à lui donner son souffle de vie. Pour cela, j'aimerais remercier, par ordre chronologique :

Mickaël Rapp. Une partie de ce travail vient de toi, car tu as synthétisé la plupart des composés, et tu t'es chargé d'en préparer des aliquots jusqu'à ton dernier jour au labo. Mais c'est pour les fous rire que tu as générés, pour les supers moments qu'on a passés avec le reste de la troupe, et pour ta volonté d'aider en toute circonstance, que je souhaite t'adresser mes remerciements les plus sincères. Un seul bémol toutefois... quand on a une telle présence et qu'on s'en va, on laisse un grand vide !

Le **Docteur Mickaël Claudel**. Je ne sais pas si, comme tu l'as écrit il y a quelques années maintenant dans tes propres remerciements, il est rare de rencontrer des gens comme moi. Mais alors des morceaux comme toi, ça, j'en suis persuadé : on n'en croise vraiment pas souvent ! Avec la tête aussi proche des nuages, pas étonnant que certaines phrases paraissent générées parfaitement aléatoirement. Une chose est sûre, j'ai passé de bons moments en ta compagnie, et je pense que tu mérites qu'on lève les yeux vers toi (alors regarde toi aussi en-dessous de ton menton !).

Le **Docteur Boris Gaillard**. « Et là, tu transfères 2 μ L de chaque puits dans la nouvelle plaque », disait Boris avant de répéter ce mouvement 287 fois, un demi-sourire aux lèvres. Merci de m'avoir inculqué ton expérience en transfection dès le départ pour que je puisse à mon tour me régaler du plaisir de transférer, et pour tes conseils précieux de manière générale.

Le **Docteur Jiahui Fan**. I was not a good enough student to learn how to properly thank someone in Chinese. However, I am definitely not trusting google translator anymore, so...: thank you! I hope you are doing fine where you are.

Léo. J'écris ces remerciements avec un énorme sourire. Qu'il soit absurde ou subtil, ton humour a rendu les moments passés en ta compagnie absolument délirants et inoubliables. Je suis certain que tes qualités te mèneront jusqu'à l'épanouissement que tu mérites.

Pauline. J'aurais adoré te voir passer régulièrement du côté bio' pour pouvoir apprécier ta présence plus souvent. Pour ta sincérité, tes mots justes et ton attitude positive, je te remercie vivement, et j'espère qu'on pourra continuer à se retrouver souvent.

Juliette. Forcément, parmi tous les spécimens qui sont passés par le labo, il fallait que certains soient plus discrets. Mais ton calme ne t'a pas empêchée de t'intégrer et de rendre le quotidien plus harmonieux, et pour cela, merci beaucoup.

Zaid. De la Malaisie à la France, ça fait quand même une sacrée trotte. En tout cas, je suis content que tu sois venu jusqu'ici pour nous faire goûter un gâteau vert (même si j'en ai oublié le nom !) et pour nous illuminer de ton sourire.

Thomas. Je regrette que les longs couloirs de la Fac aient réduit nos occasions d'interagir. Quoi qu'il en soit, je retiendrai ta gentillesse et ta disponibilité et j'espère que cette première expérience te donnera de l'élan pour la suite.

Lucie. Un condensé de vie, d'énergie et de curiosité. Toujours disposée à lancer des débats et à embellir la journée. Je n'aurais probablement pu rêver d'une meilleure première stagiaire ! Mon seul regret est que ton passage au labo ait été si court. Je te remercie vivement pour ton implication et te souhaite une carrière brillante et enrichissante.

Benjamin. J'espère que tu seras fier de retrouver une partie de ton travail de stage dans ce manuscrit. J'ai beaucoup apprécié nos discussions et ton intérêt pour le sujet et je te souhaite de trouver une opportunité qui saura assouvir ta curiosité.

Léa, Alexandra, Ioana, Ophélie et Ambroise. Les occasions d'échanger avec vous ont été plus rares mais je ne vous oublie pas : merci.

Je souhaite également remercier les personnes qui n'étaient pas dans l'équipe mais qui ont tout de même gravité plus ou moins loin de mon sujet de thèse.

Et en premier lieu, le **Professeur Pascal Didier**. Tu as sans conteste relevé le niveau de ce travail en y apportant ton expertise en biophysique. D'un point de vue personnel, j'ai apprécié ta patience, ton côté pédagogue et ta disponibilité : des qualités indispensables lorsque l'on explique des concepts

mathématiques et biophysiques sophistiqués à des néophytes. Merci infiniment pour cela et pour ton implication.

J'aimerais aussi remercier les **chercheurs de l'équipe Rennaise**, dirigée par le **Professeur Vincent Lagente**, pour les discussions et réunions intéressantes que nous avons eues autour du projet.

En démarrant les études supérieures en 2012 dans un IUT, je ne projetais absolument pas de me retrouver en doctorat six ans plus tard. Cette passion pour le monde de la recherche a germé en moi grâce à certaines personnes dont j'ai croisé la route, et en particulier mes encadrants de stage que je remercie une nouvelle fois : **Christian Kapp** et les **Docteurs Françoise Bringel, Etienne Herrbach, et Philippe Carl**.

Quand je parvenais à m'arracher à la vie de laboratoire, j'étais heureux de pouvoir retrouver des personnes dont la présence me redonnait de l'énergie. **Yonca**, pour ton ouverture d'esprit qui a fait que même les plus longues de nos discussions paraissaient ne durer qu'un instant. **Renaud**, parce que c'est toujours un plaisir de croiser ton navire au milieu de l'océan pour passer un bon moment en trinquant en souvenir de nos péripéties. **Julien, Titu, Claire et Lisa**, parce que les aventures que j'ai vécues avec vous étaient toujours des grands moments d'évasion.

J'aimerais aussi remercier les **harmonies de Saint-Hippolyte et de Ribeauvillé**, dirigées par Pascal, l'**harmonie d'Ostheim**, dirigée par Sandro, et le **Liberty Big Band**, dirigé par Serge. Peu importe à quel point les semaines pouvaient être éprouvantes, après seulement quelques notes avec ces musiciens, je me retrouvais transporté dans un monde où les problèmes n'existent plus et où les mots ne sont plus assez forts pour décrire ce que l'on peut y vivre. Merci pour tous ces moments qui résonnent encore en moi.

J'ai volontairement omis de citer deux personnes lors des remerciements de celles et ceux qui ont travaillé à mes côtés dans l'équipe V-SAT pour leur réserver une place spéciale à la fin de ces remerciements :

Le **Docteur Maud Weiss**. Tu m'as aidé dans ce travail de recherche, tu m'as aidé à m'intégrer dans le laboratoire, tu m'as aidé dans ma vie personnelle... tu as été un soutien dans absolument tous les moments de cette thèse. Notre quotidien était rythmé par les sifflotements, la vérification du menu du RU (« encore du jambalaya Thomas ! »), et surtout par les fous rires et délires à répétition. La longue liste de nos meilleurs délires a déjà été faite : je ne vais pas la refaire ici pour ne pas rendre un manuscrit qui (quette !) aurait plus de pages de remerciements que de résultats !

Je te l'ai déjà dit, mais je n'ai jamais rencontré quelqu'un qui était aussi ouvert d'esprit, intelligent, et humain à la fois, que ce soit en sciences, dans les relations avec les autres, ou dans tout le reste d'ailleurs. Sincèrement. Et en plus on s'accorde tellement niveau humour qu'on rigole même avant d'avoir dit la moindre connerie ! Bref : merci pour ce que tu es, merci pour tout, et... kukuuuu !

Yasmin Arezki. Un simple fou rire au départ. Puis la découverte de passions communes : fromage, commérage, habillage, maquillage... (ui ui tu as bien lu). Puis encore et encore des fous rire, sur tout et n'importe quoi. En quelques mois, elle était là : LA relation merveilleuse. Et puis sont apparus des moments plus difficiles, plus chargés, plus tendus, plus stressants, plus démotivants...

Et rien n'a changé ! Parce que tu étais là, parce que tu m'as soutenu, parce que tu as su transformer les pires moments en bons moments. Sans toi, j'aurais probablement volé, volé et encore volé, jusqu'à l'épuisement. Et dire qu'après le départ de Maud, je pensais que je ne tomberais jamais plus sur quelqu'un d'aussi attaqué qu'elle et moi... Oh yeeee... En tout cas, j'ai passé une excellente « fin » de thèse avec toi, et j'espère que je vais pouvoir continuer à te (me ?) contredire sans arrêt encore longtemps ! Vraiment, merci, merci, et encore merci pour tout. Finito pipo !

En dernier lieu je tiens à remercier ma famille :

Mes trois frères, **Quentin (et sa petite famille), Renaud,** et **Sylvain.** Je n'ai absolument aucun doute sur le fait que, quoi que l'avenir nous réserve, nous resterons plus soudés que n'importe quelle autre fratrie (notez que ça ne signifie pas forcément que je souhaite que vous m'étreigniez à m'en couper le souffle). Bref, quand est-ce qu'on va se faire péter le bid' ?

Mes parents, **Odette** et **Michel.** Les mots sont trop faibles pour exprimer à quel point vous avez été, êtes et serez toujours indispensables. Vous m'avez inculqué des valeurs que l'on n'assimile nulle part ailleurs, peu importe le niveau d'étude. Des valeurs sans lesquelles je ne serais jamais arrivé où j'en suis aujourd'hui. Je ne vous remercierai jamais assez pour ce que vous êtes et pour ce que vous faites pour moi. Merci.

Notre « petit chien », **Orca,** parce que c'est un plaisir indescriptible de se faire sauter dessus par une boule blanche en rentrant à la maison. Une boule blanche qui parle, qui plus est !

Mamie. Merci pour tes encouragements et ton soutien sans faille. Je n'oublie bien sûr pas **Papy,** qui, malgré sa discrétion, m'a soutenu dans ce travail même sans pouvoir le suivre jusqu'à sa conclusion.

Liste des abréviations

–A–

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ALI	Interface air-liquide
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASO	Oligonucléotide antisens

–B–

BAL	Lavage bronchoalvéolaire
BET	Bromure d'éthidium
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>

–C–

CACC	<i>Ca²⁺-activated chloride channels</i>
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CPP	Peptides de pénétration cellulaire
CRISPR/Cas-9	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/caspase 9</i>
Ctrl	Contrôle négatif
CV	Coefficient de variation

–D–

DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
DOGS	Diocadécylamidoglycylspermine
DOPC	1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOTMA	Chlorure de 1,2-di-oléoyloxy-3-triméthylammonio propane
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DTT	Dithiothréitol

–E–

EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>EGF-receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENAC	<i>Epithelial Na⁺ channel</i>
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i>
EtOH	Éthanol

–F–

FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
FSC	<i>Forward scattered light</i>
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>

–G–

GL67	<i>Genzyme lipid 67</i>
------	-------------------------

–H–

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
-------	---

–I–	
IgG	Immunoglobuline de type G
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
i.v.	Intraveineuse
–K–	
kb	kilobase
KO	<i>Knock-out</i>
–L–	
LDH	Lactate déshydrogénase
LLI	Interface liquide-liquide
–M–	
miARN	Micro ARN
MC	Milieu de culture complet
MEB	Microscopie électronique à balayage
MECS	Vecteur décoré par des enzymes mucolytiques
MET	Microscopie électronique à transmission
MFI	Valeur moyenne d'intensité de fluorescence
MPT	<i>Multiple particle tracking</i>
MSD	<i>Mean squared displacement</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
–N–	
NAC	<i>N</i> -acétylcystéine
nd	Non déterminé
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NLS	Signal de localisation nucléaire
N/P	Rapport de charge d'un complexe
N/P _c	Valeur du rapport N/P à partir de laquelle tout l'ADN est complexé au lipide
ns	Non significatif
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
–O–	
OMS	Organisation mondiale de la Santé
–P–	
PAA	Acide polyacrylique
PAE	Polyaminoester
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS tween
PCL	Couche périciliaire
PdI	Indice de polydispersité
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEI	Polyéthylèneimine
PGM	Mucine gastrique de porc
PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PLL	Poly-L-lysine
PVA	Alcool polyvinylique
–Q–	
QCM-D	<i>Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i>
–R–	
Rhodamine-PE	<i>1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>Relative luminescence unit</i>
–S–	
SANS	<i>Small angle neutron scattering</i>

SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SD	Écart-type
SEDDS	<i>Self-emulsifying drug delivery system</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siARN	Petit ARN interférent
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SSC	<i>Side scattered light</i>
STP	Sérine thréonine proline
–T–	
TBA-D	<i>N</i> -dodécylamine-(4-mercaptobutyl)amidine
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TGA-O	2-mercapto- <i>N</i> -octylacétamide
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
–U–	
U.A.	Unité arbitraire
–V–	
V-SAT	Vecteurs : Synthèse, Applications & Toxicologie
vWF	<i>von Willebrand factor</i>
–W–	
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
–X–	
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

Table des matières

Liste des figures	18
Liste des tableaux	22
Avant-propos	24
INTRODUCTION GÉNÉRALE	26
I. Transfection.....	28
I.1. Acides nucléiques thérapeutiques.....	28
I.1.1. ADN	28
I.1.2. ARN messagers	29
I.1.3. siARN et miARN.....	29
I.1.4. Oligonucléotides antisens	30
I.2. Vecteurs d'acides nucléiques.....	30
I.2.1. Vecteurs viraux	31
I.2.2. Vecteurs non viraux	33
I.3. Mécanismes de la transfection.....	37
I.3.1. De l'administration à la cellule.....	37
I.3.2. De l'entrée dans la cellule à la production de la protéine.....	39
I.4. Applications de la thérapie génique dans le poumon	45
II. Mucus.....	48
II.1. Biologie du mucus.....	48
II.1.1. Composition.....	48
II.1.2. Caractéristiques physicochimiques	51
II.2. Fonction de barrière	56
II.2.1. Barrière adhésive	57
II.2.2. Barrière physique	58
II.2.3. Barrière dynamique.....	60
II.3. Autres fonctions	60
II.4. Modifications du mucus au cours des maladies inflammatoires chroniques du poumon.....	61
II.4.1. Mucoviscidose et mucus	61
II.4.2. Asthme et mucus	63
II.4.3. BPCO et mucus.....	64
III. Modèles et méthodes d'étude du mucus.....	66
III.1. Modèles de mucus	66
III.1.1. Mucus pulmonaire humain.....	66
III.1.2. Mucus pulmonaire d'origine animale	68
III.1.3. Modèles à base de mucines purifiées	69
III.2. Modèles cellulaires pulmonaires producteurs de mucus.....	71
III.2.1. Cellules primaires	71
III.2.2. Lignées cellulaires.....	73
III.3. Méthodes d'étude de l'interaction des particules avec le mucus	75
III.3.1. Modifications des propriétés biophysiques du mucus	76
III.3.2. Changement des propriétés de la particule.....	76
III.3.3. Diffusion des particules dans le mucus.....	79
IV. Stratégies pour franchir la barrière mucoale.....	87
IV.1. Limiter les interactions des particules avec le mucus	87
IV.2. Particules mucoadhésives	89
IV.3. Agents mucolytiques	90
IV.4. Particules décorées par des enzymes mucolytiques.....	93

IV.5. Autres particules mucolytiques.....	94
Objectifs de la thèse.....	95
MATÉRIEL ET MÉTHODES	96
I. Synthèse des composés	98
II. Préparation des lipoplexes	98
II.1. Lipoplexes à base de lipides oxygénés ou monosoufrés, préparés à partir d'un film.....	98
II.2. Lipoplexes à base de lipides oxygénés ou monosoufrés, préparés par injection.....	98
II.3. Lipoplexes à base de lipofectamine	99
III. Caractérisation des formulations.....	99
III.1. Complexation de l'ADN.....	99
III.2. Détermination de la taille, de la charge et de la concentration en particules	99
IV. Culture cellulaire	100
IV.1. Induction de la production de mucus par les cellules NCI-H292 cultivées en plaque (modèle 2D)	101
IV.2. Induction de la production de mucus par les cellules Calu-3 cultivées sur inserts (modèle 3D)	102
IV.3. Expériences de transfection.....	102
IV.4. Mesure de la viabilité et de la nécrose cellulaires.....	103
IV.5. Mesure de l'internalisation des lipoplexes.....	103
V. Récupération du mucus produit par les cellules en culture	104
VI. Caractérisation du mucus cellulaire.....	104
VI.1. Dosage de MUC5AC.....	104
VI.2. Dosage des mucines totales	105
VI.3. Observation du mucus en microscopie confocale.....	105
VI.4. Mesure des propriétés rhéologiques du mucus	105
VII. Interaction des lipoplexes avec le mucus	106
VII.1. Stabilité des lipoplexes dans le mucus	106
VII.2. Effet des lipoplexes sur les propriétés rhéologiques du mucus	106
VII.3. Pénétration des lipoplexes dans la couche de mucus	107
VII.4. Diffusion des lipoplexes dans le mucus	108
VIII. Analyse statistique des résultats.....	109
RÉSULTATS.....	110
I. Conception des lipides, et préparation et caractérisation des formulations	112
I.1. Conception des lipides.....	112
I.2. Préparation des formulations.....	116
I.3. Caractérisation des formulations	117
I.3.1. Caractérisation des formulations obtenues à partir d'un film.....	118
I.3.2. Caractérisation des formulations obtenues par injection.....	123
I.3.3. Caractérisation des formulations incorporant les lipides polysoufrés.....	124
I.3.4. Caractérisation des formulations incorporant un fluorophore.....	126
II. Modèles d'épithélium producteurs de mucus pour étudier la délivrance d'acide nucléique dans le poumon	130
III. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques monosoufrés.....	174
III.1. Évaluation des formulations obtenues à partir d'un film de lipide	174
III.1.1. Stabilité des formulations dans le mucus	174
III.1.2. Effet mucolytique des formulations	177
III.1.3. Efficacité de transfection des formulations	186
III.2. Évaluation des formulations obtenues par injection	189

III.2.1. Stabilité des formulations dans le mucus	190
III.2.2. Effet mucolytique des formulations	190
III.2.3. Efficacité de transfection des formulations	191
III.2.4. Internalisation des formulations	193
IV. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques et de lipides <i>helper</i> polysoufrés	198
IV.1. Stabilité des formulations dans le mucus.....	198
IV.2 Effet mucolytique des formulations.....	199
IV.3. Efficacité de transfection des formulations	207
DISCUSSION	212
I. Choix et caractérisation des modèles d'étude.....	214
I.1. Choix des modèles cellulaires	214
I.2. Choix du modèle de mucus	216
I.3. Caractérisation des modèles	217
II. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques monosoufrés ou de lipides <i>helper</i> polysoufrés	224
II.1. Formulations à base de lipides cationiques monosoufrés.....	224
II.2. Formulations à base de lipides <i>helper</i> polysoufrés	226
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	232
VALORISATION DU TRAVAIL DE THÈSE	234
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	236

Liste des figures

Figure 1 : Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique	32
Figure 2 : Formules de lipides mono- ou polycationiques, de polymères cationiques, de lipides neutres utilisés comme lipides <i>helper</i> et du PEG.....	34
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation supramoléculaire des lipoplexes.....	35
Figure 4 : Influence de la taille des particules sur leur dépôt dans les voies respiratoires	38
Figure 5 : Obstacles à la transfection à l'échelle de la cellule.....	40
Figure 6 : Dilemme de la charge de surface en transfection.....	41
Figure 7 : Endocytose médiée par les clathrines ou les cavéolines.....	43
Figure 8 : Échappement endosomal par le phénomène de « flip-flop » ou d'éponge à protons	44
Figure 9 : Structure des mucines.....	49
Figure 10 : Schéma de l'organisation du mucus dans le tractus respiratoire.....	51
Figure 11 : Comportement rhéologique du mucus pulmonaire	52
Figure 12 : Architecture du mucus respiratoire proposée par Meziu <i>et al.</i>	55
Figure 13 : Les trois particularités du mucus en tant que barrière	56
Figure 14 : Structure du mucus proposée dans certaines études.....	59
Figure 15 : Rôle central de la viscoélasticité du mucus dans l'effet boule de neige observé dans la mucoviscidose	62
Figure 16 : Réticulation de la PGM par le DMSO selon Yuan <i>et al.</i>	71
Figure 17 : Modes de culture des cellules épithéliales pulmonaires.....	72
Figure 18 : Cellules Calu-3, cultivées sur inserts en ALI ou en LLI	75
Figure 19 : Diverses méthodes d'étude de diffusion.....	81
Figure 20 : Méthodes principales de détermination du coefficient de diffusion de particules fluorescentes dans le mucus	83
Figure 21 : Stratégies développées pour vaincre la barrière du mucus	87
Figure 22 : Structure de l'EDOPC et des lipides cationiques développés dans l'équipe V-SAT et principe de l'interaction lipide/ADN	112
Figure 23 : Risque d'augmentation de la microviscosité du mucus par le traitement avec un agent mucolytique.....	114
Figure 24 : Principe d'action des lipides monocationiques mucolytiques développés dans ce travail	114
Figure 25 : Formule chimique des lipides hydrolysables monosoufrés et de leurs analogues oxygénés étudiés dans ce travail	114

Figure 26 : Formule chimique des lipides <i>helper</i> polysoufrés S3 et S7	115
Figure 27 : Schéma récapitulatif des deux méthodes de préparation des lipoplexes utilisées dans ce travail.	116
Figure 28 : Détermination du rapport N/P _c par la technique de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose	118
Figure 1 (article): Chemical structure of EDMPC, EDOPC and of the biolabile DOPC-based cationic lipids 1-6 investigated herein.....	137
Figure 2 (article): Mucus production in the NCI-H292 and Calu-3 2D- and/or 3D-models	145
Figure 3 (article): Transfection efficiency of the lipids 1-6, as a function of the N/P ratio in the Calu-3 2D-model.....	146
Figure 4 (article): pDNA transfection mediated by the lipids 1-6 and L2k in the different culture models	147
Figure 5 (article): Mucus production and transfection efficiency in various 3D-models.....	149
Figure 6 (article): Bulk rheology of the mucus produced by Calu-3 cells grown at the ALI for 7 and 14 d	150
Figure 7 (article): Diffusion of 3/pDNA lipoplexes (N/P of 4) in mucus collected from Calu-3 2D- and 3D-models, as determined by MPT analysis	151
Figure 8 (article): Confinement areas of 3/pDNA lipoplexes in mucus collected from Calu-3 2D- and 3D-models, as determined by MPT analysis	153
Figure S1 (article): DNA complexation ability of the cationic lipids 1-6	169
Figure S2 (article): Mucins content in mucus samples collected from selected NCI-H292 or Calu-3 2D-models as a function of MUC5AC protein levels	170
Figure S3 (article): Cell viability measured in the NCI-H292 and Calu-3 2D- and 3D-models upon transfection experiments	170
Figure S4 (article): Transfection activity of 3/pDNA complexes (N/P of 4) in the Calu-3 2D-model or in Calu-3 cultures on inserts at the LLI for 14 d, and MUC5AC levels in the mucus samples collected from those models.....	171
Figure S5 (article): Transfection activity of 3/pDNA complexes (N/P of 4) in the 14-d Calu-3 3D-model.....	171
Figure S6 (article): Impact of mucus removal on transfection activity of lipoplexes in the 14-d Calu-3 3D-model.....	172
Figure S7 (article): Bulk rheology of mucus from Calu-3 3D-models	172
Figure 29 : Stabilité des lipoplexes préparés à partir d'un film dans le mucus cellulaire	176
Figure 30 : Production relative de MUC5AC par les cellules NCI-H292 cultivées en plaque, traitées ou non à l'EGF, et dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque	177
Figure 31 : Stabilité des lipoplexes préparés à partir d'un film à base de lipide C8 ou TC8 dans le mucus cellulaire	177
Figure 32 : Modifications rhéologiques du mucus induites par le DTT	179

Figure 33 : Modifications rhéologiques du mucus induites par les lipoplexes formés à partir d'un film de lipide C8 ou de lipide TC8.....	180
Figure 34 : Modifications rhéologiques du mucus induites par l'octan-1-ol ou l'octan-1-thiol.....	181
Figure 35 : Diffusion des billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm de diamètre dans l'eau, dans le MC, et dans le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours	184
Figure 36 : Diffusion des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide C8 ou de lipide TC8 dans le MC ou dans le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours	185
Figure 37 : r_c des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide C8 ou de lipide TC8 dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours	185
Figure 38 : Efficacité de transfection des lipoplexes formés à partir d'un film de lipides monosoufrés ou de leurs analogues oxygénés dans les six modèles cellulaires	187
Figure 39 : Viabilité des cellules dans les expériences de transfection de la figure 38	188
Figure 40 : Efficacité de transfection de lipoplexes contenant différentes proportions de lipides oxygénés ou monosoufrés, sans ou avec 1 équivalent de DOPE, dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque	189
Figure 41 : Stabilité des lipoplexes préparés par injection à base de lipide C8 dans le mucus cellulaire	190
Figure 42 : Effet des lipoplexes préparés par injection à base de lipide C8 ou de lipide TC8 sur les propriétés rhéologiques du mucus	191
Figure 43 : Efficacité de transfection, à 24 h, des lipoplexes préparés par injection à base de lipide C8 ou de lipide TC8, dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque ou en ALI pendant 14 jours	192
Figure 44 : Efficacité de transfection, à 72 h, des lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8, préparés à partir d'un film ou par injection, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours.....	193
Figure 45 : Présence d'ADN intracellulaire marqué au Cy5 dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, après 24 h d'exposition à des lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8 obtenus à partir d'un film ou par injection et incorporant de l'ADN marqué au Cy5	194
Figure 46 : Internalisation de l'ADN marqué au Cy5 dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, après 4 h d'exposition aux lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8 obtenus à partir d'un film ou par injection.....	196
Figure 47 : Stabilité, dans le mucus cellulaire, des lipoplexes à base du lipide C8 incorporant le lipide polysoufré S3 ou S7	199
Figure 48 : Modifications rhéologiques du mucus induites par les lipoplexes obtenus par injection à partir du lipide C8 en présence ou en absence de 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7	200
Figure 49 : Diffusion des lipoplexes à base de lipide C8 incorporant, ou non, 1 équivalent de lipide S7 ou 3 équivalents de lipide S3 dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours	202
Figure 50 : r_c des lipoplexes, mesuré dans les mêmes conditions que dans la figure 49.....	203
Figure 51 : Pénétration dans le mucus des lipoplexes à base du lipide C8, incorporant ou non 3 équivalents de lipide S3.....	205

Figure 52 : Internalisation et activité de transfection des lipoplexes à base de lipide C8 incorporant ou non 3 équivalents de lipide S3, dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, après 4 h ou 24 h de contact des lipoplexes avec les cellules	206
Figure 53 : Activité de transfection des formulations à base de lipide C8, contenant ou non 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7, en fonction du rapport N/P	207
Figure 54 : Impact du nombre d'entités thiols dans les formulations sur l'efficacité de transfection des lipoplexes à base du lipide C8	208
Figure 55 : Efficacité de transfection des lipoplexes préparés à partir des lipides oxygénés, au rapport N/P de 4, sans ou avec 3 équivalents de lipide S3, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours.....	209

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux virus utilisés en thérapie génique.....	32
Tableau 2 : Produits de thérapie génique utilisant un ADN ou un siARN ayant été autorisés pour un traitement <i>in vivo</i>	46
Tableau 3 : Taille des pores du mucus pulmonaire	53
Tableau 4 : Impact de la charge des particules sur leur interaction avec le mucus	57
Tableau 5 : Capacité des lipides cationiques oxygénés ou monosoufrés à complexer l'ADN dans les formulations obtenues à partir d'un film.....	119
Tableau 6 : Comparatif des principales valeurs caractéristiques de taille et de dispersion de taille obtenues par NTA et DLS sur des formulations à base du lipide C8 obtenues à partir d'un film.....	121
Tableau 7 : Caractéristiques de taille et de charge des lipoplexes dans les formulations obtenues à partir d'un film à base de lipide oxygéné ou monosoufré pour des rapports N/P de 1, 2 et 4	122
Tableau 8 : Tableau comparatif des valeurs caractéristiques de taille et de dispersion obtenues par DLS sur des formulations à base de lipide C8 préparées par injection	124
Tableau 9 : Tailles et charges des formulations à base de lipide C8 ou TC8, obtenues à partir d'un film ou par injection	124
Tableau 10 : Capacité du lipide C8 à complexer de l'ADN dans des formulations obtenues par injection en présence, ou non, de 1 ou 3 équivalents molaires de lipide polysoufré S3 ou S7.....	125
Tableau 11 : Taille et charge des formulations à base de lipides oxygénés (N/P de 4) obtenues par injection en présence, ou non, de lipide polysoufré S3 ou S7 (1 ou 3 équivalents molaires).....	126
Tableau 12 : Taille des formulations obtenues à partir d'un film du lipide C8 dopé à 1% molaire avec de la rhodamine-PE (rapport N/P de 4).....	127
Tableau 13 : Taille et charge des formulations à base de lipide C8 incorporant un fluorophore, obtenues par injection.....	127
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des valeurs de N/P_c , déterminées par la technique de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose, et des valeurs de taille, de dispersion de taille, et de charge de l'ensemble des formulations (au rapport N/P de 4) déterminées par DLS	129
Table 1 (article): 2D- and 3D-models used in the study.....	136
Table 2 (article): Physical characteristics of the lipid/pDNA complexes prepared from compounds 1 to 6 at N/P of 4.....	144
Tableau 15 : Taille, polydispersité et charge des billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm...	182

Avant-propos

La thérapie génique consiste à traiter une pathologie en introduisant un acide nucléique dans les cellules d'un tissu cible dans le but d'exprimer ou réprimer un gène. Cette stratégie thérapeutique est considérée comme une approche prometteuse pour de nombreuses pathologies, notamment les maladies pulmonaires chroniques telles que la mucoviscidose, l'asthme, ou la bronchopneumopathie chronique obstructive. La voie pulmonaire est la voie d'administration privilégiée des médicaments ciblant le poumon, notamment car elle est non invasive. Une grande variété de vecteurs viraux et non viraux sont développés pour promouvoir l'activité thérapeutique des acides nucléiques administrés par voie pulmonaire. Parmi eux, nombreux sont ceux qui montrent une activité prometteuse *in vitro* voire *in vivo*, révélant leur capacité à protéger l'acide nucléique du point d'administration jusqu'à la cible intracellulaire. Toutefois, en amont de leur entrée dans les cellules pulmonaires visées, les particules de transfection doivent surmonter l'un des défis majeurs du poumon, qui tient une place centrale dans ce travail : le mucus. Barrière adhésive, physique, et dynamique, le mucus a pour rôle de condamner l'accès des particules exogènes inhalées à l'épithélium pulmonaire, qu'il s'agisse de pathogènes, de corps étrangers, ou de particules de transfection. Aujourd'hui, pour envisager de traiter des maladies pulmonaires obstructives, au cours desquelles le mucus est hypersécrété, il est clair que l'efficacité des systèmes développés reste globalement insuffisante, et qu'il faut poursuivre le développement de nouveaux vecteurs en tenant compte, dès le départ, de l'obstacle incontournable que représente la couche de mucus qui recouvre l'épithélium des voies respiratoires.

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

I. Transfection

La transfection correspond au processus de transfert d'un matériel génétique exogène dans une cellule. En thérapie génique, la transfection, *ex vivo* ou *in vivo*, des cellules d'un tissu cible vise à réguler l'expression d'un gène dans le but de traiter une pathologie. Les efforts continus des dernières décennies pour identifier et comprendre les mécanismes impliqués dans l'ensemble des pathologies n'ont cessé d'allonger la liste des cibles génomiques potentielles. Depuis, des acides nucléiques thérapeutiques qui permettraient d'activer, de modifier, ou d'inhiber un ensemble de gènes impliqués dans des mécanismes pathologiques, ont été proposés.

I.1. Acides nucléiques thérapeutiques

I.1.1. ADN

Alors qu'elle a été une des premières idées à émerger aux prémices de la thérapie génique (Friedmann and Roblin, 1972; Rogers and Pfuderer, 1968), la délivrance d'une molécule d'ADN portant une version fonctionnelle d'un gène dans une cellule cible est restée un objectif de premier plan de la thérapie génique. Aujourd'hui, les molécules d'ADN développées pour des applications en thérapie génique (ou *a minima* en transfection) sont souvent des plasmides d'ADN, c'est-à-dire de l'ADN circulaire double brin. Sous sa forme la plus élémentaire, un plasmide d'ADN comporte le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur, ainsi qu'une origine de réplication bactérienne et un gène d'antibiorésistance pour permettre sa production par des bactéries.

La vectorisation d'un gène fonctionnel est une approche particulièrement prometteuse dans le traitement de nombreuses pathologies, en particulier les maladies héréditaires. Dans le poumon, la mucoviscidose (décrite plus en détail dans la partie II.3.1.) est une pathologie héréditaire qui touche les individus ayant une déficience dans le gène codant la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Le transfert d'une copie du gène CFTR normal dans un nombre suffisant de cellules des voies respiratoires permettrait de restaurer une activité CFTR par l'expression d'une protéine fonctionnelle, et ainsi d'améliorer la fonction respiratoire des patients, fonction dont la détérioration est la principale cause de morbidité.

S'il est possible de vectoriser de nombreux acides nucléiques (comme présenté ci-après), l'ADN est le seul acide nucléique qui peut être transmis aux cellules filles au gré des divisions cellulaires en s'intégrant au génome de la cellule (voir partie I.2.). Par ailleurs, les technologies d'édition du génome comme CRISPR/Cas-9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase 9*) promettent une insertion précise et dirigée, qui renforce les espoirs suscités par la thérapie génique, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose (Girón Moreno et al., 2021).

I.1.2. ARN messagers

L'ARN messenger (ARNm) est un acide nucléique produit lors de la transcription d'un gène et dont la traduction cytoplasmique par les ribosomes permet l'assemblage d'acides aminés, *i.e.* la synthèse d'une protéine. Le transfert d'ARNm a donc le même objectif que celui d'ADN : rétablir la production de protéines fonctionnelles. La vectorisation d'ARNm présente des avantages incontestables car, contrairement à l'ADN, l'ARNm ne nécessite qu'une délivrance cytosolique et ne peut en aucun cas s'intégrer involontairement au génome (Wahane et al., 2020). En revanche, les ARNm sont généralement plus fragiles et instables que les plasmides en raison de leur structure simple brin, même si des modifications chimiques peuvent être réalisées pour augmenter leur stabilité (Youn and Chung, 2015).

I.1.3. siARN et miARN

Les petits ARN interférents (*Small Interfering RNA*, siARN) et les micro ARN (miARN) sont des oligonucléotides non codants d'une vingtaine de nucléotides de long, principalement impliqués dans l'extinction (ou *silencing*) des gènes. Une fois internalisé, le siARN, grâce à sa structure en double brin, s'associe avec le complexe protéique cytoplasmique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), qui se servira du brin antisens du siARN comme d'un guide pour reconnaître et se fixer sur un ARNm complémentaire. *In fine*, l'appariement de l'ARNm avec l'ARN guide et le complexe RISC entraîne l'inhibition de sa traduction et/ou sa destruction (Catalanotto et al., 2016; Juliano, 2016). De la même manière, le miARN se replie sur lui-même pour former une épingle à cheveux qui peut également être reconnue par le complexe RISC et servir de guide. Si la reconnaissance d'un ARNm par le fragment guide du siARN doit s'effectuer avec une parfaite complémentarité, celle par le fragment guide du miARN peut se faire avec une complémentarité imparfaite, ce qui explique qu'un miARN peut cibler plusieurs ARNm.

L'inhibition spécifique de l'expression de gènes a été proposée comme une stratégie thérapeutique dans plusieurs pathologies, en particulier celles impliquant des réactions inflammatoires excessives. Dans l'asthme (décrit plus en détail dans la partie II.3.2.), par exemple, le *silencing* de l'interleukine-5 pourrait permettre de réduire les lésions pulmonaires résultant de l'inflammation chronique des poumons (Huang et al., 2008; Xie et al., 2016). Tagalakakis *et al.*, quant à eux, ont montré que le canal à sodium ENaC (*Epithelial Na⁺ Channel*) pourrait être une cible potentielle dans le traitement de la mucoviscidose (Tagalakakis et al., 2018).

I.1.4. Oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides antisens (ASO) sont des acides nucléiques non codants qui sont synthétisés de sorte à avoir une séquence complémentaire à un ARNm cible. La modification de l'expression d'un gène par un ASO peut être régie par différents mécanismes : destruction de l'ARNm, modification de son épissage, ou encore inhibition de sa traduction. Diverses modifications chimiques des ASO sont possibles en fonction du mécanisme visé (Juliano, 2016). Les ASO pourraient également être utilisés pour bloquer un ARN non codant responsable de la répression d'un gène, afin de restaurer l'expression de ce dernier, même si notre compréhension du rôle des ARN non codants est encore très superficielle (Zhou et al., 2016). Les premiers ASO développés étaient particulièrement fragiles et rapidement dégradés par les nucléases intracellulaires (Wahane et al., 2020). Désormais, comme dans le cas des ARNm, des adaptations chimiques sont souvent apportées aux ASO afin de réduire leur sensibilité. Certains ASO pourraient ainsi avoir des temps de demi-vie de 2 à 4 semaines selon le tissu considéré (Crooke et al., 2017). Pour reprendre l'exemple de la mucoviscidose, un ASO sous forme d'ARN simple brin a été proposé en 2015 pour réparer l'ARNm du gène CFTR portant la mutation la plus fréquente ($\Delta F508$) (Beumer et al., 2019).

Seuls quelques exemples de cibles génomiques potentielles ont été cités pour chaque type d'acide nucléique dans ce qui précède, mais il existe en réalité un très grand nombre de cibles proposées pour le traitement des pathologies impliquant une dérégulation (héréditaire ou acquise) de l'expression génique (par exemple la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne, le cancer ou encore le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)).

I.2. Vecteurs d'acides nucléiques

Les acides nucléiques peuvent montrer une certaine efficacité de transfection lorsqu'ils sont administrés seuls (Bonifazi et al., 2010; Liu et al., 1995; Zhang et al., 2004), et cette caractéristique est essentiellement rencontrée dans le cas des ASO (Crooke et al., 2017). Selon une revue de Ginn *et al.* datant de 2018, les acides nucléiques sont administrés seuls dans 16,6% des essais cliniques (Ginn et al., 2018). Le choix de ne pas administrer l'acide nucléique seul dans plus de 80% des études provient du fait que les acides nucléiques possèdent deux caractéristiques désavantageuses indéniables pour leur entrée dans une cellule : 1-une charge négative, défavorable à leur passage à travers la membrane cellulaire, elle-même chargée négativement, et 2-une sensibilité importante à de nombreuses enzymes des milieux biologiques, les dotant d'une stabilité métabolique médiocre. Par ailleurs, l'administration d'ADN nu limite la possibilité que celui-ci s'intègre au génome (par exemple par l'intermédiaire des intégrases des virus intégratifs, comme nous le verrons dans la partie I.2.1.). Or l'intégration du transgène au génome permet son expression prolongée et lui offre l'opportunité de se transmettre aux

cellules filles lors des divisions cellulaires. Sa non intégration oblige à ré-administrer périodiquement l'acide nucléique pour maintenir son activité thérapeutique.

La suite de cette partie décrit donc les différents vecteurs utilisés pour la délivrance intracellulaire des acides nucléiques *via* la formation de « particules de transfection » qui permettent, à la fois, de protéger le matériel génétique de la dégradation et de masquer ses charges négatives, en offrant parfois la possibilité d'une insertion dans le génome cellulaire.

1.2.1. Vecteurs viraux

Les premiers vecteurs d'acides nucléiques mis au point et utilisés chez l'Homme sont venus tout droit d'un exemple naturel performant : les virus. En effet, les virus sont des agents infectieux qui possèdent la capacité naturelle de transférer leur cargo génétique aux cellules qu'ils infectent. Bien que le résultat (infructueux) du premier essai de thérapie génique par inoculation virale fut publié en 1975 (Terheggen et al., 1975), c'est seulement 20 ans plus tard qu'un résultat d'essai clinique montrant une expression relativement persistante d'un transgène vectorisé par un virus a été publié (Blaese et al., 1995). Désormais, les virus développés pour la thérapie génique font l'objet de lourdes modifications de leur génome, qui ont pour but d'atténuer leur toxicité, si besoin, d'éliminer leur capacité de réplication et, éventuellement, de leur conférer une spécificité et une furtivité vis-à-vis de notre système immunitaire.

Les adénovirus et les rétrovirus sont à ce jour les virus les plus utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique utilisant des virus, et ils représentent à eux seuls plus de la moitié de ces essais cliniques (Ginn et al., 2018) (figure 1). Les adénovirus infectent une large gamme d'hôtes avec une très bonne efficacité, sont incapables d'intégrer leur génome dans la cellule hôte (« non intégratifs »), mais ont un fort potentiel immunogène (Lee et al., 2017). De leur côté, les rétrovirus ne transfèrent leur acide nucléique qu'aux cellules en division, mais ils sont intégratifs (Lundstrom, 2018). Les premiers essais de thérapie génique impliquant des rétrovirus ont montré que l'intégration au génome est aléatoire, entraînant l'apparition de leucémies chez certains patients traités (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Si des recherches sont menées pour corriger les défauts de ces deux familles de virus, deux autres types de virus sont de plus en plus utilisés : les lentivirus et les virus adéno-associés (Ginn et al., 2018). Les lentivirus, qui font partie de la famille des rétrovirus, infectent les cellules en division comme les cellules quiescentes et sont peu immunogènes (Lee et al., 2017). Les virus adéno-associés, en plus d'être non pathogènes pour l'Homme, rassemblent plusieurs des avantages des trois familles de virus présentées : ils peuvent transférer leur acide nucléique à la cellule hôte, qu'elle soit ou non en division, intègrent préférentiellement leur génome à une localisation précise et connue du 19^{ème} chromosome, et sont peu immunogènes (Lee et al., 2017). Cependant, leur gros désavantage est que la taille du cargo génétique qu'ils sont en mesure de transporter est limitée à 8,5 kb, ne laissant libres que 5 kb pour l'insert à vectoriser, contre un minimum de 8 kb pour les trois autres types de virus présentés (tableau 1).

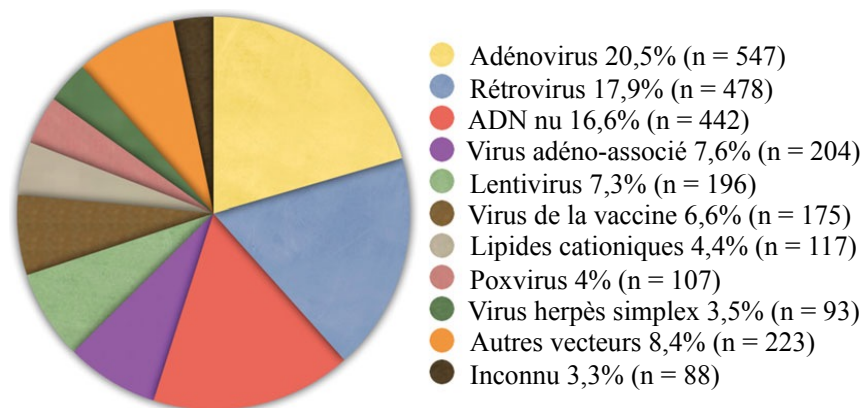


Figure 1. Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique (Ginn et al., 2018).

En étant impliqués dans près de 70% des essais cliniques, les virus sont de loin les vecteurs les plus utilisés à ce jour (Ginn et al., 2018). Cependant, les risques liés à leur pouvoir immunogène et à l'intégration aléatoire de leur génome ont imposé l'abandon de plusieurs essais cliniques au début des années 2000, soulignant la nécessité de ne pas négliger la dangerosité de ces vecteurs et de vérifier scrupuleusement leur innocuité dans les essais cliniques (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; McCormack and Rabbitts, 2004; Raper et al., 2003).

Virus	Adénovirus	Rétrovirus	Virus adéno-associé	Lentivirus
Taille de l'insert à vectoriser	8-36 kb	8 kb	5 kb	9 kb
Infection	Cellules en division ou non	Cellules en division uniquement	Cellules en division ou non	Cellules en division ou non
Potentiel inflammatoire, immunogénicité	Élevé	Faible	Faible	Faible
Intégration du transgène (si ADN)	Non	Oui (aléatoire)	< 10% d'intégration (site-spécifique)	Oui (aléatoire)

Tableau 1. Caractéristiques des principaux virus utilisés en thérapie génique (adapté de Lee et al., 2017).

I.2.2. Vecteurs non viraux

En parallèle de l'amélioration permanente des virus, des vecteurs alternatifs ont rapidement été mis à l'étude : les vecteurs non viraux. Pour se mettre au niveau d'entités biologiques spécialisées dans la vectorisation, les vecteurs non viraux avaient pour but de compenser les désavantages des virus, en proposant une fabrication à l'échelle industrielle et moins onéreuse, des risques biologiques moins élevés, et la possibilité de diversifier leurs propriétés et de transporter plus de matériel génétique. Si les vecteurs non viraux sont impliqués dans moins de 15% des essais cliniques (Ginn et al., 2018) (figure 1), il en existe aujourd'hui un nombre très important et ils présentent une grande diversité. Aussi, seuls les plus représentatifs sont présentés dans les paragraphes suivants.

- Lipides

Les lipides sont des composés qui ont la particularité d'avoir toute ou une partie de leur structure chimique qui est insoluble dans l'eau, ou hydrophobe. La nature amphiphile (*i.e.* comportant une tête hydrophile et une queue hydrophobe) de certains lipides leur permet d'agir comme des composants structuraux des membranes biologiques. Cette caractéristique est exploitée pour encapsuler des acides nucléiques ou d'autres molécules thérapeutiques dans des vésicules lipidiques (des liposomes) formés à partir de lipides neutres, en fabriquant simplement les liposomes dans une solution d'acide nucléique. Néanmoins, seule une partie du volume de la solution est encapsulée de cette manière, et les lipides principalement utilisés en formulation pour le transfert de gènes sont des lipides cationiques.

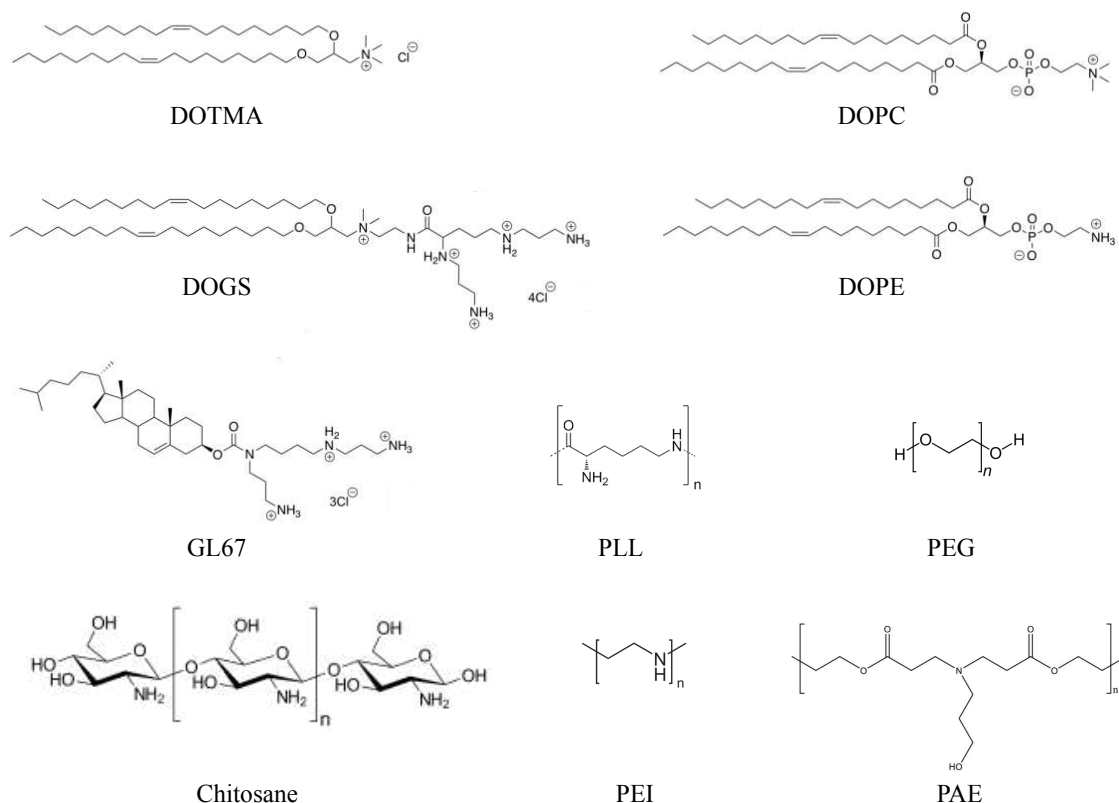


Figure 2. Formule de lipides mono- (DOTMA) ou polycationiques (DOGS, GL67), de polymères cationiques (chitosane, exemple d'un PAE, PLL, PEI), de lipides neutres utilisés comme lipides *helper* (DOPC, DOPE) et du PEG.

La charge positive de la tête polaire d'un lipide cationique lui permet en effet de s'associer à l'acide nucléique par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. De plus, les interactions hydrophobes entre les chaînes grasses de ces lipides permettent la condensation du matériel génétique. Les complexes lipide/acide nucléique qui résultent de ces interactions sont des particules appelées lipoplexes. Les lipoplexes peuvent être préparés par différentes méthodes, dont 1-l'hydratation d'un film lipidique mince par une solution aqueuse d'acide nucléique, ou 2-l'ajout de l'acide nucléique à des liposomes cationiques préformés, méthodes respectivement nommées « méthode à partir d'un film » et « méthode par injection ». La formation des lipoplexes fait intervenir une multitude de phénomènes thermodynamiques à plusieurs échelles, dépendant de la structure du lipide et de l'acide nucléique impliqués et de leurs proportions, mais aussi des conditions de préparation : volumes de solution de chacun des réactifs mis en jeu, température, et force ionique du milieu de complexation (Ponti et al., 2021). Néanmoins, les lipoplexes semblent s'organiser principalement sous deux types de structures décrits à la fin des années 90 (Koltover et al., 1998; Rädler et al., 1997), une structure multi-lamellaire ou une phase hexagonale (figure 3).

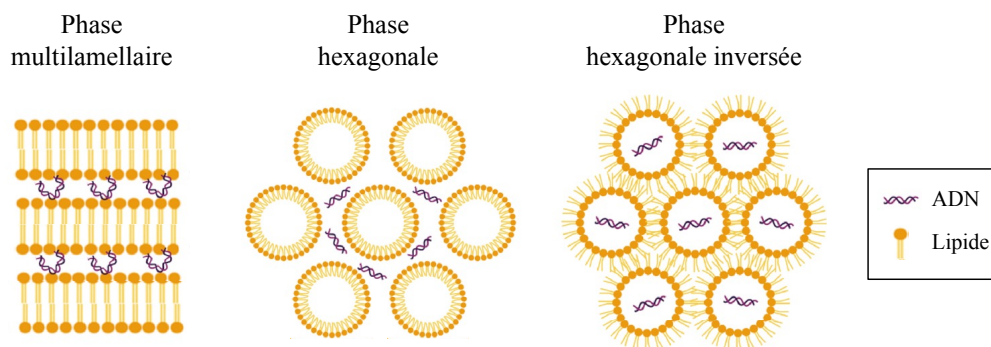


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation supramoléculaire des lipoplexes (Ponti, 2021).

La première utilisation d'un lipide cationique (le DOTMA, ou chlorure de 1,2-di-oléyloxy-3-triméthylammonio propane) en transfection a été publiée en 1987 (Felgner et al., 1987). Depuis, la simplicité et la reproductibilité du protocole décrit par Felgner *et al.* ont conduit au développement de beaucoup d'autres lipides cationiques, testés pour leur efficacité de transfection dans différents types cellulaires et modèles *in vivo*. Parmi les vecteurs lipidiques, on trouve des lipides arborant plusieurs charges positives au niveau de leur tête polaire, *i.e.* polycationiques, comme le GL67 (*Genzyme Lipid 67*, un dérivé du cholestérol) et la DOGS (dioctadécylamidoglycylspermine) (Behr et al., 1989; Lee et al., 1996) (figure 2). Néanmoins, les lipides cationiques ont montré une efficacité modérée, parfois associée à une toxicité conséquente, ce qui est interprété notamment comme le résultat de leur interaction électrostatique avec les protéines des milieux biologiques et/ou des agents du système immunitaire (Filion and Phillips, 1997; Lee et al., 1996; Lv et al., 2006). Pour améliorer leur efficacité et leur stabilité colloïdale et réduire leur toxicité, des formulations incorporant des lipides neutres (on parle de lipides *helper*), souvent fusogènes, ont été proposées et sont désormais fréquemment adoptées (Cheng and Lee, 2016). Parmi les lipides *helper* couramment utilisés, on retrouve la DOPE (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine), les phosphatidylcholines, le cholestérol, et les lipides modifiés par du poly(éthylène glycol) ou lipides PEGylés (figure 2). De plus, l'incorporation d'un lipide couplé à un fluorophore dans la formulation confère des propriétés de fluorescence aux lipoplexes, permettant de faire un suivi par imagerie et de mieux comprendre leur implication dans les processus métaboliques, leur localisation, *etc.* (Berchel et al., 2014; Patil et al., 2019).

- Polymères

La charge négative commune à tous les acides nucléiques a, sans surprise, véhiculé l'idée d'utiliser d'autres molécules chargées positivement comme vecteurs. Parmi ces alternatives, on retrouve des polymères comme la poly-L-lysine (PLL), dont les capacités à vectoriser de l'acide nucléique ont été publiées la même année que les travaux de Felgner *et al.* avec le DOTMA présenté plus haut (Wu and Wu, 1987). La PLL a été ainsi le premier polymère cationique d'une longue série qui comprend d'autres spécimens synthétiques, tels le PEI (polyéthylèneimine), les PAE (polyaminoesters), et les dendrimères

de type PAMAM (polyamidoamine à la structure arborescente), mais aussi des molécules d'origine naturelle comme le chitosane (Patil et al., 2019) (figure 2). Suivant la même logique qu'avec les lipides, les complexes formés entre un acide nucléique et un polymère sont couramment nommés « polyplexes ».

- Peptides

Les peptides sont des chaînes d'acides aminés de moins de 50 acides aminés de long. Grâce à la diversité des propriétés des acides aminés naturels et synthétiques, il est possible de concevoir des peptides avec des propriétés diverses. Parmi eux, les peptides de pénétration cellulaire (CPP) cationiques sont des peptides comprenant de nombreux acides aminés positifs (arginine et lysine). Comme avec les lipides et les polymères, la charge positive des CPP cationiques permet la formation de particules de transfection par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques avec les acides nucléiques (Thapa and Sullivan, 2018). Ainsi, Osman *et al.* ont associé un CPP cationique PEGylé avec de l'ADN pour former des particules de transfection d'environ 100 nm de diamètre, qui ont montré une bonne efficacité de transfection *in vitro* et dans le poumon *in vivo* (Osman et al., 2018). Les CPP cationiques peuvent être associés à des composés lipidiques ou polymériques pour amplifier le nombre de groupements cationiques et ainsi favoriser, notamment, leur rapprochement avec la membrane plasmique et donc leur internalisation (voir partie I.3.2.). Par exemple, Nguyen *et al.* ont montré que le PEI couplé à du PEG et à des CPP montrait une meilleure efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* que le PEI PEGylé seul (Nguyen et al., 2008).

- Nanoparticules

Au cours des deux dernières décennies, l'entrée des nanotechnologies dans le domaine médical a permis le développement d'une variété de nanoparticules capables de vectoriser des principes actifs thérapeutiques (Zhong et al., 2021). Un certain nombre de ces objets ont été proposés pour le transfert de matériel génétique, en raison, notamment, de leur stabilité dans le temps et leurs propriétés optiques (fluorescence intrinsèque par exemple). Des nanoparticules inorganiques cationiques à base d'or (Ding et al., 2014), d'oxyde de fer (Arsianti et al., 2010; Yang et al., 2018) ou de silice (Zhou et al., 2018) ont ainsi été employées pour vectoriser des molécules d'ADN ou d'ARN. Des nanotubes de carbone fonctionnalisés par du PEI ont également été utilisés pour délivrer des miARN et de l'ADN, *in vitro* et *in vivo* (Kong et al., 2016; Masotti et al., 2016). Au laboratoire, nous développons d'autres nanovecteurs carbonés, les *carbon dots*, pour faire de la délivrance d'ADN ou de siARN dans le poumon (Pierrat et al., 2015).

En bref, de nombreuses alternatives aux vecteurs viraux sont étudiées dans l'optique de proposer des moyens de transfection plus sûrs. Une efficacité élevée et durable, une capacité de transport élevée, la possibilité ou non d'intégrer le matériel génétique, un tropisme pour les cellules ciblées, une cytotoxicité et une génotoxicité négligeables, une furtivité suffisante vis-à-vis du système immunitaire et une production à l'échelle industrielle à moindre coût : aucun vecteur, qu'il soit viral ou non, ne

surpasse les autres sur tous ces points (Athanasopoulos et al., 2017). *A priori*, l'avenir de la thérapie génique s'apparente donc plus au développement de toute une bibliothèque de vecteurs dans laquelle le vecteur le plus adapté à un traitement pourra être sélectionné, qu'à l'utilisation d'une poignée de vecteurs rendant caduque le reste des objets conçus dans ce but. Aujourd'hui, la diversité des vecteurs développés et évalués et la multiplication des échanges interdisciplinaires ont permis de décortiquer les mécanismes de la transfection et de dégager un certain nombre de règles qui s'appliquent à chacune de ses étapes. Ces mécanismes seront détaillés dans la partie qui suit.

I.3. Mécanismes de la transfection

I.3.1. De l'administration à la cellule

Actuellement, les trois voies majeures d'administration de médicaments à un être vivant sont la voie orale (ou *per os*), la voie intraveineuse (i.v.), et la voie pulmonaire. La voie orale est particulièrement intéressante, car elle est peu invasive et souvent préférée par les patients. Néanmoins, elle est généralement écartée pour l'administration d'acides nucléiques nus ou sous forme de particules de transfection, car le parcours jusqu'à la circulation sanguine comprend le brassage avec les enzymes digestives dans le milieu acide de l'estomac, le transit intestinal, et la traversée du mucus et de l'épithélium gastro-intestinal. Enfin, une partie du matériel qui aurait réussi à traverser ces obstacles peut être rapidement éliminée par le foie (Belmadi et al., 2015). La voie i.v. a l'avantage de donner accès à tous les organes et permet de transfecter des cellules en circulation dans le sang, comme les métastases en cas de cancer métastatique. Liu *et al.* ont par exemple montré dès 1995 qu'après injection de liposomes ayant intégré un plasmide comprenant un gène rapporteur codant la CAT (chloramphénicol acétyltransférase, enzyme absente des cellules de mammifères) dans la veine de la queue de souris, un signal CAT pouvait être retrouvé dans de nombreux organes, tels le cœur, le foie, l'utérus, les reins et la rate (Liu et al., 1995). Un signal était même retrouvé dans ces organes avec le plasmide seul (en l'absence de vecteur). De manière intéressante, les niveaux de transfection retrouvés dans les poumons après injection i.v. peuvent être plus élevés que dans les autres organes, en particulier avec les objets les plus volumineux, probablement du fait qu'ils sont retenus dans les vaisseaux sanguins pulmonaires, les plus étroits de l'organisme (Belmadi et al., 2015; Simberg et al., 2003). En contrepartie, le passage d'objets volumineux dans ces capillaires sanguins fait apparaître des risques d'embolie pulmonaire (Belmadi et al., 2015). Il faut aussi préciser que les objets circulant dans le sang sont en contact permanent avec un cocktail d'enzymes, en particulier des nucléases, qui peuvent entraîner une dégradation de l'acide nucléique si celui-ci est nu ou mal protégé. Enfin, en fonction de la taille des objets qui parcourent le réseau sanguin, d'autres processus peuvent entraîner leur élimination, en particulier la phagocytose par les macrophages et l'élimination par les reins et le foie.

L'administration par voie pulmonaire est considérée comme une voie propice à la délivrance de médicaments, surtout lorsque des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose ou le cancer du poumon sont ciblées. Elle dispense, en effet, les composés administrés d'emprunter la circulation sanguine pour accéder aux cellules épithéliales pulmonaires et, donc, de se heurter aux barrières mentionnées précédemment ou de naviguer dans tout l'organisme en multipliant les effets indésirables (Belmadi et al., 2015; Mottais et al., 2017). Les particules de transfection peuvent être administrées par inhalation ou instillées directement dans la trachée (administration « intratrachéale »). L'administration intratrachéale présente l'avantage de court-circuiter une partie des voies respiratoires supérieure, notamment le nez et/ou la bouche. Toutefois, bien que souvent utilisée chez l'animal (Dailey et al., 2006; Lee et al., 1996; Mastorakos et al., 2015), elle est particulièrement invasive et donc rarement envisagée chez l'Homme. L'administration d'une solution aqueuse par voie pulmonaire étant dangereuse, la solution aqueuse contenant les particules doit être transformée en microgouttelettes pour être administrée sous formes de spray (aérosol). Néanmoins, des forces de cisaillement élevées sont mises en jeu lors des processus d'aérosolisation. Aussi, même si de nombreux exemples montrent que l'aérosolisation est possible avec la majorité des vecteurs viraux et non viraux (Hong et al., 2015), des études ont montré que des plasmides nus (Arulmuthu et al., 2007) et certains vecteurs viraux (Griesenbach et al., 2011a) ou non viraux (Davies et al., 2014; Densmore et al., 1999) pouvaient ne pas supporter certains protocoles d'aérosolisation. Par ailleurs, comme dans le cas d'une administration i.v., le diamètre aérodynamique des particules administrées dans le tractus respiratoire influence leur destination (figure 4). Les études suggèrent ainsi que les particules de plus de 5 μm sont généralement exhalées, tandis que celles de 2-3 μm et celles de moins de 1 μm devraient respectivement être en mesure d'atteindre les bronches et les alvéoles (Yhee et al., 2016).

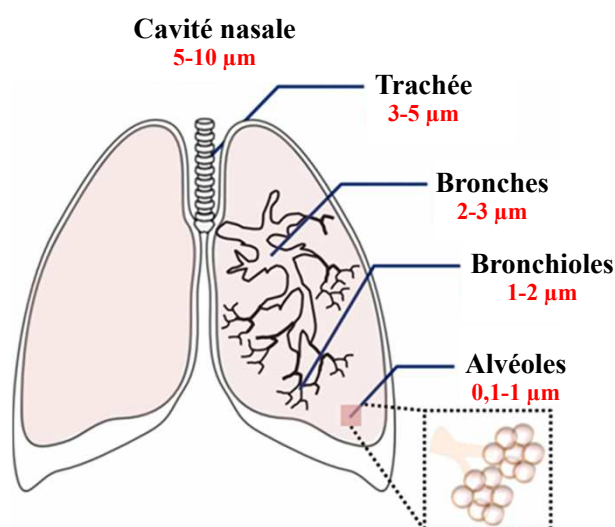


Figure 4. Influence de la taille des particules sur leur dépôt dans les voies respiratoires (Yhee et al., 2016).

Enfin, comme le tractus gastro-intestinal, le tractus respiratoire est protégé sur toute sa longueur par une couche de mucus, un biopolymère de composition complexe et formant un milieu visqueux, dont l'impact négatif sur la délivrance des particules de transfection peut être considérable, si bien que des stratégies sont, depuis les dernières décennies, spécialement élaborées pour vaincre cette barrière. Les caractéristiques du mucus et les stratégies imaginées pour le traverser seront respectivement présentées dans les parties II. et IV.

Quelle que soit la voie d'administration utilisée, les objets administrés se retrouvent dans le voisinage d'une multitude de protéines. Étant donné que la plupart des protéines des milieux biologiques sont chargées négativement, les objets qui contiennent une majorité de groupements accessibles chargés positivement les attirent par l'intermédiaire de forces électrostatiques. Les protéines recrutées forment ainsi une véritable couronne de protéines (ou *protein corona*) autour des objets (Quagliarini et al., 2020; Simberg et al., 2005), modifiant les propriétés (taille, charge de surface) qui les caractérisaient avant leur administration et pouvant ainsi les dévier de leur cible ou faciliter leur élimination par phagocytose. Ce point est particulièrement problématique car, comme décrit précédemment, les charges positives sont aussi à la base de l'interaction des vecteurs avec les acides nucléiques. Pour limiter ces interactions non désirées, il est fréquent que de longues chaînes d'exclusion stérique soient intégrées aux particules pour masquer leur charge de surface. Le PEG est le polymère le plus utilisé dans ce but, et plusieurs études montrent que les particules PEGylées, qu'il s'agisse de lipoplexes (Li and Szoka, 2007), de polymères (Nguyen et al., 2008), de peptides (Osman et al., 2018) ou de nanoparticules (Jokerst et al., 2011), interagissent moins avec les protéines et présentent des temps de circulation augmentés.

1.3.2. De l'entrée dans la cellule à la production de la protéine

Lorsque des vecteurs d'acide nucléique sont évalués *in vitro*, la plupart des problèmes relatifs à toutes les étapes présentées ci-dessus sont inexistantes ou très atténués. Pourtant, même dans ces conditions favorables, les particules de transfection doivent encore traverser d'autres épreuves : les barrières cellulaires (figure 5).

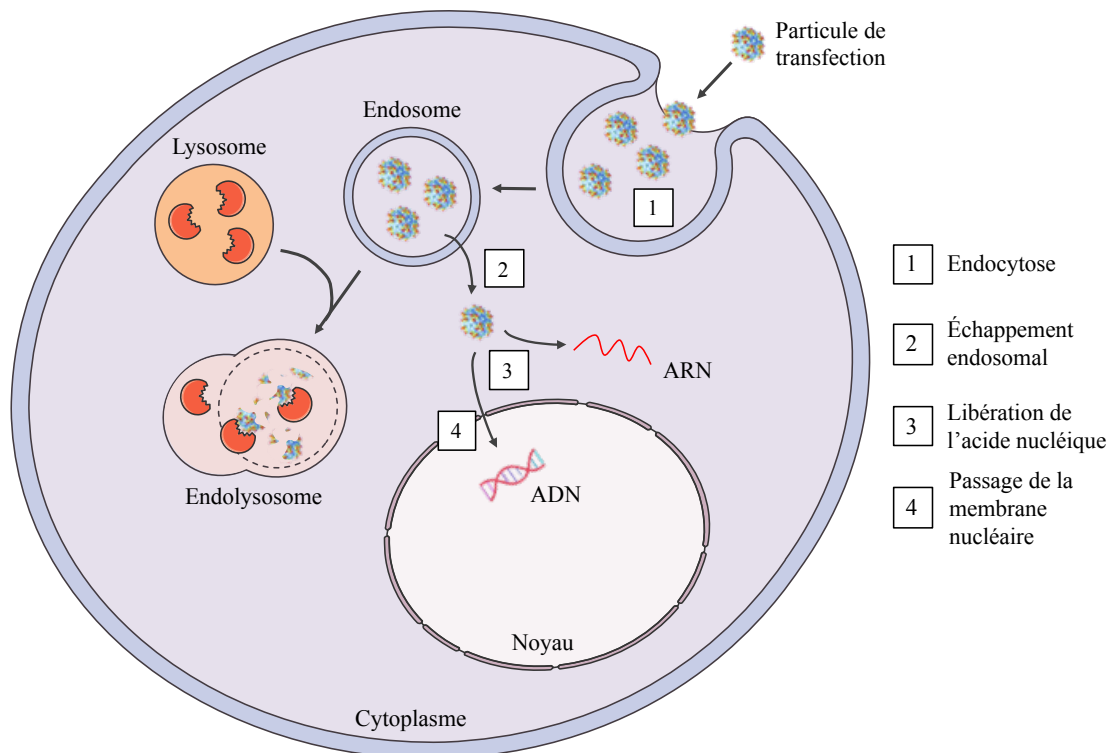


Figure 5. Obstacles à la transfection à l'échelle de la cellule.

- Interaction avec la membrane cellulaire

La membrane cellulaire constitue le premier obstacle à la transfection au niveau cellulaire. Comme cela a été évoqué dans la partie I.2., les acides nucléiques sont difficilement internalisés dans les cellules, même *in vitro*. En cause, leur charge négative, qui occasionne des répulsions électrostatiques avec les protéoglycanes et les autres protéines chargées négativement de la membrane cellulaire (Fröhlich, 2012). La charge positive des particules de transfection, apportée par le vecteur, permet d'inverser ce phénomène (Fröhlich, 2012; Mislick and Baldeschwieler, 1996). Si la charge positive, déjà importante dans la formation de complexes avec l'acide nucléique, l'est à nouveau dans le processus d'internalisation, elle reste susceptible d'engendrer la formation d'une couronne de protéines de charges négatives à la surface de ces complexes, celle-ci pouvant aller jusqu'à inverser la charge de surface de la particule de transfection (figure 6). Par voie de conséquence, le dilemme de la charge des particules évoqué plus haut s'étend à la problématique de l'internalisation cellulaire.

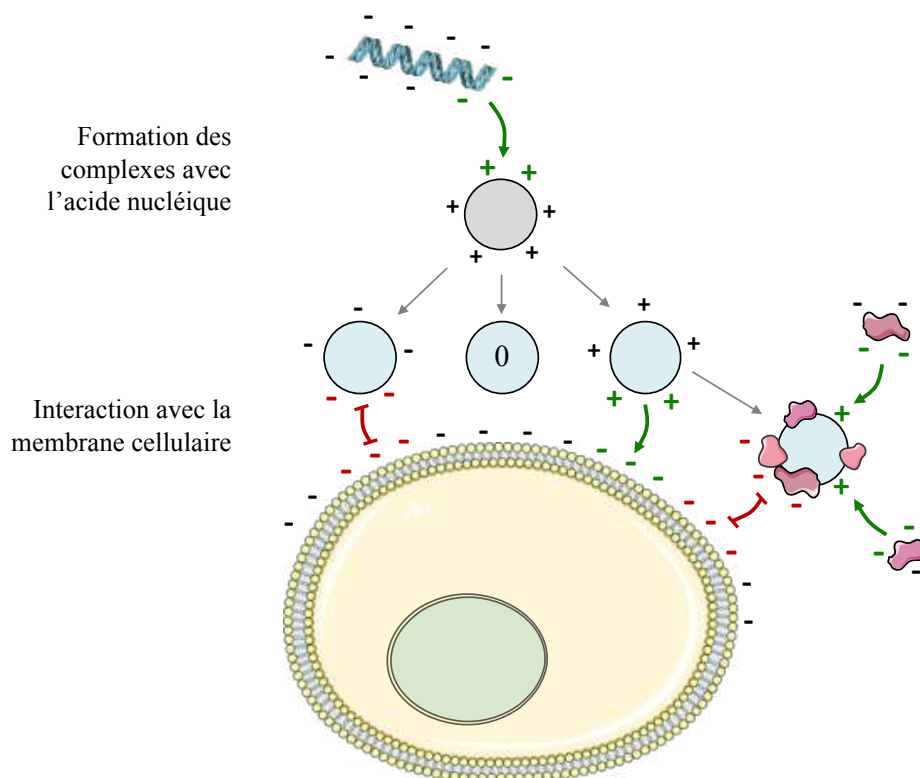


Figure 6. Dilemme de la charge de surface en transfection. Les charges négatives de l'acide nucléique sont attirées par les charges positives du vecteur, représenté en gris. Selon le ratio de charge entre le vecteur et l'acide nucléique, la particule de transfection ainsi formée (représentée en bleu clair) peut présenter une charge de surface globalement négative, neutre ou positive. La charge positive est la plus favorable à l'interaction avec la charge négative de la membrane cellulaire, mais elle peut également conduire au recrutement des protéines de charge négative avoisinantes. Ces protéines peuvent ainsi masquer la surface de la particule de transfection et de ce fait condamner l'interaction avec la membrane plasmique.

Dans ce contexte, le PEG ne permet que de déplacer le problème, puisqu'il masque lui-même la charge positive des particules, limitant alors lui aussi l'interaction avec la membrane cellulaire. En accord avec ce principe, il est généralement observé dans le contexte *in vitro* qu'une fonctionnalisation des particules de transfection par du PEG diminue le taux d'internalisation et l'efficacité de transfection, que les vecteurs soient lipidiques (Miller et al., 1998), polymériques (Nguyen et al., 2008), dendrimériques (Kim et al., 2013) ou peptidiques (Osman et al., 2018). De manière intéressante, certains auteurs ont rapporté qu'une décoration des particules de transfection par du PEG peut au contraire être légèrement bénéfique, comme dans le cas de cellules Calu-3 (Hibbitts et al., 2011; Nguyen et al., 2008) ou CFBE41o- (Kolte et al., 2017), illustrant bien le lien complexe entre la charge d'une particule, son internalisation et la formation d'une *protein corona*. Néanmoins, dans les modèles *in vivo* avec administration par voie pulmonaire, les résultats de transfection penchent majoritairement en faveur de l'utilisation du PEG (Mastorakos et al., 2015; Nguyen et al., 2008; Osman et al., 2018; Suk et al., 2014; Uchida et al., 2012), probablement en raison du nombre plus élevé de protéines rencontrées par les objets *in vivo* en comparaison aux modèles *in vitro*, mais aussi de la présence de mucus (ce point sera détaillé plus en détail dans la partie II.2.).

- Entrée dans la cellule

Les cellules phagocytaires sont en mesure d'internaliser les complexes assez volumineux (en général on décrit $> 0,5 \mu\text{m}$) ou opsonisés (couverts de protéines appelées opsonines) en les phagocytant (Hillaireau and Couvreur, 2009). Dans les autres types cellulaires, l'internalisation des particules de transfection se fait par d'autres processus d'endocytose. Ces derniers sont médiés ou non par différentes protéines, dont les principales sont les clathrines et les cavéolines (El-Sayed and Harashima, 2013; Hillaireau and Couvreur, 2009) (figure 7). Billiet *et al.* ont observé que les lipoplexes et les polyplexes présentant une charge de surface (potentiel zêta) positive avaient la plus haute efficacité de transfection et étaient internalisés par des mécanismes de pinocytose clathrine-dépendante, tandis que l'internalisation des complexes chargés négativement, moins efficaces, était plutôt médiée par les cavéolines (Billiet et al., 2012). Douglas *et al.* ont observé que l'endocytose, dans trois lignées cellulaires différentes, de nanocomplexes formés entre un ADN et un mélange d'alginate et de chitosane était majoritairement médiée par les cavéolines dans les deux lignées les moins transfectées (fibroblastes rénaux de singes, COS7, et cellules d'ovaire de hamster de Chine, CHO), et principalement médiée par les clathrines dans la lignée la plus transfectée (cellules humaines embryonnaires de rein, HEK293T) (Douglas et al., 2008). De leur côté, Capel *et al.* ont observé que l'internalisation de polyplexes était majoritairement clathrine-dépendante dans les cellules Calu-3, mais clathrine-indépendante dans les cellules NCI-H1299 et A549, malgré l'origine épithéliale pulmonaire humaine commune de ces trois lignées (Capel et al., 2016). Les CPP et les vecteurs viraux, quant à eux, pourraient également emprunter plusieurs voies d'endocytose, en particulier celle médiée par les clathrines (Thapa and Sullivan, 2018; Ziello et al., 2010). En résumé, les voies d'endocytose des particules de transfection sont multiples et dépendent, à la fois, des caractéristiques de l'objet internalisé et du type des cellules considérées.

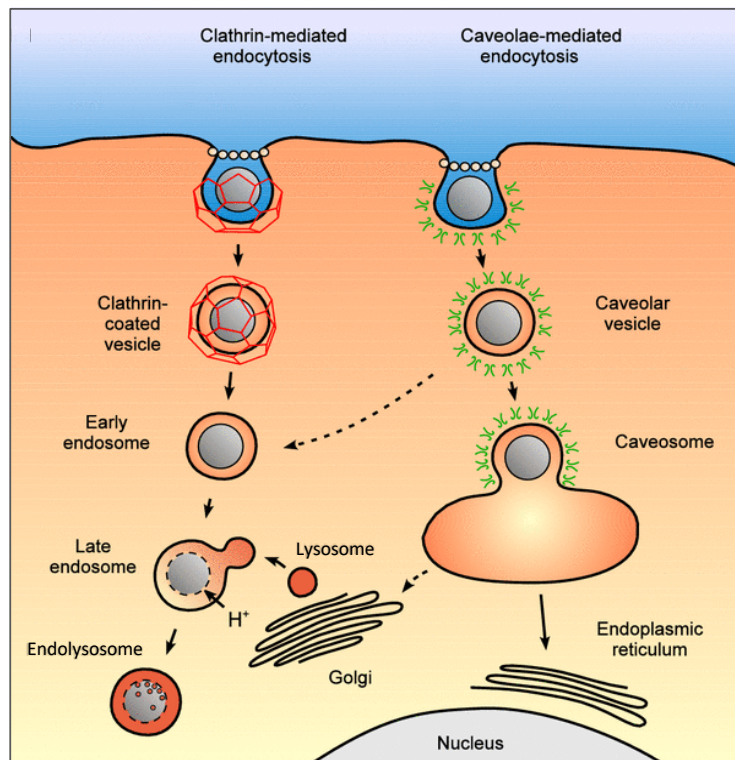


Figure 7. Endocytose médiée par les clathrines ou les cavéolines (adapté de Hillaireau and Couvreur, 2009).

- Devenir intracellulaire

Si les voies d'internalisation empruntées par les complexes ADN-vecteur ont de l'importance, c'est parce qu'elles conditionnent l'itinéraire intracellulaire du matériel internalisé, et en particulier la rencontre éventuelle avec une deuxième barrière cellulaire : l'endosome (figure 5). Un endosome est une vésicule intracellulaire qui résulte de l'internalisation des macromolécules et particules par endocytose clathrine-dépendante. Dans le cytoplasme, l'endosome s'acidifie progressivement, sous l'action de pompes à protons, avant de fusionner avec un lysosome, un autre organe vésiculaire présentant un pH interne très acide et chargé d'enzymes digestives, dont des nucléases et des protéases. Il se forme alors un endolysosome, dans lequel les composés auparavant emprisonnés dans l'endosome seront digérés (figure 5). À noter que les objets entrant dans la cellule par pinocytose cavéoline-dépendante sont également consignés dans une vésicule, le cavéosome, mais celui-ci n'est généralement pas destiné à fusionner avec un lysosome (Hillaireau and Couvreur, 2009) (figure 7). Après leur internalisation par endocytose clathrine-dépendante, les particules de transfection doivent donc être en mesure de quitter l'endosome, en amont de sa fusion avec le lysosome, pour éviter la dégradation de l'acide nucléique vectorisé. Par conséquent, cet échappement endosomal (figure 5) constitue une étape capitale du processus de transfection et la difficulté des complexes d'acides nucléiques à s'échapper de l'endosome est souvent mise en cause dans les faibles niveaux de transfection observés (Belmadi et al., 2015; Billiet et al., 2012; Vermeulen et al., 2018).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'échappement endosomal des particules de transfection formées à partir de vecteurs non viraux (figure 8). Une fois dans les endosomes, les charges positives des complexes pourraient attirer des phospholipides chargés négativement présents dans le feuillet externe de la membrane endosomale. Il en résulterait un phénomène de « flip-flop », conduisant à la fusion des lipides de la membrane endosomale avec ceux du complexe et, par la même occasion, à l'expulsion d'une partie du matériel de l'endosome (Xu and Szoka, 1996). Un autre mécanisme proposé en 1997 fait intervenir le concept d'« éponge à protons » : lors de l'acidification de l'endosome, les groupes protonables des complexes ADN-vecteur se chargeraient de protons H^+ , provoquant un influx d'ions chlorure Cl^- dans l'endosome. L'augmentation de la pression osmotique qui en résulte provoquerait un gonflement de l'endosome, déstabilisant sa membrane et permettant *in fine* un relargage cytoplasmique de matériel (Behr, 1997). Pour augmenter la capacité des particules de transfection à base de vecteurs non viraux de s'échapper de l'endosome, plusieurs stratégies sont aujourd'hui utilisées. Pour prendre un exemple, on peut mentionner l'incorporation de lipides fusogènes dans les lipoplexes. La DOPE, notamment, favoriserait l'organisation du lipoplexe en sa phase hexagonale inversée (figure 3) lors de l'acidification de l'endosome, une conformation dans laquelle il induirait une déstabilisation de l'endosome (Hoekstra et al., 2007; Mochizuki et al., 2013). La DOPE est par conséquent fréquemment incorporée dans des complexes (Griesenbach et al., 2011b; Pierrat et al., 2013a; Zabner et al., 1997), et entre de fait dans la composition d'agents de transfection commerciaux comme la Lipofectamine® (Ponti et al., 2021).

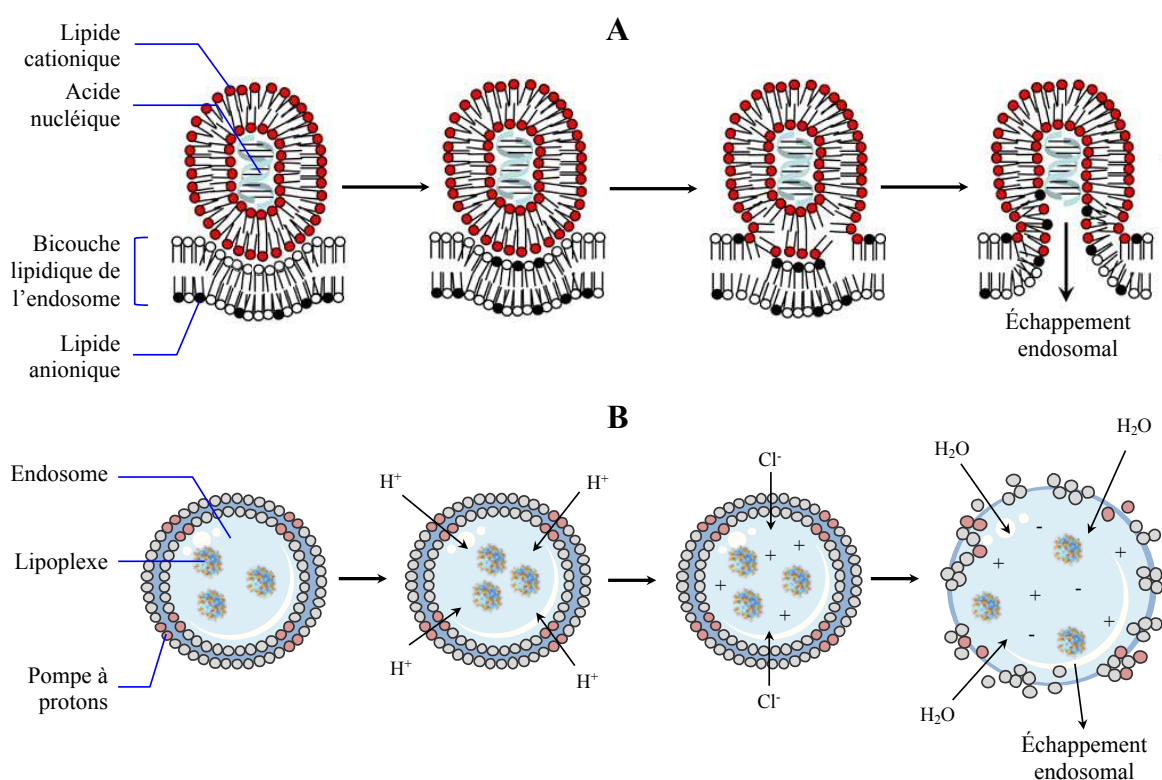


Figure 8. Échappement endosomal par le phénomène (A) de « flip-flop » (adapté de Medina-Kauwe et al., 2005) ou (B) d'éponge à protons.

Une fois dans le cytoplasme, l'acide nucléique est-il libre, associé à des macromolécules, ou reste-t-il partiellement associé à son vecteur ? Certaines études ont montré que la dissociation cytoplasmique de l'acide nucléique et de son vecteur permettait une meilleure activité de transfection (Pichon et al., 2002), suggérant que l'efficacité de transfection pourrait dépendre de l'efficacité de cette dissociation. Les mécanismes de diffusion des acides nucléiques dans le cytoplasme restent encore globalement méconnus, mais ils profiteraient probablement du réseau cytosquelettique (Belmadi et al., 2015). Après l'échappement endosomal, les cibles des ARN (ribosomes pour les ARNm, complexe RISC pour les miARN et siARN) leur sont accessibles. L'activité de ces acides nucléiques perdure alors jusqu'à ce qu'ils soient dégradés. L'ADN, quant à lui, doit passer une dernière barrière, la membrane nucléaire (figure 5), pour accéder au noyau cellulaire. Les mécanismes de ce passage restent eux aussi assez mal compris. L'entrée d'ADN cytoplasmique dans le noyau est en effet un événement qui ne se produit pas en conditions physiologiques. On pense actuellement que l'ADN pourrait profiter de la disparition de la membrane nucléaire lors des phénomènes de mitose (Patil et al., 2019), mais cette théorie n'explique pas la possibilité de transfecter des cellules qui ne sont pas en division. Pour favoriser l'adressage et l'entrée de l'ADN dans le noyau, une stratégie utilisée par Gonçalves *et al.* est d'insérer dans le plasmide des séquences spécifiques reconnues par certains facteurs de transcription ayant des signaux de localisation nucléaire (NLS), comme NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) (Gonçalves et al., 2009). Quoi qu'il en soit, si l'ADN n'est pas intégré dans le génome de la cellule, le transgène sera perdu au fur et à mesure des divisions cellulaires et de sa dégradation.

En résumé, la conception d'une particule de transfection efficace requiert que chaque élément, chaque caractéristique, soit intelligemment choisi pour donner les meilleures chances à la particule de traverser tous les obstacles qui barrent sa route, de son introduction dans l'organisme à l'exécution de l'activité thérapeutique de l'acide nucléique.

I.4. Applications de la thérapie génique dans le poumon

Comme introduit à la fin de la partie I.2.1., certains des premiers essais cliniques de thérapie génique chez l'Homme se sont soldés par des échecs qui ont immédiatement fait retomber la surcharge d'excitation engendrée par le rêve de traiter des pathologies en y administrant simplement les gènes déficitaires. Dans la partie I.3., nous avons vu qu'en plus des risques mis en exergue par ce mauvais départ, chaque étape de la transfection apportait son lot de contraintes. On pourrait donc penser qu'en moins de 25 ans, seuls quelques essais cliniques de thérapie génique aient été effectués et que la conception d'un médicament ne se soit jamais concrétisée. Or, en 2018, Ginn *et al.* recensaient plus de 2600 essais cliniques de thérapie génique (Ginn et al., 2018) et, en 2019, Shahryari *et al.* dénombrèrent 25 médicaments de thérapie génique sur le marché, dont 15 pour une administration *in vivo* et 5 pour une utilisation *ex vivo* (Shahryari et al., 2019). Si ces chiffres mettent en valeur les efforts continus

consentis pour développer la thérapie génique, ils restent encore à prendre avec humilité, puisque plus de 95% des essais cliniques menés avant 2018 n'avaient pas dépassé la phase II (Ginn et al., 2018). De plus, le coût des traitements élaborés est souvent exorbitant (tableau 2). Par exemple, le Glybera[®], un médicament de thérapie génique pour le traitement de la déficience en lipoprotéine lipase, a été autorisé en 2012, puis retiré en 2017, en raison de sa faible utilisation due à son coût atteignant plus de 1,2 millions de dollars par patient (Shahryari et al., 2019).

Nom	Première autorisation	Cible	Vecteur	Acide nucléique	Prix 2018/2019
Gendicine	2003	Cancer tête/cou	Adénovirus	ADN	\$387 par injection
Rexin-G	2010	Cancers	Rétrovirus	ADN	\$500 000 le traitement
Neovasculgen	2012	Maladie artérielle périphérique	-	ADN	\$6 600 le traitement
Glybera	2012	Déficit en lipoprotéine lipase	Virus adéno-associé	ADN	> \$1,2 millions le traitement
Imlygic	2016	Cancers	Virus herpès simplex	ADN	\$65 000 le traitement
Luxturna	2017	Dystrophie héréditaire de la rétine	Virus adéno-associé	ADN	\$425 000 le traitement pour un oeil
Patisiran	2018	Neuropathies amyloïdes	Liposome	siARN	> \$100 000 le traitement
Zolgensma	2019	Amyotrophie spinale	Virus adéno-associé	ADN	\$4,2-6,6 millions par patient

Tableau 2. Produits de thérapie génique utilisant un ADN ou un siARN ayant été autorisés pour un traitement *in vivo* (jusqu'à 2019) (adapté de Shahryari et al., 2019).

Aucun médicament de thérapie génique n'a actuellement obtenu d'autorisation de mise sur le marché pour traiter les pathologies pulmonaires (Shahryari et al., 2019). Pourtant, la mucoviscidose (présentée dans la partie II.3.1.) est l'une des maladies pour lesquelles l'espoir est le plus prononcé. Au début des années 90, peu de temps après son clonage, les premiers essais d'administration du gène codant la CFTR à des patients étaient réalisés avec des adénovirus (Boucher et al., 1994; Zabner et al., 1993), puis avec des virus adéno-associés (Wagner et al., 1999). Néanmoins, à ce jour, aucun essai clinique avec ces virus n'a donné de résultats suffisamment convaincants pour envisager le développement d'un médicament (Girón Moreno et al., 2021; Miah et al., 2019). En effet, cela demanderait d'améliorer l'efficacité de transfection de ces virus, mais aussi et surtout de diminuer leur pouvoir immunogène, qui empêche toute administration répétée. La première utilisation de lentivirus dans des essais cliniques a récemment été encouragée par les résultats d'études pré-cliniques (Alton et al., 2017). L'usage de vecteurs non viraux est aussi envisagé. Parmi ces vecteurs, le GL67A, une formulation à base de lipide polycationique GL67, de DOPE et d'un lipide PEGylé (figure 2) et administrable sous la forme d'un aérosol, est considérée comme le *gold standard* de la transfection d'ADN dans le poumon. En 2015, un essai clinique de phase 2b, randomisé, en double aveugle avec des

contrôles placebo, a été réalisé avec cette formulation, chez des patients atteints de mucoviscidose (Alton et al., 2015). Le GL67A associé à un plasmide contenant le gène codant la CFTR, administré une fois par mois sous la forme d'un aérosol pendant une période d'un an, a permis une stabilisation des fonctions respiratoires des patients, sans aucun effet néfaste, alors que celles-ci s'étaient dégradées chez les patients ayant reçu le placebo. Néanmoins, l'effet restait très modeste et globalement insuffisant. Pourtant, on estime à l'heure actuelle que 7% de cellules transfectées peuvent rétablir 6% de l'activité CFTR, et qu'avec 17 à 28% de cellules transfectées, la moitié de l'activité CFTR pourrait être restaurée (Potash et al., 2013). De même, une étude *in vitro* suggère qu'il suffirait de délivrer le gène codant la CFTR à 25% des cellules épithéliales pour que le transport mucociliaire retrouve son efficacité physiologique (Zhang et al., 2009). Aujourd'hui, il est clair que de meilleurs agents de transfection doivent encore être développés pour espérer pouvoir traiter cette pathologie efficacement.

D'autres pathologies pulmonaires sont également dans le viseur des médicaments de thérapie génique. Dans l'asthme (présenté plus en détail dans la partie II.3.2.), la réduction de la réponse inflammatoire par des phénomènes de *silencing* est l'une des stratégies thérapeutiques envisagées. Cette approche a déjà fait l'objet de quelques essais cliniques (Krug et al., 2015; da Silva et al., 2017). L'inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation du poumon pourrait également être une stratégie thérapeutique pour le traitement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO, présentée dans la partie II.3.3.) même si, à ce jour, aucun essai clinique de thérapie génique n'a été réalisé en ce sens (Fujita et al., 2013).

L'une des causes majeures de l'échec des médicaments développés pour la thérapie génique dans le cas des pathologies pulmonaires est le mucus épais qui recouvre les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients. Ainsi, des études ont montré que les particules de transfection, notamment celles à base d'adénovirus et de GL67A, étaient extrêmement ralenties dans le mucus expectoré par des patients atteints de mucoviscidose (Sanders et al., 2003; Schuster et al., 2014). Avant de nous concentrer sur les stratégies développées pour élaborer des vecteurs capables de passer au travers de cette barrière (partie IV.), il est important de définir la nature et les caractéristiques de cette substance visqueuse qu'est le mucus et de comprendre par quels mécanismes elle bloque l'accès des particules à l'épithélium.

II. Mucus

Le mucus (ou des glyco-substances équivalentes) est présent dans toutes les formes de vie, qu'il s'agisse des poissons, des insectes, des plantes, des bactéries, des champignons, ou encore des virus (Bansil and Turner, 2018). Cette partie se limitera toutefois à celui des mammifères, chez qui il recouvre les surfaces en contact direct ou indirect avec l'extérieur, *i.e.* le tractus respiratoire (nez, trachée, poumons), la cavité buccale et le tractus gastro-intestinal (estomac, intestins), le tractus génital, et les yeux (Bandi et al., 2021). Comme la délivrance d'acide nucléique est surtout envisagée *via* les voies respiratoires et en i.v. (partie I.3.1.) et que le mucus ne constitue pas une barrière dans le cadre d'une administration i.v., l'accent sera particulièrement porté sur le mucus des voies respiratoires. Dans un premier temps, la composition du mucus et les propriétés physicochimiques qui en découlent seront décrites. Les fonctions biologiques du mucus seront ensuite présentées, et la dernière partie du chapitre se concentrera sur les modifications du mucus au cours des pathologies pulmonaires.

II.1. Biologie du mucus

II.1.1. Composition

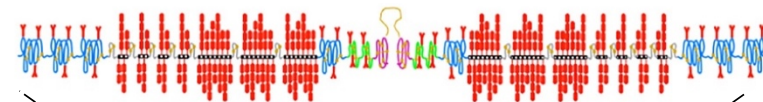
Le mucus est une substance complexe dont les deux constituants principaux sont l'eau (> 90%) et des glycoprotéines de haut poids moléculaire appelées mucines (entre 1 et 5%) (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018). L'hydratation du mucus est principalement régulée par le transport de chlorure (Cl^-) à travers les canaux CFTR et CaCC (*Ca²⁺-activated chloride channels*), et de sodium (Na^+) à travers les canaux ENaC (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017). Codées par les gènes *muc*, les mucines portent un numéro qui correspond généralement à l'ordre de leur découverte. À l'heure actuelle, 21 mucines ont été identifiées chez l'Homme. Elles sont généralement divisées en deux classes : les mucines sécrétées, parmi lesquelles il est possible de différencier celles qui polymérisent (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19) de celles qui en sont incapables (MUC7, MUC8, MUC9), et les mucines ancrées aux membranes cellulaires (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21, MUC22) (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018). Les mucines sécrétées sont celles qui contribuent principalement à la structure du mucus, tandis que les mucines ancrées aux membranes cellulaires sont impliquées dans la liaison aux pathogènes, la transduction des signaux et l'adhésion cellulaire (Bandi et al., 2021). Chaque muqueuse présente un profil de production de mucines différent, adapté à la fonction que doit remplir le mucus. Ainsi, 13 mucines sont retrouvées dans le poumon, les plus abondantes étant MUC5AC et MUC5B (Atanasova and Reznikov, 2019), alors que dans l'intestin, MUC2 et MUC6 sont les deux mucines majoritaires parmi les 15 mucines qui y ont été identifiées (Bandi et al., 2021; Demouveau et al., 2018). Toutes les mucines partagent des caractéristiques structurales spécifiques (figure 9). Leur région centrale est riche

en sérine, thréonine et proline, répétées en tandem (répétitions « STP »). Les régions N- et C-terminales des mucines sont riches en cystéine (jusqu'à 10% des acides aminés retrouvés), permettant la formation de ponts disulfures intra- et inter-mucines, et ainsi la dimérisation, voire la multimérisation, des mucines (Bansil and Turner, 2018). Dans les mucines MUC5AC et MUC5B, des régions riches en cystéine peuvent aussi être retrouvées entre les répétitions STP (Bansil and Turner, 2018). Une caractéristique très importante des mucines est qu'il s'agit de glycoprotéines : des sucres (en particulier acide sialique, fucose, *N*-acétyl glucosamine, *N*-acétyl galactosamine, galactose et mannose) sont attachés aux répétitions sérine/thréonine par des liaisons covalentes et entourent le cœur protéique, protégeant notamment ce dernier des dégradations protéolytiques (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018). Les régions N- et C-terminales des mucines sont en revanche moins glycosylées (Bansil and Turner, 2018) (figure 9). La haute densité de glycosylation des mucines leur confère une configuration en forme d'écouvillon, la masse des sucres représentant jusqu'à 80% de la masse des mucines (Bansil and Turner, 2018; Rose and Voynow, 2006).

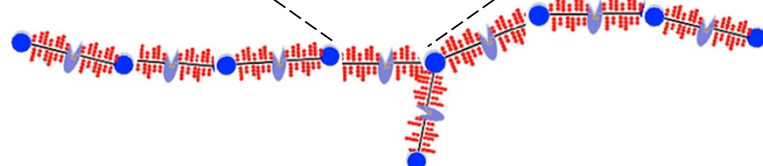
Monomère



Dimère



Multimère



	Répétitions STP
	O-glycosylations
	N-glycosylations
	Domaines vWF
	Régions riches en cystéine

Figure 9. Structure des mucines (adapté de Bansil and Turner, 2018). Les domaines vWF (*von Willerbrand Factor*) sont des régions riches en cystéines qui participent à la multimérisation des mucines.

Certaines cellules des épithéliums, en particulier les cellules caliciformes, sont spécialisées dans la production des mucines. Les mucines sont sécrétées de manière continue, mais des quantités de mucines plus importantes, stockées dans les cellules, peuvent également être libérées de manière calcium-dépendante suite à l'induction de voies de signalisation par divers *stimuli* (infections, molécules du système immunitaire). Le cœur protéique des mucines est synthétisé à partir de l'ARNm

correspondant, par les ribosomes, au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. La formation de ponts disulfures ainsi que plusieurs des modifications post-traductionnelles des mucines (la *N*-glycosylation, la *C*-mannosylation et la dimérisation) ont lieu en parallèle de la traduction. La protéine formée est ensuite transportée jusqu'à l'appareil de Golgi sur les microtubules où elle est largement *O*-glycosylée par des glycosyltransférases. Une fois l'ensemble des oligosaccharides ajoutés, les mucines sont empaquetées dans des vésicules par liaison du calcium Ca^{2+} avec les charges négatives des oligosaccharides. Au terme de la maturation de ces vésicules, nommées alors granules sécrétoires, les mucines sont multimérisées et condensées en fibres de 1 à 10 μm de long, les granules sécrétoires faisant moins de 1 μm de diamètre. Ces granules matures sont stockés au pôle apical des cellules caliciformes, où ils peuvent occuper 75% du volume cellulaire (Evans and Koo, 2009). Lors de l'exocytose, les granules matures fusionnent avec la membrane plasmique, permettant à leur contenu d'être déversé dans l'environnement extracellulaire. Les concentrations en ions H^+ et Ca^{2+} , plus faibles dans ce dernier, font que les charges négatives des mucines réapparaissent et l'eau avoisinante entraîne une hydratation des mucines. Les mucines se déploient alors de manière « explosive », subissant un changement radical de leur volume, et recouvrent la surface apicale de la cellule (Bansil and Turner, 2018).

Le mucus résulte enfin du mélange des mucines hydratées avec d'autres composants provenant de l'épithélium : des lipides (1 à 2%), des électrolytes (1%), des protéines et des enzymes (1%), ainsi que des composants cellulaires (débris), et des cellules et molécules du système immunitaire (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018). Les proportions exactes de chacun de ces constituants, inégales entre les individus et les muqueuses, ne sont pas encore parfaitement connues. Parmi les lipides présents dans le mucus, on retrouve des phospholipides (principalement phosphatidylcholine et phosphatidyl glycérol), du cholestérol et des acides gras libres ou liés sous la forme de protéines acylées (Bansil and Turner, 2018). Les électrolytes communs aux différents mucus de l'organisme sont les chlorures et phosphates de sodium, potassium, magnésium et calcium (Bansil and Turner, 2018). La concentration de ces électrolytes peut en outre être modulée en fonction des conditions locales. Par exemple, une grande quantité de HCl est présente dans l'estomac lors de la digestion active, ce qui y réduit la concentration en KCl. Les protéines (hors mucines) retrouvées dans le mucus peuvent être d'autres glycoprotéines, des protéines de défense (immunoglobulines et défensines par exemple), des facteurs de croissance (notamment TGF- β , *Transforming Growth Factor β* , et EGF, *Epidermal Growth Factor*), ou encore des protéines structurelles (notamment des inhibiteurs de protéases qui préviennent la protéolyse des mucines) (Bansil and Turner, 2018). De récentes études de protéomique ont ainsi dénombré 186 protéines différentes dans le mucus des voies respiratoires, 111 dans le mucus nasal, 145 dans le mucus du tractus gastro-intestinal, et 147 ou 685 dans le mucus cervicovaginal (Bansil and Turner, 2018). Le paragraphe suivant présente les caractéristiques physicochimiques du mucus, indispensables à ses fonctions biologiques (ces dernières seront décrites en partie II.2).

II.1.2. Caractéristiques physicochimiques

- Épaisseur

Le mucus forme une couche d'épaisseur extrêmement variable d'un organe à l'autre, et même au niveau d'un même organe. En conditions physiologiques, les épaisseurs décrites sont ainsi de 2 à 70 μm dans les voies respiratoires (2 à 10 μm dans la trachée, et jusqu'à 70 μm dans les tubes bronchiques), jusqu'à 200 μm dans le tractus gastro-intestinal (la couche de mucus s'épaississant du haut vers le bas du tractus), et jusqu'à 40 μm sur la surface oculaire (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018; Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017). Dans le tractus reproducteur féminin, l'épaisseur du mucus varie selon le cycle ovarien, notamment pour réguler la pénétration des spermatozoïdes et l'implantation de l'ovule fécondé (Bansil and Turner, 2018). Par ailleurs, les mucus du tractus gastro-intestinal, des poumons et des yeux comprennent une deuxième couche, moins visqueuse. Dans le tractus gastro-intestinal, celle-ci a une épaisseur d'environ 100 à 700 μm et repose sur la première couche, plus adhérente (Bansil and Turner, 2018). Dans les poumons, le mucus pulmonaire repose sur un liquide appelé couche (ou liquide) périciliaire (PCL) (figure 10). Cette dernière contient également des mucines, dont la plupart sont des mucines ancrées aux membranes cellulaires (MUC1, MUC4, MUC13, MUC16), et son épaisseur est estimée à environ 7 μm (Atanasova and Reznikov, 2019; Bansil and Turner, 2018; Button et al., 2012).

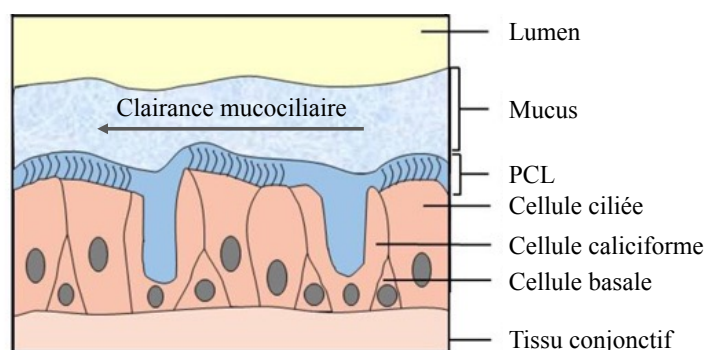


Figure 10. Schéma de l'organisation du mucus dans le tractus respiratoire (adapté de Mottais et al., 2017).

- Propriétés rhéologiques

Les fonctions du mucus sont très fortement dépendantes de ses propriétés rhéologiques. Les mucines seraient les principales responsables de ces propriétés, certaines d'entre-elles, notamment MUC5AC, pouvant avoir un comportement rhéologique proche de celui du mucus (Celli et al., 2007). Les propriétés rhéologiques du mucus sont fortement dépendantes de son hydratation. Elles seraient aussi affectées par certains composants mineurs, comme les lipides et certains électrolytes, selon leurs proportions (Bansil and Turner, 2018), et par la température et le pH (Celli et al., 2007; Parlato et al., 2019; Shaw et al., 2005; Wang et al., 2013). En conditions physiologiques, les propriétés rhéologiques des mucus des

différents organes seraient assez comparables (Lai et al., 2007). Les propriétés rhéologiques d'une substance au niveau macroscopique, ou « macrorhéologie », sont principalement décrites à l'aide de trois valeurs qui peuvent être mesurées à l'aide d'appareils tels que les rhéomètres : le module de stockage (ou module élastique) G' , qui quantifie la capacité de la substance à retrouver sa forme d'origine après une déformation, le module de perte G'' (ou module visqueux), qui décrit sa résistance à l'écoulement, et l'angle de phase δ , qui correspond à la tangente inverse de G''/G' et décrit ainsi le comportement viscoélastique général ($0^\circ < \delta < 45^\circ$ pour un solide viscoélastique et $45^\circ < \delta < 90^\circ$ pour un liquide viscoélastique). Le mucus est souvent décrit comme un gel viscoélastique, le mucus pulmonaire présentant par exemple un δ autour de 20° (Schuster et al., 2013) (figure 11), doté d'un comportement rhéofluidifiant, *i.e.* d'une viscosité qui diminue lorsque les contraintes de cisaillement appliquées augmentent (Atanasova and Reznikov, 2019; Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018; Lai et al., 2009a).

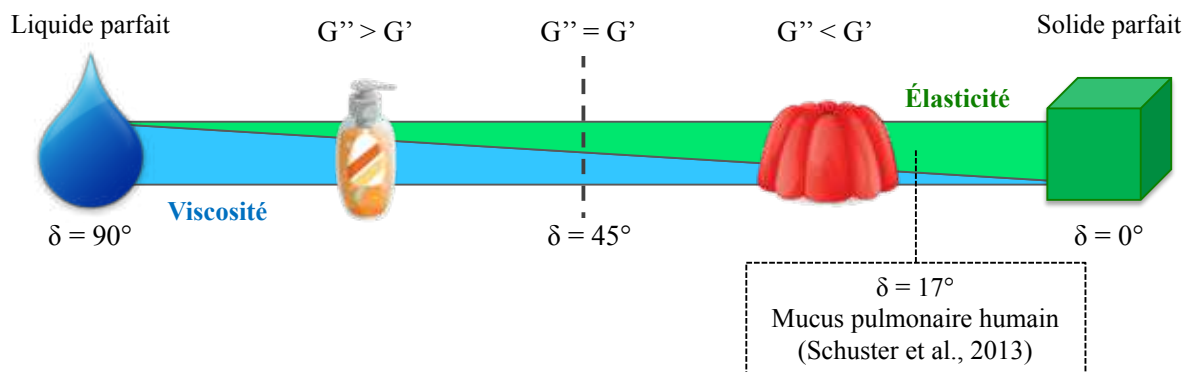


Figure 11. Comportement rhéologique du mucus pulmonaire.

Si les techniques de suivi (*tracking*) de particule unique sont généralement utilisées pour étudier la pénétration des particules dans le mucus (comme nous le verrons dans la partie III.3.3.), elles permettent également d'étudier les propriétés rhéologiques du mucus au niveau microscopique : on parle alors de « microrhéologie », en opposition à la « macrorhéologie », décrite ci-dessus. La microrhéologie évalue la viscoélasticité à l'échelle microscopique, voire nanométrique, du milieu dans lequel évoluent les particules, alors que la macrorhéologie donne une valeur moyenne de la viscoélasticité de ce milieu. De ce fait, elle permet d'appréhender l'hétérogénéité de viscoélasticité et la complexité de la structure d'un échantillon de mucus (Lai et al., 2009a). À l'aide de particules de polystyrène, Lai *et al.* ont ainsi montré dans le mucus cervicovaginal que, comme en macrorhéologie, le module élastique prévalait sur le module visqueux ($G' > G''$), mais que des particules de tailles différentes (de 100 à 1000 nm) n'expérimentaient pas la même viscoélasticité (Lai et al., 2009b).

- Architecture tridimensionnelle

La polymérisation des mucines confère au mucus non seulement sa viscoélasticité, mais aussi une architecture tridimensionnelle en mailles, qui est aussi indispensable à sa fonction. Expérimentalement, la description fine de ce maillage, et en particulier de la taille des pores qu'il présente, peut être réalisée à l'aide de différents modèles de mucus humain ou animal et techniques de caractérisation qui seront discutés dans la partie III. Le tableau 3 présente les tailles de pores décrites dans la littérature pour le mucus pulmonaire humain, récupéré sur des tubes endotrachéaux d'individus non-fumeurs et sans pathologie pulmonaire, et caractérisé par différentes techniques. Les tailles de pores rapportées sont très disparates et varient selon les études, s'échelonnant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres. En complément de ces données, des études ont été effectuées sur le mucus pulmonaire de cheval par microscopie électronique à balayage (MEB), montrant également une importante hétérogénéité de la taille des pores, présentant des diamètres allant jusqu'à plusieurs micromètres (Kirch et al., 2012), et sur le mucus trachéal porcin par MPT (*Multiple Particle Tracking*) et FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), suggérant des tailles de pores globalement comprises entre 100 et 1000 nm (Murgia et al., 2016). À titre indicatif, certaines études ont estimé la taille des pores dans la couche périciliaire à une valeur comprise entre 20 et 40 nm par microscopie électronique à transmission (MET) sur des cellules épithéliales humaines bronchiques (HBE) (Button et al., 2012).

Technique	Taille des pores	Référence
MEB	Quelques dizaines à quelques centaines de nm (la plupart < 100 nm)	Schuster, 2013
MPT	130 nm à 1500 nm, médiane vers 550 nm	Duncan, 2016
MEB	Quelques dizaines de nm à 10 µm	Vukosavljevic, 2017
CLSM	Très grande majorité < 6 µm, moyenne 2,9 µm	Meziu, 2021

Tableau 3. Taille des pores du mucus pulmonaire d'individus sains non-fumeurs, récupéré sur des tubes endotrachéaux.

Dans le mucus cervicovaginal humain, la taille des pores peut être évaluée pendant différentes phases du cycle menstruel. Il a été ainsi montré, par MPT, que les pores de ce mucus auraient un diamètre

hétérogène, allant de quelques dizaines de nm à 200 nm (Lai et al., 2007), 1000 nm (Lai et al., 2009b), voire 1800 nm (Lai et al., 2010), avec une moyenne entre 300 et 400 nm (Lai et al., 2010; Wang et al., 2013) en dehors de la phase ovulatoire. Pendant la phase ovulatoire, les tailles des pores, évaluées à l'aide de méthodes de *tracking*, seraient de manière générale moins élevées (jusqu'à 380 nm) (Olmsted et al., 2001; Saltzman et al., 1994). Toutefois, une autre étude utilisant la microscopie à force atomique (AFM) a montré que la taille des pores est plus importante en phase ovulatoire, ce qui est en accord avec le fait que l'inhibition du mouvement des spermatozoïdes devrait être minimale pendant cette phase (Brunelli et al., 2007).

Les données dans la littérature sont moins abondantes concernant la taille des pores dans le mucus du tractus gastro-intestinal et les études publiées concernent généralement des modèles animaux. La taille des pores dans le mucus de l'intestin grêle de souris a été estimée par MEB entre 100 et 400 nm principalement, avec une moyenne à 211 nm (Bajka et al., 2015). Dans le mucus intestinal porcin, Abdulkarim *et al.* ont estimé par AFM que les pores avaient une largeur de 60 à 400 nm, la moitié restant en dessous de 200 nm (Abdulkarim et al., 2015). Ensign *et al.* ont, quant à eux, observé une diffusion fortement restreinte de billes de polystyrène de 200 nm dans le mucus de côlon de souris *ex vivo*, suggérant que les pores devaient avoir un diamètre inférieur à 200 nm (Ensign et al., 2013). Enfin, dans du mucus gastrique humain, la plupart des pores auraient un diamètre entre 200 et 400 nm, comme l'ont observé Hong *et al.* par AFM (Hong et al., 2005).

Dans le mucus oculaire bovin, une étude par MPT suggère des diamètres de pores se situant principalement entre 300 et 800 nm, avec une moyenne de 550 nm (Xu et al., 2015).

En résumé, en prenant les valeurs extrêmes trouvées dans la littérature (en tenant compte des modèles animaux), la taille des pores du mucus serait de quelques dizaines de nm à 10 µm dans le mucus respiratoire, 1800 nm dans le mucus cervicovaginal, et 400 nm dans le tractus gastro-intestinal. Si même au sein d'un même organe les tailles des pores décrites sont souvent très variables d'une étude à l'autre, toutes les études mettent en évidence une importante hétérogénéité de taille. L'importante disparité constatée entre les études proviendrait en grande partie des différentes techniques utilisées, plusieurs d'entre elles étant assignées de biais inévitables. Ainsi, il est régulièrement, et depuis longtemps, concédé que la préparation de l'échantillon (déshydratation, fixation...) pour son observation par microscopie électronique ou AFM altère la structure du mucus (Cone, 2009; Murgia et al., 2018; Schuster et al., 2013). Pour quantifier ce phénomène, Meziu *et al.* ont notamment étudié l'effet de la déshydratation sur le mucus pulmonaire humain (Meziu et al., 2021). Cette étude a montré qu'en absence de cette étape de traitement, le mucus présentait plutôt des pores relativement larges (de l'ordre du micromètre), et que la plupart des pores observés en microscopie électronique ne seraient que des artefacts dus au traitement des échantillons qui subissent un *collapse* plus ou moins important. Ainsi, le mucus aurait une structure plus compacte que poreuse (figure 12), avec une porosité (densité des pores) de l'ordre de 4%, soit plus de 8 fois plus faible que ce qui est observé par MEB. Pour la mise en évidence

des pores de petite taille, on peut noter qu'une limite est fixée par la résolution des appareils de microscopie (au mieux 200 nm en microscopie optique) et par la taille des particules utilisées en MPT (généralement ≥ 100 nm). Enfin, il est important de garder à l'esprit que le mucus possède une structure dynamique et qu'en conditions physiologiques, la taille de ces pores doit constamment fluctuer alors qu'il s'étire ou se relâche (Murgia et al., 2018).

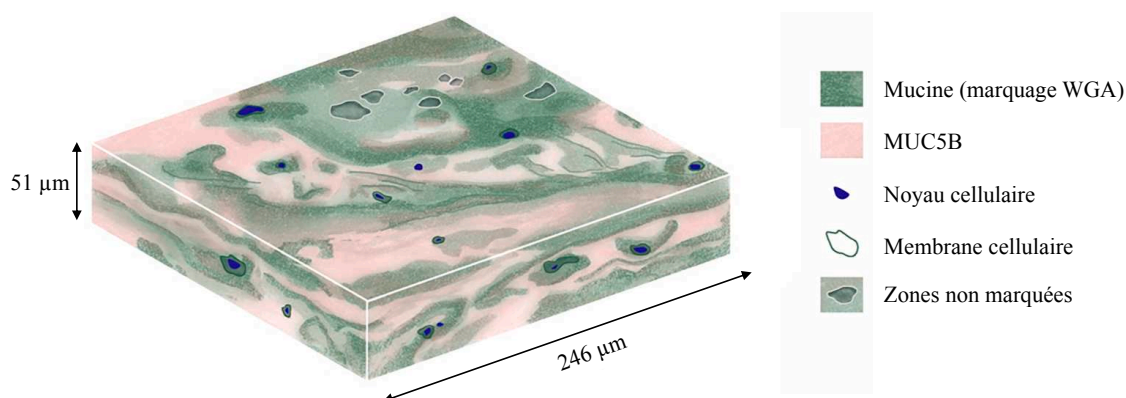


Figure 12. Architecture du mucus respiratoire proposée par Meziu *et al.* (Meziu et al., 2021).

- Autres caractéristiques

Le pH du mucus varie selon l'organe considéré. Il est neutre dans le nez et le poumon, et légèrement basique (pH = 7,8) dans la région oculaire (Bandi et al., 2021; Lieleg et al., 2010). Dans le tractus gastro-intestinal, le pH du mucus est fortement influencé par les sécrétions digestives : dans l'estomac, il est d'environ 1-2 dans la région luminale et proche de la neutralité à la surface des cellules épithéliales, alors qu'il est légèrement acide, voire basique, dans le reste du tractus, *i.e.* environ 6 dans le duodénum et 7-8 dans le côlon (Bandi et al., 2021). Enfin, le pH du mucus cervicovaginal se situerait autour de 4 (Bandi et al., 2021).

Pour finir, le mucus présente un certain nombre de caractéristiques chimiques très spécifiques. Les acides sialiques et sulfoniques attachés aux mucines lui confèrent une charge globale négative. De plus, du fait de la présence des mucines et des lipides, le mucus présente de nombreuses régions hydrophobes (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018).

En conclusion, le mucus est une substance qui résulte d'un mélange de plusieurs constituants, dont les mucines. La teneur en ces composants lui permet de présenter des propriétés physicochimiques caractéristiques, adaptées à l'organe dans lequel il est présent. Ces particularités structurelles ne sont pas anodines. Elles sont en effet indispensables aux fonctions biologiques du mucus, dont celle de barrière.

II.2. Fonction de barrière

En tant que surfaces d'échanges privilégiées avec l'extérieur, les muqueuses font également office de portes d'entrée dans l'organisme pour les agents physiques et biologiques exogènes. Cette faille est toutefois largement comblée par la couche de mucus, qui, dans toutes les muqueuses, assure sa fonction principale de protection de l'épithélium. En effet, quelle que soit la muqueuse, l'épaisseur et les propriétés du mucus restreignent le mouvement de toute particule qui s'y dépose.

D'un point de vue thérapeutique, il est indispensable de comprendre ce qui rend le mucus parfois totalement impénétrable pour envisager de développer des particules capables d'atteindre les cellules épithéliales sous-jacentes. Les recherches des 20 dernières années ont ainsi réussi à dégager un certain nombre de principes qui gouvernent la diffusion d'une particule dans le mucus. Au final, trois particularités du mucus, détaillées ci-dessous, posent problème à la délivrance de médicaments : son adhésivité, sa structure tridimensionnelle, et sa dynamique (Bandi et al., 2021) (figure 13).

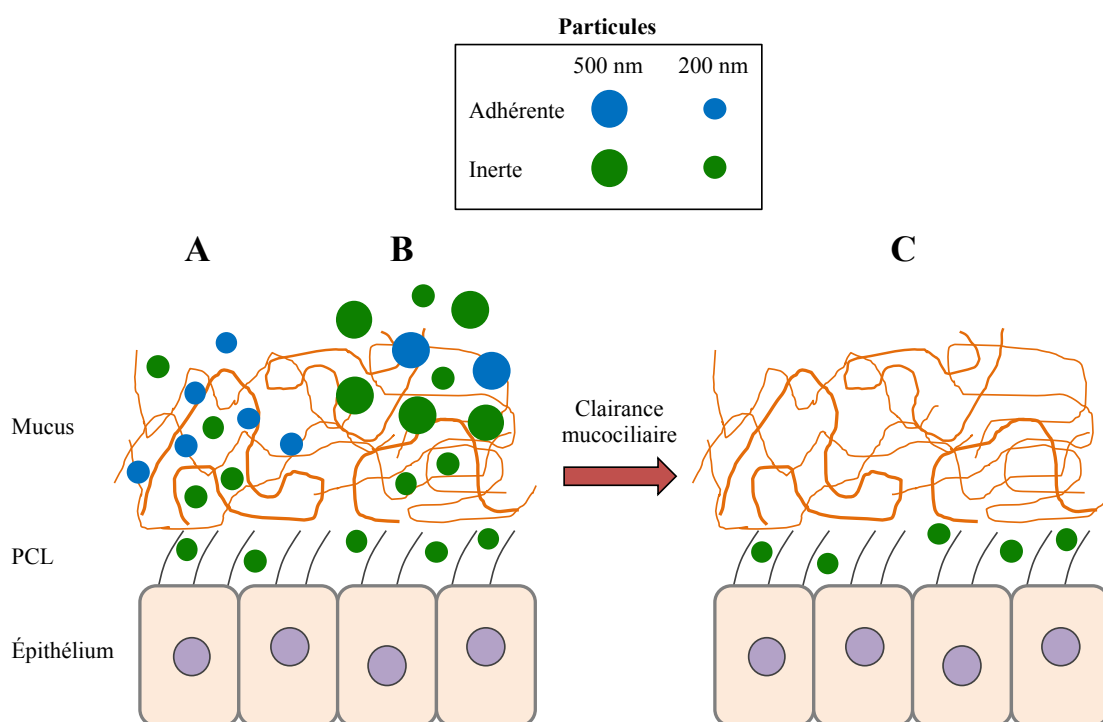


Figure 13. Les trois particularités du mucus en tant que barrière. **(A)** Adhésivité : La progression de certaines particules dans le mucus est plus lente en raison de phénomène d'adhérence, *i.e.* d'interaction avec les différents composés du mucus. **(B)** Structure tridimensionnelle : même des particules interagissant peu avec le mucus (ou « muco-inertes ») peuvent être ralenties si elles sont trop volumineuses, en raison des contraintes stériques qu'impose le réseau formé par l'enchevêtrement des fibres de mucines avec les autres éléments du mucus. **(C)** Dynamique : comme le mucus est en permanence renouvelé par la clairance mucociliaire, les particules qui ne traversent pas la couche de mucus assez rapidement sont éliminées avant d'atteindre l'épithélium.

II.2.1. Barrière adhésive

Les différents composés du mucus constituent tous de potentiels points d'attache pour les particules qui pénètrent dans le mucus (figure 13A). Comme décrit dans la partie II.1., les mucines sont ornées de sucres de charges négatives (en particulier les acides sialique et sulfonique) qui sont des supports de potentielles interactions électrostatiques avec les charges de surface (représentées par le potentiel zêta) positives des particules circulant à proximité. La majorité des études montre donc, sans surprise, que lorsque des particules de composition similaire sont comparées, celles ayant un potentiel zêta positif sont celles qui interagissent le plus fortement avec le mucus et ont le plus de difficultés à diffuser à travers celui-ci (tableau 4). Ce phénomène est, par exemple, bien illustré par Chen *et al.* dans un cas simple, celui de particules de polystyrène aminées qui forment des agrégats dans la mucine gastrique de porc (PGM) à pH physiologique (Chen et al., 2010). Les différences entre les particules ayant une charge de surface proche de la neutralité et celles ayant une charge de surface nettement négative sont moins évidentes, probablement du fait que la charge négative autorise à la fois des répulsions avec les charges négatives des mucines et des interactions avec les charges positives d'autres éléments du mucus.

Particule	Modèle de mucus	Technique	Conclusion	Référence
Silice	Intestinal porcin	Transwell®		Gao, 2021
SEDDS	Intestinal porcin	Transwell®		Griesser, 2018
Silice	Intestinal porcin	Microslide	Les particules positives sont plus adhérentes que les particules neutres et/ou négatives	Bhattacharjee, 2017
Chitosane et PAA	Intestinal porcin	MPT		Abdulkarim, 2015
Polystyrène	PGM	DLS		Chen, 2010
Polystyrène	Intestinal porcin	MPT		Crater, 2010
Chitosane et PAA	Intestinal porcin	MPT	Les particules négatives sont plus adhérentes que les particules neutres	Abdulkarim, 2015
Polystyrène	Expectoration mucoviscidose	MPT		Dawson, 2003
SEDDS	Intestinal porcin	Transwell®	Les particules neutres sont plus adhérentes que les particules négatives	Griesser, 2018
Polystyrène	PGM	DLS	Pas d'adhérence des particules neutres ou négatives	Chen, 2010

Tableau 4. Impact de la charge des particules sur leur interaction avec le mucus.

De la même manière, dans le mucus, les régions hydrophobes des mucines et des lipides sont naturellement des points d'ancrage pour les particules hydrophobes (Chayed and Winnik, 2007). Des interactions entre le mucus et des particules de PLGA (copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique) ou de polystyrène, particulièrement hydrophobes, sont ainsi souvent observées, et ce parfois malgré un *coating* des particules par des groupements de charge négative (par exemple avec de l'alcool polyvinylique (PVA) sur des particules de PLGA (Mura et al., 2011) ou de l'acide carboxylique sur des particules de polystyrène (Dawson et al., 2003)). On peut aussi citer l'étude de Dawson *et al.*, qui a montré que, dans un modèle de mucus reconstitué à base de PGM, les particules de PLGA positives diffusaient plus rapidement que des particules de polystyrène négatives et légèrement plus petites (Dawson et al., 2004), résultat indiquant que le potentiel zêta n'est pas le seul déterminant de la mucoadhésivité d'une particule. Selon les auteurs de l'étude, l'hydrophobie bien plus importante des particules de polystyrène comparée à celle des particules de PLGA serait à l'origine de ce résultat. Enfin, il faut préciser que des interactions plus faibles, comme les liaisons hydrogènes ou de Van der Waals, sont aussi à l'œuvre entre les particules et les composants du mucus.

II.2.2. Barrière physique

Même pour une particule interagissant peu avec le mucus (ou « muco-inerte »), le réseau formé par l'enchevêtrement des fibres de mucines avec les autres éléments du mucus peut constituer un obstacle majeur (figure 13B). Ce phénomène est bien résumé par Schneider *et al.*, qui indiquent que les particules de polystyrène de 1000 nm, même PEGylées (pour limiter leur interaction avec le mucus, voir partie IV.1.), sont incapables de diffuser dans le mucus expectoré par des patients atteints de mucoviscidose, contrairement à celles de 60, 100 ou 300 nm (Schneider et al., 2017). Les études sur la diffusion de particules dans le mucus respiratoire sont en grande majorité effectuées sur du mucus pathologique, que l'on sait plus restrictif qu'en absence de pathologie (comme montré par Duncan et al., 2016 et discuté en partie II.4.). Néanmoins, quel que soit le type de particules, la plupart des études arrive au même constat : plus une particule est petite, plus elle diffuse facilement dans le mucus. Cela a largement été montré sur les particules de polystyrène, PEGylées ou non, de taille de 100, 200 ou 500 nm généralement, dans le mucus d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Dawson et al., 2003; Sanders et al., 2003; Suk et al., 2011a) ou de BPCO (Chisholm et al., 2019), et dans le mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux (Schuster et al., 2013), très souvent par l'équipe de Hanes. Une étude par Nafee *et al.* confirme cette observation sur les expectorations de patients atteints de mucoviscidose avec des particules lipidiques (Nafee et al., 2018). De leur côté, Murgia *et al.* ont évalué la diffusion de particules de polystyrène carboxylées dans du mucus trachéal de porc, par MPT et FRAP (Murgia et al., 2016). De manière intéressante, même si les coefficients de diffusion calculés avec ces deux techniques indiquaient que les particules de 100 nm diffusaient en moyenne environ 3,7 fois plus rapidement que celles de 200 nm, la modélisation du résultat de FRAP indiquait au contraire que la

proportion de particules considérées comme mobiles était plus importante pour les particules de 200 nm comparées à celles de 100 nm (54 et 24%, respectivement). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse intéressante que les particules de 100 nm pouvaient être piégées dans une série de pores inaccessibles à celles de 200 nm et ainsi reproduire le phénomène utilisé en chromatographie d'exclusion (figure 14), selon lequel les particules les plus grandes traversent le système plus rapidement, une idée déjà proposée sur le mucus cervicovaginal auparavant (Lai et al., 2007).

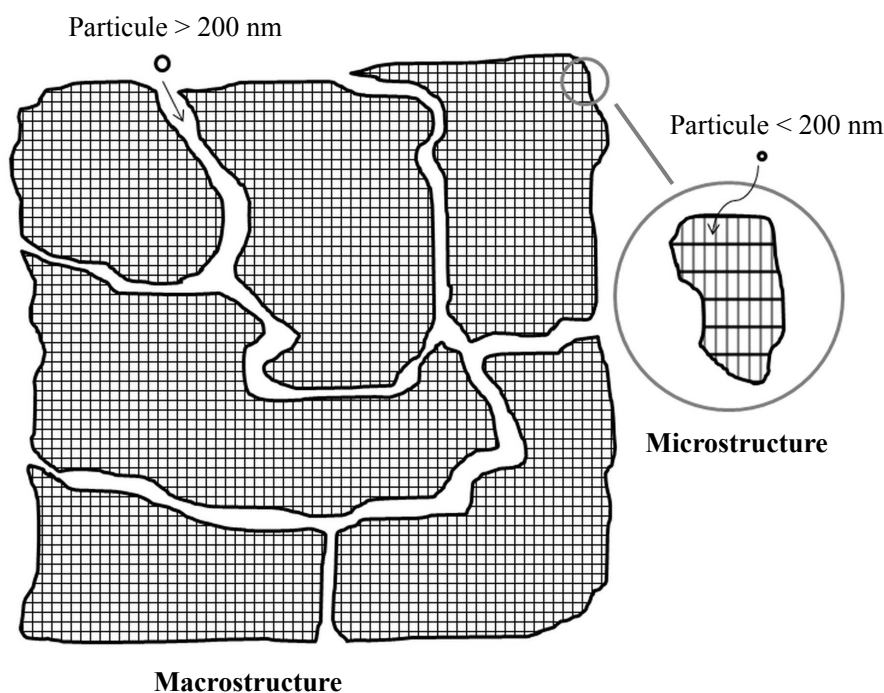


Figure 14. Structure du mucus proposée dans certaines études (Menzel and Bernkop-Schnürch, 2018). La diffusion d'une particule dans le mucus pourrait suivre le phénomène utilisé en chromatographie d'exclusion.

De manière intéressante, Hanes *et al.* ont aussi obtenu des résultats qui montraient une meilleure diffusion des particules de 200 nm comparées à celles de 100 nm dans du mucus nasal (Lai et al., 2011) ou dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Suk et al., 2009). Toutefois, ils attribuaient ce résultat à un *coating* de PEG insuffisant sur les particules de 100 nm. Quoi qu'il en soit, les études dans le mucus respiratoire montrent en général qu'une grande partie des particules de plus de 500 nm est exclue par la structure tridimensionnelle du mucus. À noter que dans le mucus intestinal porcin, la plupart des études montrent également qu'une petite taille est plus favorable à la diffusion des particules (Bhattacharjee et al., 2017; Griesser et al., 2018), même si Abdulkarim *et al.* n'ont pas pu faire ressortir de lien entre la taille de particules de 104 à 373 nm et leur diffusion dans ce modèle de mucus (Abdulkarim et al., 2015).

II.2.3. Barrière dynamique

Le rôle du mucus ne s'arrête pas au piégeage des particules ; il est également responsable de leur élimination. Pour cela, le mucus est continuellement renouvelé. Dans le poumon, ce renouvellement se produit grâce à la clairance (ou transport) mucociliaire, qui fait remonter en permanence le mucus vers le pharynx, où il est avalé ou expectoré (figure 10). La vitesse de cette clairance a été estimée à 5 mm/min environ dans le poumon de sujets humains non pathologiques et non-fumeurs (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Di Gioia et al., 2015; Hofmann and Asgharian, 2003; Lai et al., 2009c), permettant le renouvellement complet de la couche de mucus en approximativement 20 minutes (Lai et al., 2009c). La clairance du mucus est assurée par le battement orienté et synchronisé des cils des cellules épithéliales ciliées, qui baignent dans la PCL (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Button et al., 2012). La viscosité réduite de cette dernière faciliterait d'ailleurs le mouvement des cils, d'environ 7 μm de long en moyenne, à une fréquence estimée entre 10 et 20 Hz (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Button et al., 2012). Le mucus serait entièrement renouvelé en quelques heures dans le vagin (Lai et al., 2009c), en moins de 6 heures dans le tractus gastro-intestinal (Lai et al., 2009c; Wu et al., 2018b) et en moins de 10 minutes dans les yeux (Bandi et al., 2021; Lai et al., 2009c).

Ainsi, même une particule présentant des caractéristiques favorables à sa diffusion dans le mucus (taille optimale et/ou charge neutre ou négative) pourrait ne jamais accéder à l'épithélium respiratoire en raison des propriétés dynamiques de la couche de mucus (figure 13C). En effet, l'accès à l'épithélium respiratoire ne se résume pas au fait de traverser le mucus, mais de le traverser assez rapidement pour ne pas être éliminé par la clairance mucociliaire. Pour préciser cette ultime difficulté, on peut souligner que, comme cela sera décrit dans la partie II.4., la clairance mucociliaire est souvent ralentie en cas de pathologies pulmonaires, cibles privilégiées des particules thérapeutiques développées, mais qu'en contrepartie le mucus y est beaucoup plus dense.

II.3. Autres fonctions

En plus de son rôle de protection, le mucus hydrate les épithéliums pulmonaire et oculaire, empêchant leur dessèchement au contact de l'air (Bansil and Turner, 2018). Ses propriétés lubrifiantes lui permettent aussi de faciliter le clignement des yeux et le transport des aliments dans les intestins. Dans le tractus gastro-intestinal, le mucus assure aussi l'intégrité de l'épithélium face aux sécrétions digestives, en particulier celles de l'estomac. Enfin, le mucus cervicovaginal joue un rôle clé dans le processus de procréation, puisqu'il permet de lubrifier le vagin lors des rapports sexuels et, selon la période du cycle menstruel, de favoriser ou d'empêcher la circulation des spermatozoïdes (Bansil and Turner, 2018).

II.4. Modifications du mucus au cours des maladies inflammatoires chroniques du poumon

La composition et les caractéristiques précises d'un composé multifonctionnel comme le mucus, retrouvé dans des organes essentiels, laisse naturellement présager des risques pouvant survenir en cas de modification de ces éléments. Pour bien comprendre les changements subis par le mucus, il est important de préciser que ceux-ci peuvent être à la fois des causes et des conséquences des pathologies (Taherali et al., 2018), comme nous allons le voir dans cette partie centrée sur trois pathologies inflammatoires chroniques pulmonaires qui impliquent des modifications des propriétés du mucus : la mucoviscidose, l'asthme, et la BPCO.

II.4.1. Mucoviscidose et mucus

La mucoviscidose est l'une des pathologies héréditaires d'origine génétique les plus communes, affectant plus de 100 000 personnes dans le monde (Shteinberg et al., 2021). Elle résulte de mutations au sein du gène codant la protéine CFTR. Cette protéine est un canal membranaire qui permet le transport des ions chlorure et bicarbonate entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire et participe à la régulation de l'entrée du sodium dans les cellules. Son absence ou son dysfonctionnement a pour conséquence une hydratation réduite du mucus et de plusieurs autres fluides biologiques, en particulier la sueur et les sécrétions digestives. Il en résulte des anomalies dans de nombreux organes des systèmes respiratoire, gastro-intestinal et reproducteur (Girón Moreno et al., 2021).

Plusieurs études ont eu pour but de mettre en évidence les changements de propriétés du mucus pulmonaire dans la mucoviscidose, qui sont la principale cause de morbidité dans cette pathologie. Des études de micro- et macrorhéologie ont permis de quantifier la viscoélasticité excessive du mucus pulmonaire de patients (Birket et al., 2014; Yuan et al., 2015) ou de modèles porcins de mucoviscidose (Tang et al., 2016), ou de corrélérer la viscosité des expectorations de patients à la sévérité de la pathologie (Tomaiuolo et al., 2014). À l'aide de cellules primaires, Button *et al.* ont montré que le mucus des cellules de patients atteints de mucoviscidose comprime les cils et restreint leur battement, expliquant l'accumulation du mucus dans les voies respiratoires de ces patients par l'inhibition presque totale de son élimination par la clairance mucociliaire (Button et al., 2012). La perturbation de la clairance mucociliaire est, à long terme, source d'infections récurrentes voire chroniques par des souches bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ou par des champignons, le plus fréquemment *Aspergillus fumigatus* (Shteinberg et al., 2021; Tomaiuolo et al., 2014). De ce fait, le tissu pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose peut être marqué par des épisodes inflammatoires chroniques qui aggravent fortement la pathologie. Ces épisodes inflammatoires occasionnent d'autres modifications du mucus, dont une augmentation de la production de mucines (Burgel et al., 2007; Esther et al., 2019; Henderson et al., 2014; Henke et al., 2007; Hill et al., 2014).

D'autres changements peuvent concerner les mucines, comme par exemple une réticulation par les ponts disulfures plus importante (Yuan et al., 2015), un changement de proportions des deux glycoformes de MUC5B (Kirkham et al., 2002), une altération des interactions électrostatiques entre les mucines du fait d'un pH plus acide (Tang et al., 2016), ou encore un mauvais détachement des mucines lors de leur production (Hoegger et al., 2014). L'inflammation des voies respiratoires s'accompagne par ailleurs d'un recrutement massif de cellules de l'immunité innée qui s'amoncellent dans le mucus. L'ADN libéré par les neutrophiles contribuerait lui aussi à l'aggravation de la pathologie, en s'enchevêtrant dans l'enchevêtrement du mucus pour encore augmenter sa viscosité (Dawson et al., 2003; Marcos et al., 2015; Yuan et al., 2015). Des études ont permis d'illustrer ces phénomènes en montrant que, dans le cas d'infections bactériennes, la viscoélasticité du mucus pouvait encore être augmentée (Serisier et al., 2009; Tomaiuolo et al., 2014). Pour faciliter sa colonisation des voies pulmonaires, la bactérie *P. aeruginosa* pourrait également augmenter la sialylation des mucines (Jeffries et al., 2016). L'augmentation de la viscoélasticité du mucus a ainsi un rôle clé dans l'aggravation progressive de la mucoviscidose (figure 15), et l'ensemble de ces éléments cause chez les patients une obstruction des voies aériennes et une destruction du tissu pulmonaire qui créent une insuffisance respiratoire (Kim et al., 2016), portant leur espérance de vie à moins de 50 ans (Girón Moreno et al., 2021; Miah et al., 2019).

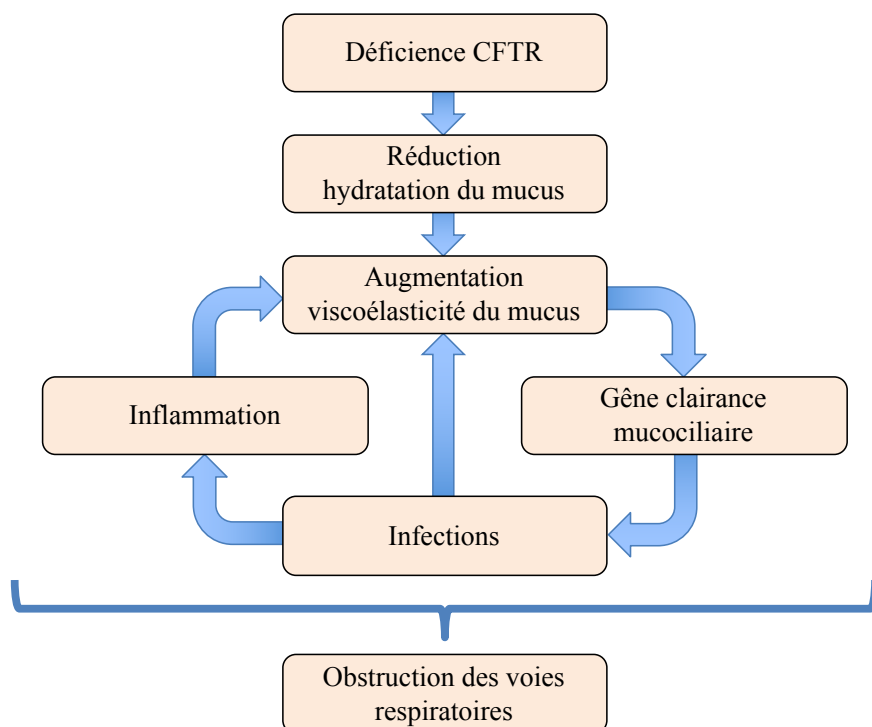


Figure 15. Rôle central de la viscoélasticité du mucus dans l'effet boule de neige observé dans la mucoviscidose.

II.4.2. Asthme et mucus

Bien qu'affectant environ 300 millions de personnes dans le monde (Mattiuzzi and Lippi, 2020), l'asthme est une pathologie dont plusieurs aspects sont encore énigmatiques. Il peut apparaître chez l'enfant comme à l'âge adulte et résulte, à la fois, d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux, comme les allergènes, la fumée du tabac et la pollution (Russell and Brightling, 2017). Les symptômes de l'asthme sont très variables d'un patient à l'autre, et même entre les différents moments de la vie d'un individu. Les patients asthmatiques peuvent ainsi présenter une capacité respiratoire réduite, en plus d'être sujets à des crises plus ou moins longues et espacées, durant lesquelles la respiration est fortement contrainte (toux, respiration sifflante, essoufflement, oppression thoracique...). Ces crises peuvent être déclenchées par des expériences aussi anodines que l'activité physique, l'air froid et les émotions fortes. D'un point de vue mécanistique, l'asthme résulte de l'inflammation chronique de l'épithélium bronchique en réponse aux facteurs déclenchants, provoquant notamment son hypersensibilité, la contraction des muscles lisses bronchiques (bronchoconstriction) et la réduction du diamètre des bronches (Barnes, 2016). L'augmentation de la production de mucines est une conséquence naturelle de l'inflammation pulmonaire ; elle a donc sans surprise été décrite dans le cas de l'asthme dans de nombreuses études (Fahy et al., 1993; Jinnai et al., 2010; Kesimer et al., 2017; Kirkham et al., 2002; Ordoñez et al., 2001). Néanmoins, des publications suggèrent que les variations dans la production de mucines au cours de cette pathologie pourraient être plus complexes. Il a par exemple été montré que, chez les patients asthmatiques, la balance entre les mucines pouvait être perturbée, avec généralement une augmentation claire de la production de MUC5AC en parallèle d'une augmentation plus modérée (Lachowicz-Scroggins et al., 2016) voire d'une diminution de celle de MUC5B (Ordoñez et al., 2001; Welsh et al., 2017; Woodruff et al., 2009), *i.e.* une augmentation du rapport MUC5AC/MUC5B. De plus, des études suggèrent qu'une quantité de MUC5B plus élevée pourrait être associée à un stade de la pathologie moins sévère (Lachowicz-Scroggins et al., 2016; Roy et al., 2014), ou que la sévérité de l'asthme pourrait dépendre des proportions des glycoformes de MUC5B (Kirkham et al., 2002; Welsh et al., 2017). Pour mieux comprendre l'implication des mucines MUC5AC et MUC5B dans la physiopathologie pulmonaire, des travaux ont été réalisés sur des modèles murins *Muc5b* ou *Muc5ac* KO. Les souris *Muc5ac* KO ne montraient pas de problème de clairance mucociliaire et même une réduction de l'obstruction des voies respiratoires après exposition à des antigènes pour mimer un asthme allergique, tandis que les souris *Muc5b* KO présentaient des problèmes de clairance mucociliaire (Evans et al., 2015; Roy et al., 2014). Ces résultats penchent en faveur d'un rôle protecteur de MUC5B et d'un effet aggravant de MUC5AC.

Comme chez les patients atteints de mucoviscidose, l'inflammation associée à l'asthme entraîne un afflux dans les voies aériennes de nombreuses cellules de l'immunité innée (granulocytes, cellules dendritiques...), et la quantité d'ADN retrouvée dans le mucus des patients est plus importante

(Atanasova and Reznikov, 2019; Fahy et al., 1993). Dunican *et al.* suggèrent par ailleurs que la formation de « plugs » chez les asthmatiques (amas de mucus pouvant parfois contribuer au décès du patient) pourrait être décuplée par les éosinophiles, produisant une peroxydase (EPO) qui augmenterait la réticulation des mucines par oxydation, et donc le module élastique G' du mucus (Dunican et al., 2018). Ces phénomènes sont particulièrement observés chez les individus atteints d'asthme sévère, chez qui l'inflammation chronique a entraîné un remodelage des voies respiratoires, avec une hyperplasie des cellules caliciformes (Atanasova and Reznikov, 2019).

II.4.3. BPCO et mucus

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la BPCO serait la 3^{ème} cause de décès dans le monde, étant responsable de 6% d'entre eux (OMS, décembre 2020). Elle apparaît généralement à partir de 40 ans, et le tabac est son principal facteur de risque dans les pays développés. Comme l'asthme, la BPCO se caractérise par une inflammation des voies respiratoires. Les zones touchées sont néanmoins différentes dans les deux pathologies, l'asthme affectant plutôt les bronches tandis que la BPCO touche également le parenchyme pulmonaire et des zones du poumon plus profondes, en particulier les alvéoles. La BPCO peut ainsi être responsable d'emphysèmes pulmonaires qui apparaissent suite à la perte d'élasticité du parenchyme. Par ailleurs, les mécanismes inflammatoires sont distincts entre les deux pathologies, l'asthme résultant généralement d'une réponse immunitaire de type Th2 (inflammation allergique) et la BPCO d'une réponse de type Th1 (inflammation neutrophilique) (Barnes, 2016). L'inflammation des voies respiratoires des patients atteints de BPCO conduit tout de même à des modifications du mucus qui rappellent celles observées chez les patients asthmatiques avec, en particulier, des proportions de mucines et d'ADN (Chisholm et al., 2019; Hill et al., 2014; Innes et al., 2006) et une viscoélasticité (Serisier et al., 2009) plus élevées qu'en absence de la pathologie. Kirkham *et al.* décrivent le même changement dans le profil de production des glycoformes de MUC5B dans la BPCO que dans l'asthme et la mucoviscidose (Kirkham et al., 2002). Les mêmes auteurs rapportent également un rapport MUC5AC/MUC5B qui diminue, contrairement à ce qui a été montré pour l'asthme (Kirkham et al., 2008), mais une étude plus récente décrit une augmentation de ce rapport (Kesimer et al., 2017). Plusieurs équipes mettent aussi l'accent sur l'inhibition de la clairance mucociliaire chez les fumeurs, en particulier en cas de BPCO, associée à une hypertrophie et une hyperplasie des cellules caliciformes et une réduction de la taille des cils (Innes et al., 2006; Leopold et al., 2009). Certaines études montrent que la fumée de cigarette pourrait agir indépendamment à d'autres niveaux, par exemple en réduisant l'efficacité de la protéine CFTR (Cantin et al., 2006) ou en induisant une production de MUC5AC *via* l'activation de la voie TLR3-EGFR (*Toll-like Receptor 3-Epithelial Growth Factor Receptor*) (Kanai et al., 2015). Enfin, comme dans la mucoviscidose, l'inhibition de la clairance mucociliaire peut être à l'origine d'infections qui exacerbent la pathologie (Fahy and Dickey, 2010).

Pour terminer cette partie en ouvrant une parenthèse d'actualité, on peut souligner qu'une hypersécrétion de mucus est aussi retrouvée dans la COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), en particulier du fait de l'inflammation et de la tempête cytokinique qui survient en réponse à l'infection des cellules des voies respiratoires par le coronavirus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (Khan et al., 2021). La mucine MUC5AC, mais aussi MUC1, seraient ainsi particulièrement hypersécrétées dans cette pathologie (Lu et al., 2021). D'un point de vue scientifique, les pathologies permettent de mieux comprendre le lien entre la composition, la structure et le rôle du mucus, et ainsi d'illustrer les points décrits dans les parties précédentes.

III. Modèles et méthodes d'étude du mucus

Le mucus forme une couche protectrice de quelques dizaines de micromètres d'épaisseur sur les zones peu accessibles que sont les muqueuses. La tâche de le récupérer sans risque chez l'Homme, en limitant la déstructuration de son architecture caractéristique malgré son adhésivité, est donc extrêmement délicate. Par ailleurs, les quantités récupérées doivent être suffisantes pour pouvoir réaliser des tests avec des techniques qui peuvent parfois nécessiter des volumes d'échantillon conséquents. Par conséquent, pour pouvoir faire suffisamment d'études complètes et convaincantes, il a fallu recourir à d'autres modèles de mucus et/ou à des techniques nécessitant des volumes d'échantillons abordables. Ces modèles et méthodes sont présentés dans les parties suivantes. Encore une fois, l'accent sera surtout mis sur le mucus pulmonaire.

III.1. Modèles de mucus

Comme tout modèle, les modèles de mucus sont partagés entre, d'un côté, leur pertinence et leur ressemblance au mucus humain *in vivo* et, de l'autre, leur accessibilité (facilité de récupération, quantité disponible, coût...). Ainsi, les modèles retrouvés dans la littérature s'intéressant au mucus pulmonaire sont divisés en trois groupes : les modèles de mucus pulmonaire humain, les modèles de mucus pulmonaire d'origine animale et les modèles à base de mucines purifiées.

III.1.1. Mucus pulmonaire humain

Les modèles de mucus pulmonaire humain sont essentiellement des modèles *in vitro*. Quatre méthodes sont utilisées pour récupérer des échantillons de mucus pulmonaire chez l'Homme (Atanasova and Reznikov, 2019). Les deux méthodes les plus employées sont l'utilisation de tubes endotrachéaux et l'expectoration. Les tubes endotrachéaux sont des dispositifs tubulaires insérés dans la trachée par la bouche ou par le nez au cours d'une intubation intratrachéale. L'intubation intratrachéale est pratiquée en cas d'urgence pour permettre une ventilation mécanique ou pour inspecter les voies aériennes (Lapinsky, 2015). Après l'intubation, le mucus accumulé dans ou autour du tube endotrachéal peut être collecté. L'expectoration (ou crachat) est l'expulsion de sécrétions présentes dans les voies aériennes, dont le mucus, par la toux. Elle doit être induite chez les individus non-fumeurs et/ou sans pathologie pulmonaire, mais peut être spontanée chez les autres. L'induction d'une expectoration est réalisée en suivant un protocole standardisé, durant lequel l'individu inhale une solution saline hypertonique (Weiszhar and Horvath, 2013). Les deux autres méthodes pour récupérer du mucus pulmonaire humain nécessitent de réaliser une bronchoscopie, une technique qui consiste à insérer un instrument de forme tubulaire (bronchoscope) dans l'arbre respiratoire d'un patient sous anesthésie générale. Il est ainsi possible de récupérer directement du mucus, souvent sous forme d'amas (ou « plug ») en cas de

pathologie respiratoire, ou de réaliser un lavage bronchoalvéolaire (BAL), qui consiste à introduire puis récupérer un volume de liquide connu pour « laver » les conduits respiratoires et ainsi récupérer du mucus (Atanasova and Reznikov, 2019). À noter que, dans certaines études, des biopsies bronchiques de patients ont été incubées dans un tampon contenant de l'acétylcholine ou de la méthacholine afin d'induire la sécrétion de mucus et de récupérer ce dernier (Ehre et al., 2019). Bien entendu, la technique de récupération utilisée dépend de l'objectif visé : les mesures des propriétés rhéologiques, par exemple, sont exclusivement effectuées sur des expectorations ou sur du mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux. Les BAL sont généralement très peu utilisés chez l'Homme, car ils ne peuvent être effectués qu'en cas d'indication clinique.

Il reste important de préciser que la pertinence élevée de ces échantillons est limitée par certaines modifications de composition ou de qualité inhérentes à la technique de récupération utilisée et à la manipulation d'échantillons humains. Par exemple, le mucus expectoré peut être contaminé par de la salive, des sécrétions nasales, du sang ou par la solution saline utilisée pour l'induction. Le mucus récupéré par BAL est dilué dans le liquide de lavage, et sa composition peut être altérée par le fait que les lavages répétés peuvent décrocher de nombreuses protéines et cellules qui sont normalement dissociées du mucus. Après récupération, les échantillons de mucus sont aussi régulièrement soumis à des traitements chimiques ou physiques importants : traitement des expectorations avec le dithiothréitol (DTT), un agent réducteur des ponts disulfures (Fahy et al., 1993; Jinnai et al., 2010; Ordoñez et al., 2001; Yuan et al., 2015), congélation puis décongélation des expectorations (Duncan et al., 2016; Jinnai et al., 2010; Kirkham et al., 2008; Nafee et al., 2018; Ordoñez et al., 2001; Sanders et al., 2000; Serisier et al., 2009), du mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux (Meziu et al., 2021) ou des BAL (Esther et al., 2019), ou encore centrifugation des expectorations (Jinnai et al., 2010; Marcos et al., 2015; Ordoñez et al., 2001), du mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux (Meziu et al., 2021; Schuster et al., 2013) ou des BAL (Esther et al., 2019). Néanmoins, les traitements chimiques sont rarement effectués en amont des mesures rhéologiques ou des observations microscopiques, pour éviter une déstructuration du mucus. De plus, s'il est fréquent que la collecte et l'analyse des échantillons de mucus soient réalisées le même jour pour éviter une étape de congélation (Ehre et al., 2019; Rosenecker et al., 2003; Suk et al., 2011a; Tomaiuolo et al., 2014), plusieurs études montrent que cette étape ne modifierait pas la structure du mucus (Meziu et al., 2021; Murgia et al., 2016; Sanders et al., 2000; Serisier et al., 2009). Une autre limite de l'utilisation du mucus pulmonaire humain est son accessibilité. L'acquisition de tels échantillons nécessite, comme pour tout échantillon humain, de se plier à la législation en vigueur concernant l'utilisation d'échantillons biologiques humains destinés à la recherche (déclaration, autorisations). La collecte des échantillons par bronchoscopie ou intubation endotrachéale requiert par ailleurs une anesthésie générale et une expertise médicale de haut niveau. Enfin, les volumes de mucus récupérés varient selon les patients et sont relativement modestes, entre 100 et 500 μL par tube endotrachéal par exemple (Duncan et al., 2016; Schuster et al., 2013).

III.1.2. Mucus pulmonaire d'origine animale

- *In vitro*

Chez la souris, espèce animale très utilisée pour étudier la physiopathologie de la mucoviscidose, de l'asthme ou de la BPCO, le mucus pulmonaire est naturellement difficile à collecter et présent en quantités très limitées. De ce fait, chez cette espèce animale, le « mucus pulmonaire » est essentiellement récupéré en réalisant des BAL, et généralement utilisé pour faire des tests de stabilité de particules (Kleemann et al., 2005; Mastorakos et al., 2015; Osman et al., 2018). Dans quelques rares études, des animaux plus imposants, comme le porc (Murgia et al., 2016), le chien (Tomkiewicz et al., 1995) ou le cheval (Kirch et al., 2012) sont utilisés afin de collecter des volumes significatifs de mucus pulmonaire structuré. Le porc est d'ailleurs la principale espèce animale employée comme source de mucus gastro-intestinal en vue d'études *in vitro*, ceci grâce à des échantillons obtenus auprès d'abattoirs locaux (quelques exemples : Abdulkarim et al., 2015; Bhattacharjee et al., 2017; Crater and Carrier, 2010; Lam et al., 2021). Des quantités élevées de mucus peuvent être ainsi récupérées à partir de quelques animaux seulement (Groo and Lagarce, 2014).

- *Ex vivo*

Les modèles animaux offrent également la possibilité de faire des études *ex vivo*, et ainsi de s'affranchir des modifications du mucus possiblement engendrées par la méthode de récupération. Pour le mucus pulmonaire, on peut ainsi citer quelques études dans lesquelles la trachée a été récupérée, ouverte de façon longitudinale, et mise à plat pour faire des études de diffusion dans le mucus ou de transfection, ceci chez la souris (Morgan et al., 2021; Suk et al., 2011b, 2014) ou chez le mouton (Ferrari et al., 2001). Henning *et al.* ont également mis au point un modèle *ex vivo* à partir de trachée d'embryon de poulet, dans lequel la clairance mucociliaire serait encore active (Henning et al., 2008).

- *In vivo*

En dépit des modèles décrits ci-dessus, seules les études *in vivo* permettent réellement de prendre en compte certains éléments essentiels comme la circulation de la molécule du point d'administration jusqu'au mucus et sa biodistribution dans l'arbre respiratoire, la présence de la PCL, le mouvement et le renouvellement perpétuels du mucus par la clairance mucociliaire, et l'ensemble du microenvironnement respiratoire. Dans le contexte du mucus pulmonaire, la souris est le modèle *in vivo* le plus fréquemment utilisé (pour ne citer que quelques exemples : Mastorakos et al., 2015; Osman et al., 2018; Schneider et al., 2017; Suk et al., 2014), mais il est possible de faire appel à d'autres espèces animales, comme le rat (Kolte et al., 2017; Ungaro et al., 2012), le chien (Tomkiewicz et al., 1995) ou le mouton (Esther et al., 2019; Griesenbach et al., 2011b). Les modèles murins génétiquement modifiés (KO notamment) ont particulièrement été utiles pour amener à la compréhension de la fonction des mucines (Evans et al., 2015; Roy et al., 2014). Pour appréhender la biodistribution, la pénétration du

mucus ou l'efficacité de médicaments développés pour le traitement de pathologies pulmonaires associées à une hyperproduction de mucus (comme celles décrites dans la partie précédente), il est préférable d'utiliser des modèles dans lesquels les quantités et les propriétés du mucus sont anormales. Dans le cas de la mucoviscidose, il a été tenté, en premier lieu, de générer des souris KO pour la protéine CFTR. Malheureusement, seules 15% des souris survivaient dans les 30 jours suivant leur naissance, avant que les premiers symptômes de mucoviscidose n'apparaissent (Snouwaert et al., 1992). Les modèles murins utilisés sont donc des animaux portant une mutation dans le gène codant la CFTR (Ferrari et al., 2001; Heeckeren et al., 1997) qui offrent ainsi la possibilité d'étudier la maladie, mais également d'évaluer l'efficacité d'agents de thérapie génique apportant une version fonctionnelle de la protéine. On peut noter qu'il existe aussi un modèle de mucoviscidose chez le porc qui présente également des anomalies de production de mucus et de clairance mucociliaire, sans compter que le mucus pulmonaire du cochon est composé, comme celui de l'Homme, des mucines MUC5AC et MUC5B (Xie et al., 2018). Il existe par ailleurs des modèles murins transgéniques, utilisés comme modèles de BPCO, dans lesquels le canal à sodium β ENaC est surexprimé, résultant notamment en un emphysème et une surproduction de mucus (Ehre et al., 2019; Geiser et al., 2013). Toutefois, les modèles de BPCO les plus pertinents restent ceux induits par l'inhalation de la fumée de cigarette (Mercer et al., 2015). Enfin, des modèles d'asthme allergique, dans lesquels une hypersécrétion de mucus et une inflammation surviennent dans le poumon, peuvent être générés en sensibilisant les animaux avec de l'ovalbumine (Daubeuf and Frossard, 2013; Mercer et al., 2015; Xie et al., 2016) ou des extraits d'allergènes d'acariens (Mercer et al., 2015; Weiss et al., 2021) voire de moisissures (Morgan et al., 2021), par exemple.

III.1.3. Modèles à base de mucines purifiées

Pour contourner les difficultés associées au travail avec le mucus pulmonaire humain ou animal, les modèles à base de mucines purifiées sont souvent utilisés. Il s'agit notamment de la PGM et de la mucine des glandes submandibulaires bovines, deux lyophilisats de mucines commerciaux. La PGM est préparée à partir du mucus de l'estomac de porc. Elle existe sous deux formes, appelées type II ou type III. La PGM de type III est une version purifiée de la PGM, qui a subi des étapes de purification (précipitations avec de l'éthanol, centrifugations), comme décrit en 1988 (Glenister et al., 1988). Bien entendu, la PGM est utilisée en tant que modèle dans de nombreuses études sur le mucus gastro-intestinal. Cependant, elle est aussi couramment utilisée comme substitut des mucines pulmonaires. En effet, bien que MUC5B soit remplacée par MUC6 dans la PGM (Stürmer et al., 2014), les deux mucines partageraient des similarités de composition, notamment en sucres et en acides aminés (Koch et al., 2011).

Pour étudier l'interaction de particules avec les mucines, la PGM est souvent mise en solution dans de l'eau ou un tampon salin et utilisée sans ajouter d'autres composants (Chen et al., 2010; Nafee et al., 2014, 2018; Ungaro et al., 2012; Xie et al., 2016). La PGM est ainsi utilisée dans certaines études pour mimer le mucus pulmonaire (Broughton-Head et al., 2007; Charrier et al., 2014; Koch et al., 2011; Sheffner, 1963). La mise en évidence, en rhéologie, de l'action d'agents mucolytiques comme la *N*-acétylcystéine (NAC) (Broughton-Head et al., 2007; Charrier et al., 2014; Odziomek et al., 2015; Sheffner, 1963) ou la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (Zhang et al., 2015) sur la PGM indique que ce modèle de mucines purifiées possède une structure maintenue par des ponts disulfures. Certains résultats suggèrent toutefois que la purification de la PGM pourrait occasionner la destruction des ponts disulfures (Griffiths et al., 2010), et il a été montré plusieurs fois que la PGM resolubilisée ne retrouvait pas l'état de gel (solide viscoélastique) du mucus (Griffiths et al., 2010; Hamed and Fiegel, 2014; Kočevár-Nared et al., 1997), ou qu'elle était déstructurée à des contraintes de cisaillement plus faibles que le mucus humain (Dawson et al., 2004).

Pour tenter de reconstituer un mucus dont la composition et la structure seraient plus proches de celles du mucus pulmonaire, il est commun que d'autres éléments soient ajoutés à la PGM. Kirchner *et al.*, par exemple, décrivent un protocole de préparation d'un mucus artificiel comme modèle d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose (Kirchner et al., 2012), repris ensuite dans différentes études (Ernst et al., 2018; Nafee et al., 2014, 2018), dans lequel la PGM de type II est additionnée d'ADN, d'acides aminés, d'un chélateur (acide diéthylènetriamine pentaacétique), de sels (NaCl et KCl), et de jaune d'œuf. Des préparations très similaires, avec de légères variations dans les proportions des constituants, ont été utilisées dans d'autres travaux (Craparo et al., 2016; Ibrahim et al., 2011; Kolte et al., 2017; Ungaro et al., 2012; Yang et al., 2011b). Enfin, certaines équipes de chercheurs ajoutent plutôt de l'albumine et de la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine à la PGM, pour lui donner une structure (Hamed and Fiegel, 2014; McGill and Smyth, 2010). Dans certains cas, il a pu être vérifié que les propriétés viscoélastiques du modèle de mucus reconstitué à base de PGM étaient effectivement comparables à celles d'échantillons humains (Yang et al., 2010).

D'autres stratégies ont été imaginées pour rendre à la PGM des propriétés viscoélastiques proches de celles du mucus. Yuan *et al.*, par exemple, ont traité la PGM avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'oxyder les cystéines et créer ou restaurer des ponts disulfures au sein de la protéine purifiée (Yuan et al., 2015). Ils observent alors une augmentation nette de G' , et plus modérée de G'' , traduisant le retour à l'état de solide viscoélastique (figure 16). La formation d'un hydrogel réticulé à base de PGM a également été décrite en incorporant des agents réticulant comme le glutaraldéhyde (Hamed and Fiegel, 2014), le PEG-diacrylate (Duncan et al., 2016), ou l'acide polyacrylique (Boegh et al., 2014). On peut aussi noter que des protocoles de purification différents ont été proposés pour obtenir, à partir du mucus gastrique porcin, de la mucine capable de former un gel après réhydratation (Schömig et al., 2016).

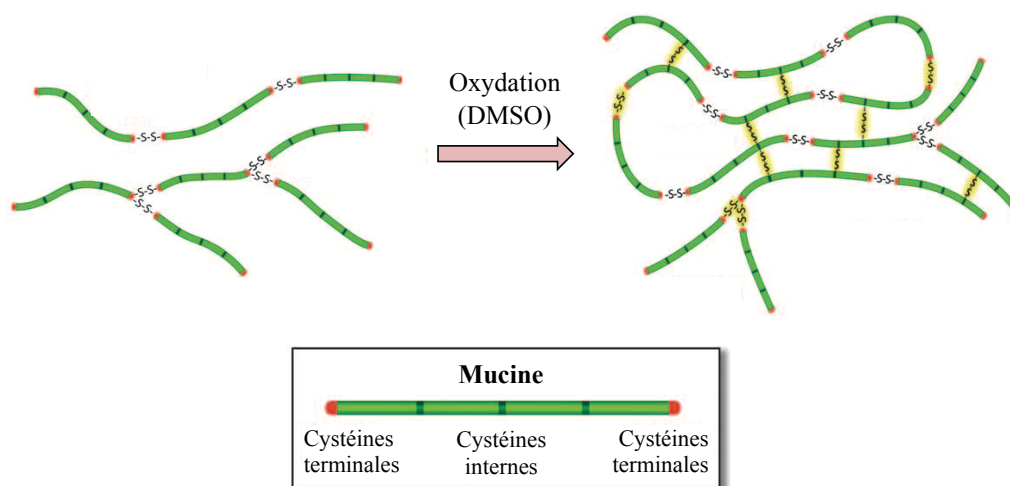


Figure 16 : Réticulation de la PGM par le DMSO selon Yuan *et al.*, 2015.

La mucine des glandes submandibulaires bovines a été utilisée, au même titre que la PGM, pour étudier l'interaction de particules, en particulier des lipoplexes, avec la mucine (Nguyen *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2002a, 2001, 2003; Xu *et al.*, 2015). Néanmoins, son utilisation est généralement limitée à cet objectif, probablement en raison d'une cytotoxicité plus élevée par rapport à la PGM, comme observée par Teubl *et al.* sur des cellules humaines de la muqueuse buccale TR146 (Teubl *et al.*, 2013), et surtout d'un coût plusieurs dizaines de fois supérieur à celui de la PGM.

Les deux modèles décrits ci-dessus sont particulièrement intéressants, car ils permettent de recréer des mucus artificiels reproductibles en jouant sur la présence ou la quantité des éléments qui composent le mucus. Néanmoins, il est légitime de se questionner quant à l'utilisation d'un lyophilisat réhydraté de mucines gastriques pour mimer le réseau complexe du mucus dans l'environnement pulmonaire, et plusieurs études privilégient donc l'utilisation de modèles animaux de mucus, plus pertinents.

III.2. Modèles cellulaires pulmonaires producteurs de mucus

À l'interface entre les tests réalisés *in vitro* sur du mucus récupéré *in vivo* ou élaboré à partir de mucines purifiées et ceux réalisés *ex vivo* ou *in vivo*, se trouve un ensemble de modèles cellulaires visant à mimer la muqueuse des voies respiratoires.

III.2.1. Cellules primaires

Avec l'avancée des techniques de culture cellulaire, il est désormais possible d'isoler et de cultiver des cellules primaires de poumon humain (Leslie Fulcher *et al.*, 2005), en particulier des cellules épithéliales

bronchiques (HBE). Ces cellules sont désormais commercialisées et peuvent provenir d'individus sains, mais aussi de patients atteints de mucoviscidose, de BPCO ou d'asthme. Les cellules HBE peuvent ensuite être ensemencées en plaques et cultivées dans du milieu de culture en mode submergé, qui est une méthode de culture conventionnelle en deux dimensions (culture 2D) (Figure 17). Toutefois, afin de mimer au mieux l'épithélium, les cellules épithéliales pulmonaires sont de plus en plus souvent cultivées sur des inserts comportant une membrane poreuse, pour obtenir des cultures en trois dimensions (culture 3D). Dans ce modèle, une fois que la confluence est atteinte, la culture peut être conservée en mode submergé (culture à l'interface liquide-liquide, ou LLI) ou à l'interface air-liquide (culture à l'interface air-liquide, ou ALI) pendant plusieurs jours à plusieurs semaines (figure 17). Dans des conditions de culture en ALI, les cellules HBE forment un épithélium différencié, producteur de mucus, avec des cellules ciliées formant des jonctions serrées et baignant dans une PCL (Boublil et al., 2013; Button et al., 2012; Charrier et al., 2014), identifiables dès 7 jours de culture (Jiang et al., 2009). En pratique, les cellules HBE sont généralement cultivées en ALI pendant 2 à 6 semaines, ou plus (Ahonen et al., 2019; Boublil et al., 2013; Hill et al., 2014).

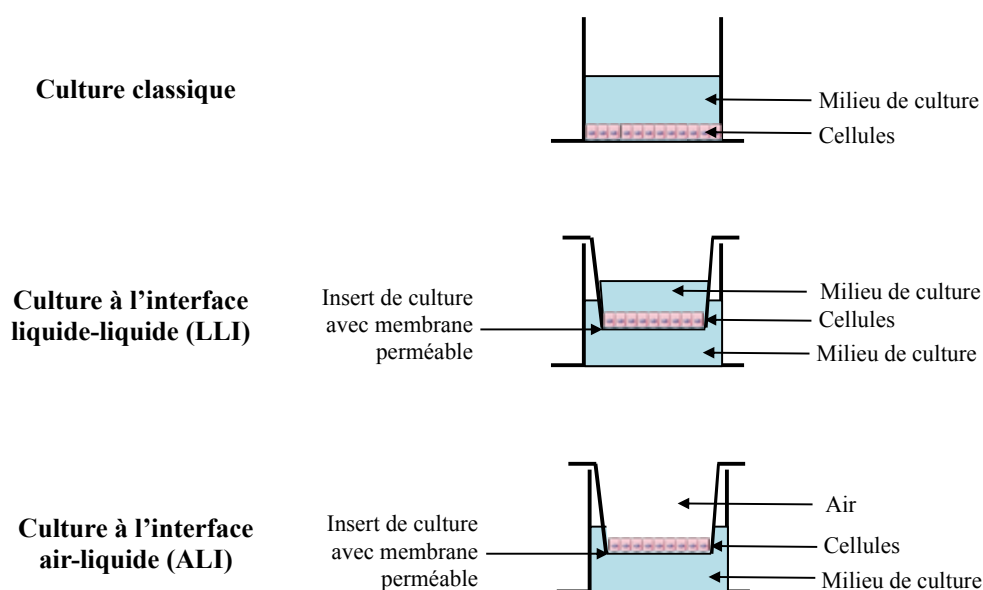


Figure 17. Modes de culture des cellules épithéliales pulmonaires.

De manière intéressante, il a été montré que les cellules HBE provenant de patients malades reproduisaient un épithélium défectueux, affecté d'un mouvement des cils inhibé (Ehre et al., 2019) ou d'un effet barrière du mucus plus important (Tagalakakis et al., 2018) en cas de mucoviscidose, ou d'une réponse inflammatoire accrue en cas d'asthme ou de BPCO (Sotty et al., 2019). Par ailleurs, une exposition des cellules HBE de sujets sains à des extraits de fumée de cigarettes augmenterait leur production de mucus (Kanai et al., 2015), reproduisant l'excès de mucus observé chez les fumeurs. Le mucus sécrété par les cellules HBE cultivées en ALI peut être collecté par simple lavage apical (Ahonen et al., 2019; Henderson et al., 2014; Hill et al., 2014; Tagalakakis et al., 2018), même si tout le mucus n'est

peut-être pas décroché, ou que des cellules peuvent être entraînées avec le mucus lors du lavage. Ce mucus montre une structure de gel viscoélastique ($G' > G''$) à l'image du mucus récupéré *in vivo* (Ahonen et al., 2019). Dans certaines études, les auteurs effectuent des étapes de séchage et de resolubilisation pour générer des modèles de mucus contenant des concentrations en mucines variables (Henderson et al., 2014; Hill et al., 2014).

Enfin, récemment, les cellules HBE ont été cultivées en co-culture avec d'autres types cellulaires (fibroblastes et cellules endothéliales) sur une matrice gélatineuse (Matrigel® par exemple) dans le but de construire des organoïdes (Tan et al., 2017). La production de mucus dans une telle organisation a pu être visualisée, mais la faible population de cellules ciliées suggérerait que ce modèle pouvait encore être optimisé.

Les cellules primaires élargissent donc les possibilités et facilitent plusieurs plans de la recherche sur l'épithélium pulmonaire. Néanmoins, le coût de ces cellules limite généralement leur utilisation à quelques essais, en particulier lorsqu'il s'agit de récupérer des quantités de mucus conséquentes. Par ailleurs, leur culture peut être contraignante : prétraitement du support avec du collagène, utilisation de milieux complexes (acides aminés, vitamines...), longue durée de culture (Leslie Fulcher et al., 2005), ce qui fait que les lignées cellulaires restent très utilisées.

III.2.2. Lignées cellulaires

En parallèle des cellules primaires, certains types cellulaires sont disponibles sous la forme de clones d'une cellule tumorale ou immortalisée, *i.e.* de lignée cellulaire. Ces lignées, le plus souvent d'origine humaine, présentent l'avantage d'être beaucoup plus faciles à cultiver (durée de vie plus longue, milieu de culture plus standard...) et d'avoir des caractéristiques moins hétérogènes que les cellules primaires. L'utilisation de lignées cellulaires est donc, encore aujourd'hui, le point de départ de la plupart des développements de vecteurs destinés à la thérapie génique ou de médicaments ciblant le poumon. Néanmoins, il est fréquent que l'efficacité ou la biocompatibilité des produits développés soit évaluée dans des modèles cellulaires ne sécrétant pas ou très peu de mucus, comme par exemple les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B cultivées en plaques à faible densité (Mastorakos et al., 2015; Osman et al., 2018). Travailler sur une lignée issue d'un patient présentant une maladie inflammatoire chronique du poumon ne garantit pas de travailler sur un modèle pertinent. Par exemple, la lignée épithéliale bronchique humaine CFBE41o-, isolée chez un patient atteint de mucoviscidose (portant une mutation sur le gène CFTR), a été particulièrement utilisée pour l'évaluation de produits de thérapie génique après une culture en plaque (Kim et al., 2013; Kolte et al., 2017) ou sur insert en ALI (Suk et al., 2014), alors qu'aucune étude ne semble avoir véritablement mis en évidence une production de mucus par ces cellules (Ghanem et al., 2020; Murgia et al., 2017). D'un autre côté, il a été montré par Northern Blot et Western Blot que la lignée épithéliale bronchique humaine Calu-3 et la

lignée épithéliale alvéolaire humaine A549, et dans une moindre mesure la lignée épithéliale bronchique humaine NCI-H292, régulièrement utilisées en transfection, produisent la protéine MUC5AC à l'état basal dans des conditions de culture conventionnelle (Berger et al., 1999). De plus, la production de mucus par ces cellules peut être augmentée par des produits toxiques, comme des extraits de fumée de cigarettes pour les cellules NCI-H292 (Kanai et al., 2015; Shao et al., 2004) ou l'acroléine pour les cellules Calu-3 (Mura et al., 2011). Néanmoins, le choix des lignées A549 et NCI-H292 dans les études de transfection est rarement justifié par leur capacité à produire du mucus, même dans le cas de molécules développées pour traverser le mucus, et ces lignées font souvent plus office d'outil de vérification que de véritable modèle de l'épithélium pulmonaire.

Pour mieux modéliser l'impact que le mucus peut avoir sur l'efficacité globale de leurs particules, certains auteurs choisissent de pré-incuber leurs objets avec une solution de mucines (Ibrahim et al., 2011; Rosenecker et al., 2003; Sanders et al., 2003). Pour aller plus loin et reconstituer un épithélium avec une couche de mucus, d'autres auteurs ont opté pour un dépôt de mucus sur des cellules en culture, par exemple du mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux déposé sur des cellules CFBE41o- (Murgia et al., 2017). Cette stratégie est aussi utilisée dans des études sur l'épithélium gastro-intestinal, en particulier avec les cellules Caco-2 qui ne produisent pas de mucus : dans ce cas, c'est souvent un mucus reconstitué à base de PGM qui est déposé sur ces cellules (Boegh et al., 2014; Dünnhaupt et al., 2015; Mahler et al., 2009). Par ailleurs, les lignées épithéliales pulmonaires peuvent être, au même titre que les cellules primaires, cultivées sur des inserts en ALI (figure 17). Alors qu'elles présentent une surface lisse lorsqu'elles sont cultivées sur inserts en LLI, les cellules A549 cultivées sur inserts en ALI pendant deux semaines présentent une surface irrégulière, parsemée de sécrétions muqueuses comprenant la mucine MUC5B (Wu et al., 2018a).

Si l'ensemble de ces résultats donne un aperçu de la production de mucus dans les lignées cellulaires utilisées comme modèles d'épithélium respiratoire, ils restent presque anecdotiques. En effet, dans les études qui utilisent un modèle cellulaire pour modéliser la barrière du mucus, les cellules très largement utilisées sont soit les cellules primaires HBE, soit les cellules Calu-3, toutes deux cultivées sur inserts en ALI. Lorsqu'elles sont cultivées sur inserts en LLI (figure 18), les cellules Calu-3 forment un épithélium confluent d'environ 25 μm d'épaisseur en moyenne et produisent la mucine MUC5AC (George et al., 2015a; Stentebjerg-Andersen et al., 2011). En revanche, sur inserts en ALI, elles se différencient pour former un épithélium colonnaire pseudostratifié de 80 μm d'épaisseur en moyenne, parsemé de microvillosités et formant des jonctions serrées (figure 18). Par ailleurs, elles deviennent beaucoup moins perméables aux particules qu'en LLI, se chargent de granules sécrétoires et produisent une quantité de mucus exacerbée (Grainger et al., 2006; Jeong et al., 2019; Kreft et al., 2015; Stentebjerg-Andersen et al., 2011; Vllasaliu et al., 2011). Parmi les lignées épithéliales pulmonaires humaines, la lignée Calu-3 cultivée sur inserts en ALI est donc celle qui mime l'épithélium pulmonaire et sa couche de mucus avec la plus grande fidélité. Son utilisation a donc été privilégiée pour étudier la

pénétration de particules dans le mucus pulmonaire (Mura et al., 2011; Nafee et al., 2018; Vllasaliu et al., 2011).

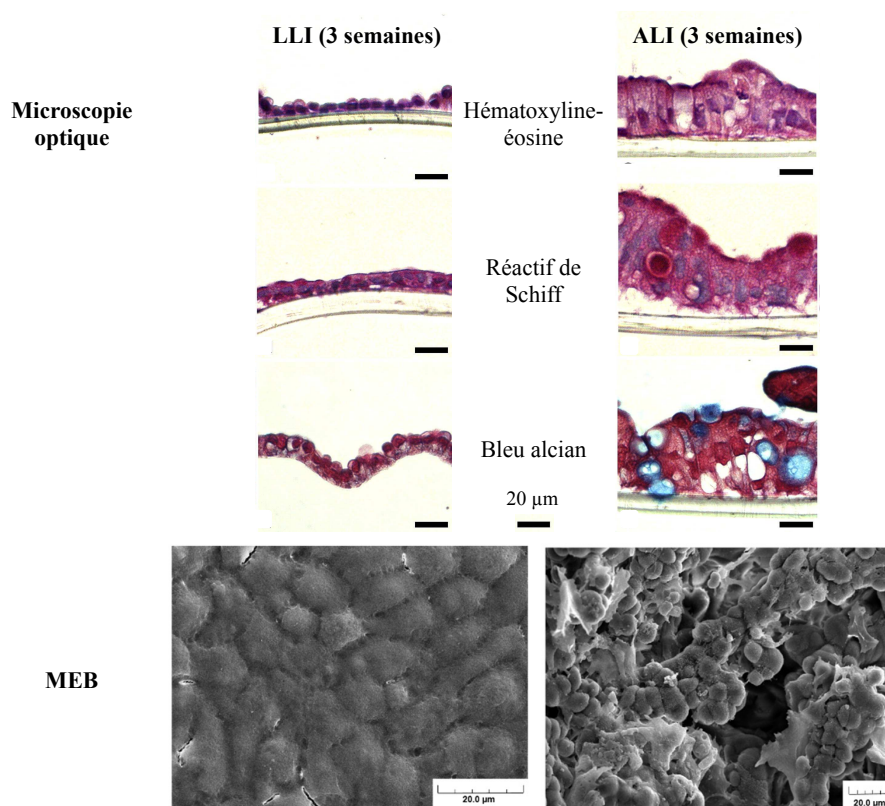


Figure 18. Cellules Calu-3, cultivées sur inserts en ALI ou en LLI (Ghanem et al., 2020; Kreft et al., 2015).

III.3. Méthodes d'étude de l'interaction des particules avec le mucus

Pour accéder à l'épithélium respiratoire, une particule devra être en mesure de se frayer un chemin à travers le mucus et de limiter ses interactions avec les constituants de celui-ci, et en particulier avec les mucines. Le développement de particules à visée thérapeutique dans le poumon implique donc de faire en sorte que ces particules aient le plus de chance possible de traverser le mucus. À l'aide des modèles de mucus existants, décrits dans la partie précédente, de nombreuses méthodes ont donc été imaginées et utilisées dans le but d'évaluer les interactions, intentionnelles ou non, des particules avec le mucus, ou de mieux comprendre quelles caractéristiques d'une particule seront favorables à sa diffusion dans le mucus. Ces méthodes sont décrites ci-dessous en trois groupes : celles permettant de mettre en évidence les modifications des propriétés biophysiques du mucus par les particules, celles permettant de mettre en évidence les changements des propriétés des particules par le mucus, et celles permettant d'étudier la diffusion des particules dans le mucus. Si ce chapitre tente de balayer le plus largement possible les techniques utilisées dans la littérature, il risque de ne pas être exhaustif du fait du nombre conséquent de méthodes et de leurs adaptations selon, notamment, les moyens et les objectifs des auteurs, les modèles de mucus utilisés, ou encore les types de particules étudiées.

III.3.1. Modifications des propriétés biophysiques du mucus

L'interaction d'un nombre conséquent de particules avec le mucus peut entraîner des modifications des propriétés physiques de ce dernier. De cette observation a émergé l'idée d'utiliser un panel de techniques pour mettre en évidence les interactions entre mucus (ou mucines) et particules.

Un changement des propriétés viscoélastiques du mucus qui résulterait de l'adhérence de particules à celui-ci, par exemple, peut être mis en évidence à l'aide d'un rhéomètre, à condition que ce changement soit assez important pour induire des modifications de la macrorhéologie du mucus. Cette idée a été particulièrement mise en pratique par l'équipe de Bernkop-Schnürch en Autriche. Par exemple, celle-ci a mesuré une forte augmentation de la viscosité du mucus récupéré dans la vessie de porc après y avoir ajouté des particules de chitosane portant des fonctions thiols, développées pour être mucoadhésives, et en a déduit que ces particules interagissaient avec le mucus en établissant des ponts disulfures avec les mucines (Barthelmes et al., 2013). Les auteurs ont montré, à l'inverse, que des systèmes de délivrance à base de surfactants cationiques et incorporant une protéinase capable de dégrader des composants du mucus, systèmes conçus pour être mucopénétrant, entraînaient une réduction d'environ 80% de la viscosité d'échantillons de mucus intestinal porcin en 30 minutes (Lam et al., 2021).

Une autre technique qui peut être utilisée pour mettre en évidence les interactions entre mucus (ou mucines) et particules est la QCM-D (*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*). Cet appareil est une microbalance à quartz qui permet de mesurer un faible changement de masse à la surface d'un cristal due à l'interaction entre deux composants. Chayed et Winnik l'ont utilisé pour évaluer l'interaction de dextrans avec de la mucine des glandes submandibulaires bovines. Pour cela, le cristal de quartz a été, dans un premier temps, recouvert d'une fine couche de mucines, puis de différents dextrans. Les plus hydrophobes d'entre eux ont alors entraîné des variations importantes de la fréquence de résonance du cristal, mettant en évidence leur importante adsorption sur la couche de mucine (Chayed and Winnik, 2007). La variation de fréquence mesurée peut ensuite permettre de calculer, par l'intermédiaire de modèles mathématiques, la masse, l'épaisseur et la viscoélasticité de la couche de mucine, avec ou sans dextran, adsorbée sur le cristal (Grießinger et al., 2015).

III.3.2. Changement des propriétés de la particule

De la même façon que les propriétés du mucus peuvent être modifiées par les particules, l'adhérence de composants du mucus sur une particule entraîne la formation d'un complexe dont le comportement et les propriétés physicochimiques peuvent être différents de ceux de la particule native.

- Agrégation et changement de taille et de charge des particules

En cas d'agrégation importante, les complexes formés peuvent aller jusqu'à entraîner un changement de turbidité de la solution, phénomène observé, par exemple, par Ungaro *et al.* avec des particules de PLGA de charge positive (recouvertes avec du chitosane) dans une solution de PGM (Ungaro *et al.*, 2012). Les agrégats peuvent également être observés par des techniques de microscopie, comme l'ont fait Uchida *et al.* avec leurs polyplexes formés avec un ADN marqué, après incubation dans des BAL de souris (Uchida *et al.*, 2012). Néanmoins, l'interaction entre les mucines et les particules n'entraîne pas systématiquement une agrégation, mais plus fréquemment des changements de la taille et de la charge des particules. Dans ce cas, des techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS) sont utilisées pour caractériser les changements de diamètre et de potentiel zêta des particules, à condition que le milieu reste homogène et ne soit pas opaque. Les modèles de mucus généralement utilisés pour ce type d'expériences sont la PGM (Chen *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2011; McGill and Smyth, 2010; Nafee *et al.*, 2014, 2018; Ungaro *et al.*, 2012) et la mucine des glandes submandibulaires bovines (Nguyen *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2002a, 2001, 2003; Xu *et al.*, 2015), avec des concentrations en mucines globalement comprises entre 0,01 et 10 mg/mL, ou des BAL de souris (Mastorakos *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2017) voire humains (Rosenecker *et al.*, 2003), même si certaines études ont pu être effectuées sur du mucus intestinal porcin (Pereira de Sousa *et al.*, 2015a). On peut aussi noter que Sanders *et al.* ont également incubé leurs particules avec d'autres éléments du mucus, comme l'ADN et l'albumine, pour décomposer l'impact respectif de chacun des composants de ce dernier (Sanders *et al.*, 2002a, 2003). Selon les études, les mesures sont effectuées juste après mise en contact de la particule avec le modèle de mucus (Dawson *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2015), après quelques dizaines de minutes à quelques heures (Gao *et al.*, 2021; Ibrahim *et al.*, 2011; Nafee *et al.*, 2014, 2018; Pereira de Sousa *et al.*, 2015a; Sanders *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2015), ou jusqu'à 72 heures plus tard (Chen *et al.*, 2010). Par ailleurs, des étapes de centrifugation et de lavage peuvent être ajoutées avant les mesures pour ne détecter que les interactions les plus fortes (McGill and Smyth, 2010). Pour ne citer que quelques exemples avec cette technique, Xu *et al.* ont montré que plus la PEGylation des particules de PLGA était dense, moins les mucines des glandes submandibulaires bovines s'y adsorbaient (Xu *et al.*, 2015). Sanders *et al.*, de leur côté, ont observé que l'incubation de lipoplexes à base de DOTAP (chlorure de DOTMA) avec de la mucine des glandes submandibulaires bovines pendant 40 minutes entraînait une augmentation importante de leur taille et une chute de leur charge de surface (Sanders *et al.*, 2001).

- Mise en évidence de protéines du mucus adsorbées à la surface des particules

Plutôt que de mettre en évidence des changements d'état d'agrégation, de taille ou de charge des particules, certaines études ont tenté d'isoler les protéines du mucus adsorbées sur leurs objets d'étude, par Western Blot par exemple. C'est le cas de l'étude de Rosenecker *et al.*, par exemple, réalisée sur des lipoplexes (formés avec la Lipofectamine®) et des polyplexes (à base de PEI ou de dendrimères de

PAMAM). Ces particules ont été incubées pendant 30 minutes avec des BAL humains. Les lipoplexes et les polyplexes ont ensuite été séparés du reste du mélange par filtration, chaque fraction soumise à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide suivie d'un Western Blot, puis les protéines glycosylées mises en évidence. Les résultats ont montré que les lipoplexes adsorbaient plus de glycoprotéines que les polyplexes (Rosenecker et al., 2003).

- Changements de composition moléculaire des particules

D'autres études ont recherché des changements de composition moléculaire des particules, avec des techniques comme la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS, *Small Angle Neutron Scattering*), la spectrométrie photoélectronique X (XPS, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) ou la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*). Dans la SANS, un faisceau de neutrons est projeté sur l'échantillon qui va dévier leur trajectoire ; la dispersion des neutrons qui est alors détectée donne des informations sur la structure de l'échantillon. Avec cette technique, Griffiths *et al.* n'ont pas observé de différence de déviation des neutrons par la PGM seule et la PGM incubée pendant au moins 2 heures avec des polymères comme l'oxyde de polyéthylène, suggérant l'absence d'interaction entre l'oxyde de polyéthylène et la mucine (Griffiths et al., 2010). Au contraire, dans la même étude, la déviation de neutrons singulière provoquée par la PGM incubée avec des dendrimères de PAMAM a permis de souligner la mucoadhésivité de ces derniers. Si cette technique a principalement été utilisée sur des solutions de mucines, elle pourrait également être utilisée pour étudier la structure interne d'échantillons de mucus (Grießinger et al., 2015). Jia *et al.* ont, de leur côté, utilisé l'XPS et la FTIR qui leur ont permis de détecter des proportions d'azote et de liaisons CN bien plus importantes pour des particules de polystyrène non PEGylées comparées à des particules PEGylées, après incubation avec la PGM, suggérant une adsorption de mucine plus importante sur les particules non PEGylées (Jia et al., 2021). Enfin, Xu *et al.* ont réalisé des expériences de titration par microcalorimétrie différentielle (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) pour mesurer des microvariations de température découlant des interactions entre les mucines et des particules de PLGA de densité de PEGylation croissante, puis relier ces microvariations à la quantité de mucines adsorbée sur les particules. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que l'adsorption des mucines des glandes submandibulaires bovines était plus faible sur la surface des particules de PLGA les plus PEGylées (Xu et al., 2015).

- Stabilité des particules

L'interaction de certains objets avec le mucus peut altérer leur stabilité. Dans le domaine de la thérapie génique, l'instabilité des complexes acide nucléique/vecteur peut conduire à une libération prématurée de l'acide nucléique et donc à une inefficacité thérapeutique. Il est donc important de s'assurer de la stabilité des particules de transfection lorsque celles-ci sont censées traverser le mucus. Pour cela, les méthodes permettant de révéler les acides nucléiques sont particulièrement utiles. Xie *et al.* ont par

exemple mis en évidence, à l'aide d'un agent intercalant fluorescent, la déstabilisation de polyplexes à base de PEI dans une solution de PGM, se traduisant par une décomplexation du siARN de plus de 70% (Xie et al., 2016). De leur côté, Sanders *et al.* ont réalisé un Southern Blot qui a permis de montrer la présence d'ADN plasmidique libre après incubation de lipoplexes avec des expectorations de patients atteints de mucoviscidose contenant d'importantes concentrations d'ADN linéaires, indiquant l'instabilité de ces objets dans de telles conditions (Sanders et al., 2001). Par ailleurs, Suk *et al.* se sont assurés de la stabilité de leurs lipoplexes dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, par microscopie de fluorescence, en vérifiant la colocalisation de l'ADN marqué avec le lipide, lui aussi marqué (Suk et al., 2011b).

- Adhésion des particules au mucus

Pour mettre en évidence l'adhésion de particules au mucus, d'autres auteurs ont choisi d'utiliser des méthodes de microscopie. Par exemple, Cu et Saltzman ont adsorbé de la PGM sur une membrane de nitrocellulose, qu'ils ont ensuite immergée dans une solution de particules de PLGA fluorescentes, puis la membrane a été observée en microscopie de fluorescence, l'intensité du signal enregistré leur permettant de quantifier les particules ayant interagi avec la mucine (Cu and Saltzman, 2009). De manière plus qualitative, Dünnhaupt *et al.* ont appliqué le même principe sur des segments de jéjunum de rat *ex vivo*, qu'ils ont submergés dans une solution de particules de chitosane ou d'acide polyacrylique (PAA) fluorescentes, thiolées ou non thiolées (Dünnhaupt et al., 2011). Après élimination des particules non adsorbées par lavage puis traitement des échantillons (inclusion,...), les auteurs ont observé, par microscopie de fluorescence, une meilleure adsorption des particules thiolées.

III.3.3. Diffusion des particules dans le mucus

L'aptitude d'une particule à diffuser dans le mucus résulte de la somme de tous les types d'interaction qu'elle peut avoir avec les composants de ce mucus (électrostatique, hydrophobe...) mais aussi des encombrements stériques qui peuvent survenir dans le maillage du mucus (cf. partie II.2), ces deux aspects étant quasiment indissociables. Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier la diffusion de particules dans le mucus.

- Mise en évidence de la pénétration des particules dans le mucus

La capacité de particules à pénétrer une couche de mucus peut être évaluée par microscopie confocale (figure 19A). Mura *et al.*, par exemple, ont visualisé la couche de mucus de cellules Calu-3 cultivées sur inserts en ALI pendant 24 heures à l'aide d'une lectine fluorescente, après y avoir déposé différentes particules de PLGA fluorescentes (Mura et al., 2011). Ils ont alors observé qu'une partie des particules recouvertes de PVA restait piégée dans la couche de mucus, tandis que la majorité des particules recouvertes avec un poloxamère (surfactant non ionique, voir partie IV.1.) étaient parvenues à la

traverser. Le même système a été utilisé par Murgia *et al.* avec des particules de polystyrène et du mucus trachéal porcin isolé (en l'absence de tapis cellulaire) (Murgia et al., 2016).

De son côté, l'équipe de Bernkop-Schnürch utilise un système de tube en rotation, qui lui a permis de mettre en évidence des différences d'aptitude à pénétrer le mucus entre particules, dans un grand nombre de ses travaux (parmi les plus récents : Lam et al., 2021; Mahmood et al., 2017; Pereira de Sousa et al., 2016). Le modèle de mucus est déposé dans un tube en silicone, et les particules sont déposées à une extrémité du tube (figure 19B). Le tube est ensuite scellé puis soumis à une rotation lente, en position horizontale, pendant un temps d'incubation allant de 4 (Mahmood et al., 2017; Pereira de Sousa et al., 2016; Rohrer et al., 2016) à 24 heures (Dünnhaupt et al., 2011; Müller et al., 2013), temps au bout duquel il est congelé, puis découpé en tronçons de 2 mm. Les particules les plus aptes à diffuser dans le mucus se trouvent alors dans les tronçons les plus éloignées du point de dépôt. Nafee *et al.* soulignent néanmoins que les mouvements de rotation pourraient occasionner des changements dans la structure du mucus (Nafee et al., 2018). Un système immobile dans de petites plaques (« *microslides* »), rappelant celui des tubes en rotation, a été utilisé par Bhattacharjee et al. (Bhattacharjee et al., 2017).

En s'inspirant de systèmes plus anciens (Li et al., 2013), Jia *et al.* ont récemment mis en place un système microfluidique qui rappelle celui de l'équipe autrichienne : les particules en solution sont injectées dans un canal à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, le mucus est placé dans un canal adjacent, et les deux canaux sont séparés par des colonnes qui ont pour rôle d'autoriser le passage des particules tout en empêchant la fuite du mucus (Jia et al., 2021). La pénétration des particules dans le mucus est évaluée en observant le système au microscope à fluorescence (figure 19C).

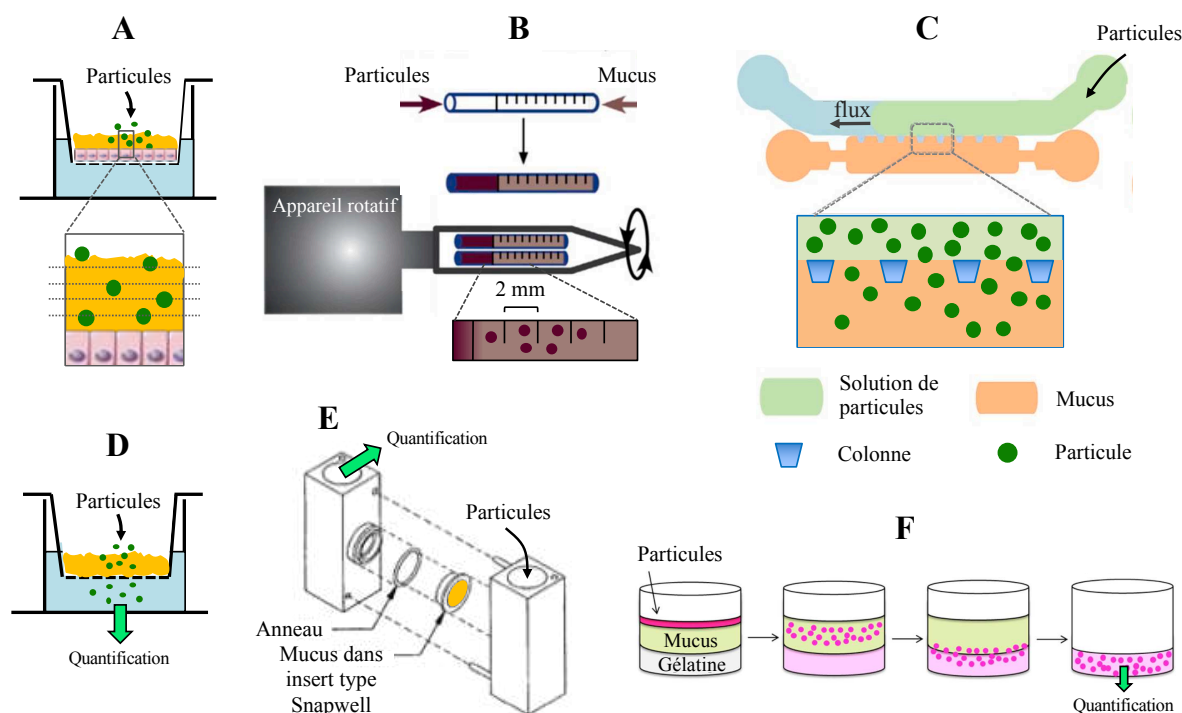


Figure 19. Diverses méthodes d'étude de diffusion. **(A)** Insert et microscopie confocale. **(B)** Tubes rotatifs (adapté de Pereira de Sousa et al., 2015b). **(C)** Système microfluidique (adapté de Jia et al., 2021). **(D)** Transwell®. **(E)** Chambre de Ussing adaptée (Norris and Sinko, 1997). **(F)** Système avec gélatine (Craparo et al., 2016).

Si les dispositifs décrits ci-dessus évaluent la profondeur atteinte par les particules dans une couche de mucus, d'autres modèles ont pour objectif de déterminer si une particule est, ou non, capable de traverser une couche de mucus d'une épaisseur donnée en un certain laps de temps. Ces systèmes sont de manière générale constitués de deux compartiments séparés par une couche de mucus : un compartiment dit « donneur », point d'administration des particules, et un compartiment « accepteur », dans lequel les particules ayant traversé la couche de mucus sont quantifiées après un temps donné. Dans l'une des configurations donneur/accepteur les plus retrouvées, le mucus est déposé dans un insert de type Transwell®, qui sépare les compartiments donneur (au-dessus de l'insert) et accepteur (en-dessous de l'insert) (figure 19D). Avec cette technique, Ernst *et al.* ont par exemple montré qu'après 24 heures, 52% de leurs particules de PLGA de 225 nm de diamètre traversaient une couche de mucus reconstitué à base de PGM, contre 35% pour celles de 899 nm (Ernst et al., 2018). On peut noter que ce dispositif utilisant des inserts est aussi beaucoup employé avec des cellules (productrices de mucus ou non), la dimension du passage des particules à travers le tapis cellulaire, par exemple par transcytose, s'ajoutant alors à la problématique de la diffusion dans le mucus (par exemple dans George et al., 2015b; Vllasaliu et al., 2011).

En 1997, Norris et Sinko ont adapté un dispositif de type « chambre de Ussing » pour l'étude du mucus, en séparant les deux compartiments de la chambre par un échantillon de mucus enserré entre deux membranes perméables (Norris and Sinko, 1997) (figure 19E). Depuis, ce type de système a été

réutilisé dans un grand nombre d'études, l'épaisseur de la couche de mucus et le type et la porosité des membranes pouvant être ajustés (voir par exemple Laffleur and Bernkop-Schnürch, 2013; Müller et al., 2013; Odziomek et al., 2015). Des versions verticales de ce dispositif, comme la cellule de diffusion de Franz (Li et al., 2011) ou une adaptation de la chambre de micro-Boyden (Broughton-Head et al., 2007), ont été utilisées dans certaines études.

Dans une autre version du système donneur/accepteur, utilisée dans plusieurs articles (par exemple dans Craparo et al., 2016; Kolte et al., 2017; Ungaro et al., 2012; Yang et al., 2011b), les particules sont déposées sur le mucus, lui-même placé sur une plaque de gélatine solidifiée. Après incubation, le mucus est retiré et les particules qui ont traversé le mucus, enlisées dans la gélatine, sont quantifiées (figure 19F).

En dernier lieu, il est important de préciser que, dans tous ces dispositifs, des étapes de vérification doivent être effectuées pour s'assurer que la couche de mucus ne fuit pas dans l'un des compartiments.

- Mesure de la vitesse de diffusion des particules dans le mucus

Même si les techniques décrites ci-dessus peuvent fournir des informations sur la cinétique de pénétration des particules dans le mucus, des techniques plus pointues sont requises pour déterminer avec précision la vitesse de diffusion (ou coefficient de diffusion) des particules. Deux techniques, qui requièrent l'utilisation de particules fluorescentes, sont principalement utilisées dans ce but : le FRAP et le MPT (figure 20).

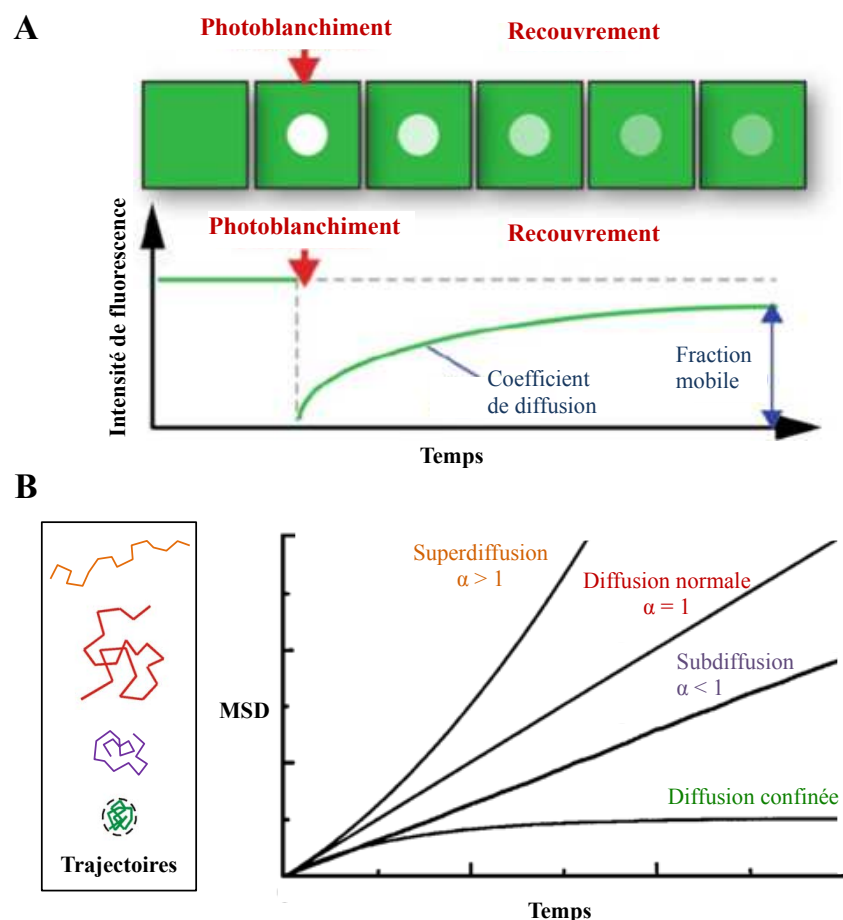


Figure 20. Méthodes principales de détermination du coefficient de diffusion de particules fluorescentes dans le mucus. **(A)** FRAP (Carman, 2011) : La fluorescence moyenne est mesurée dans une zone circulaire de l'échantillon. Cette zone est ensuite exposée à un flash lumineux pour dissiper irréversiblement, par photoblanchiment, la fluorescence des particules qui s'y trouvent. La cinétique de recouvrement de la zone éteinte (ré-augmentation de la fluorescence) par les particules avoisinantes dépend du coefficient de diffusion moyen des particules. **(B)** MPT (adapté de Saxton and Jacobson, 1997) : Le déplacement des particules dans le mucus est suivi par microscopie à haute résolution pendant un intervalle de temps donné. À partir des trajectoires individuelles obtenues, il est possible de calculer le déplacement quadratique moyen (MSD) de chaque particule en fonction du temps. L'allure du MSD en fonction du temps donne des renseignements sur les contraintes stériques qui limitent la diffusion de la particule, et la modélisation mathématique de la courbe permet de déterminer son coefficient de diffusion.

Le FRAP consiste à éteindre de manière irréversible la fluorescence des particules se trouvant dans une zone donnée d'un échantillon par photoblanchiment, puis à mesurer la ré-augmentation de la fluorescence moyenne de cette même zone au fur et à mesure que des particules avoisinantes réinvestissent cette zone par diffusion. Avec cette technique, on peut calculer le coefficient de diffusion moyen des particules et la fraction de particules mobiles (figure 20A). En effet, plus le coefficient de diffusion moyen des particules sera élevé, plus vite un équilibre sera retrouvé entre la fluorescence de la zone blanchie et le reste de l'échantillon. Le FRAP a par exemple été utilisé par Nordgård *et al.* pour étudier la diffusion de particules de polystyrène dans du mucus gastrique de porc, traité ou non avec des oligomères de guluronate. La vitesse de diffusion des particules de polystyrène, augmentée dans le

mucus traité par les oligomères de guluronate, suggérait que ces derniers entraînent une inhibition de l'interaction des particules avec le mucus et/ou déstructurent le réseau formé par les mucines (Nordgård et al., 2014).

Contrairement au FRAP, qui permet uniquement l'étude de la diffusion des particules dans leur ensemble, le MPT permet l'étude de la diffusion (et donc la détermination du coefficient de diffusion) de chaque particule individuellement. Cette technique repose sur le suivi des particules fluorescentes dans un échantillon par microscopie à haute résolution. Comme cette technique a été utilisée, dans ce travail de thèse, pour étudier la diffusion des lipoplexes dans le mucus, elle est ici présentée plus en détail.

À partir de la trajectoire de chaque particule suivie, une valeur expérimentale, le déplacement quadratique moyen (ou MSD pour *Mean Squared Displacement*), est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$MSD = 1/(N - n) \sum_{i=1}^{N-n} |x_{i+n} - x_i|^2 \quad , \quad n = 1, \dots, N - 1$$

dans laquelle N correspond au nombre de coordonnées consécutives d'une particule $x_i = (x_i, y_i)$, dont la trajectoire a été enregistrée avec un intervalle de temps constant Δt sur une période de temps $T = (N - 1)\Delta t$. Le MSD représente la surface explorée par la particule depuis le début de la trajectoire. Il s'agit de la seule valeur expérimentale calculée dans les expériences de MPT, toutes les autres (dont le coefficient de diffusion) étant déterminées *via* la modélisation du MSD en choisissant une loi mathématique adaptée à l'objectif visé et au mode de diffusion des particules.

En théorie, l'évolution de la valeur du MSD en fonction du temps dépend du coefficient de diffusion et du mode de diffusion de la particule (figure 20B). Dans le cas d'une diffusion normale (mouvement Brownien), la particule n'est soumise qu'aux interactions (chocs) avec les petites molécules du milieu environnant et l'exploration de l'espace par la particule est donc stochastique et régulière. Dans ce cas précis, le MSD ne dépend donc que du coefficient de diffusion de la particule, noté D , et du temps, noté t :

$$MSD = D \times 4 t$$

Le coefficient de diffusion est lui-même régi par la loi de Stokes-Einstein, selon l'équation :

$$D = \frac{k \times T}{\mu \times 6\pi \times r}$$

avec D , le coefficient de diffusion (en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), T la température (en Kelvin), μ la viscosité du milieu (en $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1}$), et r le rayon hydrodynamique de la particule (en m). En parallèle, on emploie le terme de superdiffusion (ou de diffusion dirigée) lorsque la particule explore son environnement plus rapidement que si elle était en mouvement Brownien. Son MSD

théorique est alors proportionnel au temps élevé à un exposant α supérieur à 1 (α est appelé exposant anomal). Ce mode de diffusion peut être rencontré en cas de transport actif (dans le cytoplasme, le long du cytosquelette, par exemple). À l'inverse, dans les milieux complexes en absence de transport actif, en raison des interactions et des contraintes opposées par les différents éléments du milieu, l'exploration de l'espace par la particule est restreinte, et le MSD théorique d'une telle particule est alors proportionnel au temps élevé à un exposant α inférieur à 1. On parle alors de subdiffusion. Dans le cas où une particule finit par explorer tout l'espace qui lui est accessible, son MSD atteint un plateau et on parle de diffusion confinée (Saxton and Jacobson, 1997).

En pratique, le MSD peut être utilisé pour comparer l'exploration de l'espace par les particules dans le mucus (par exemple dans Ehre et al., 2019; Mastorakos et al., 2015). Néanmoins, dans la plupart des études, l'objectif est aussi de déterminer le coefficient de diffusion des particules, ce qui nécessite de choisir une loi mathématique pour modéliser le MSD. Dans le mucus, la stratégie de modélisation du MSD qui est de très loin la plus utilisée est celle décrite et utilisée par l'équipe de Hanes. Le modèle en question consiste à calculer un coefficient de diffusion effectif (D_{eff}) à partir du MSD (Suh et al., 2005) à l'aide de l'équation suivante, qui le lie au MSD par une simple loi de proportionnalité, comme le MSD et le D en cas d'un mouvement Brownien :

$$MSD = D_{eff} \times 4 t$$

Le terme effectif permet d'illustrer le fait que ce coefficient est calculé comme si toutes les diffusions étaient Browniennes, ou, en d'autres termes, sans distinction des particules selon leur mode de diffusion (c'est-à-dire quelle que soit l'allure de la courbe du MSD en fonction du temps). Il en résulte que, dans le cas d'une diffusion de type subdiffusion ou de type diffusion confinée, D_{eff} est largement impacté par le fléchissement de la courbe du MSD et diminue en fonction du temps, même si la vitesse réelle de la particule est constante. Pour limiter ce phénomène, le D_{eff} de toutes les particules est déterminé à un même intervalle de temps (en général une seconde). Le coefficient de diffusion effectif moyen d'une population de particules peut ensuite être calculé, et se note $\langle D_{eff} \rangle$. L'équipe de Hanes a utilisé cette stratégie pour comparer la diffusion de plusieurs types de particules dans un grand nombre de modèles de mucus, notamment pour montrer la meilleure diffusion de particules PEGylées dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Kim et al., 2013; Osman et al., 2018; Schneider et al., 2017), du mucus de tubes endotrachéaux (Schuster et al., 2013), du mucus nasal (Lai et al., 2011), ou encore du mucus cervicovaginal (Lai et al., 2007; Tang et al., 2009). D'autres équipes ont montré, avec cette technique, la meilleure diffusion des particules de charge neutre par rapport aux particules chargées dans du mucus intestinal porcin (Abdulkarim et al., 2015), soulignant l'importance de la charge dans la mucoadhésion.

Dans certaines études, pour aller plus loin, l'équipe de Hanes utilise aussi un modèle d'obstruction (*obstruction-scaling model*) pour déterminer la taille des pores du mucus à partir de la

diffusion des particules (Suk et al., 2009). Ce modèle, initialement développé pour décrire le comportement des particules en mouvement dans un hydrogel (Amsden, 1999), se base sur la relation suivante :

$$\frac{\langle D_{eff} \rangle}{D_{m\ pore}} = \exp \left(\frac{-\pi}{4} \times \left(\frac{r + r_f}{r_c + r_f} \right)^2 \right)$$

Cette formule consiste à expliquer la différence entre le coefficient de diffusion mesuré (dans leur cas, $\langle D_{eff} \rangle$) et celui que la particule devrait avoir en l'absence d'obstruction ($D_{m\ pore}$) par la présence d'un polymère présentant des mailles de rayon moyen r_c limitant les déplacements de la particule. Elle utilise ainsi plusieurs valeurs expérimentales : 1- $\langle D_{eff} \rangle$, mesuré par MPT, 2-le rayon de la particule (r), mesuré par DLS, 3-le rayon d'une fibre de mucine (r_f), estimé par divers études biochimiques et microscopiques dans le mucus cervicovaginal (Olmsted et al., 2001), et 4-la microviscosité du mucus (notée μ_m), utilisée pour calculer $D_{m\ pore}$ (à l'aide de la loi de Stokes-Einstein) et estimée 2,9 fois supérieure à celle de l'eau par FRAP avec des dextrans de petite taille (Braeckmans et al., 2003). Cette équation a été utilisée pour caractériser différents types de mucus, en comparant le $\langle D_{eff} \rangle$ de particules (principalement des billes de polystyrène PEGylées de 200 et 500 nm) à leurs $D_{m\ pore}$ théoriques (Chisholm et al., 2019; Lai et al., 2011; Shen et al., 2006; Suk et al., 2009; Wang et al., 2013). Néanmoins, on peut noter que ce modèle présente des imperfections, notamment : 1- r_c est calculé à partir du coefficient de diffusion, ce qui implique que l'on considère que si deux particules ne se déplacent pas à la même vitesse, elles sont obligatoirement confinées dans des pores de diamètre différents, 2-le calcul de r_c dépend de quatre grandeurs expérimentales ($\langle D_{eff} \rangle$, μ_m , r_f , et r) et de leurs incertitudes de mesure respectives (et de l'intervalle de temps sélectionné pour la détermination de D_{eff}), et 3-ce modèle utilise la taille moyenne des particules, ce qui peut poser question dans le cas de particules hautement polydisperses.

En dehors des méthodes de modélisation utilisées par l'équipe de Hanes, on peut citer le modèle d'étude des diffusions confinées, particulièrement utilisé pour étudier des mouvements intracellulaires de protéines (Saxton and Jacobson, 1997; Wagner et al., 2017). Avec ce modèle, les MSD sont modélisés pour estimer la taille de la zone dans laquelle la particule est confinée et le coefficient de diffusion à l'aide d'une seule équation :

$$MSD = r_c^2 \times (1 - A_1 \exp(-4A_2Dt/r_c^2))$$

dans laquelle r_c correspond au rayon de la zone de confinement, D au coefficient de diffusion, et les constantes A_1 et A_2 caractérisent la forme de la zone de confinement.

IV. Stratégies pour franchir la barrière mucoale

La fonction de barrière vis-à-vis d'agents exogènes, rôle principal du mucus (comme décrit dans la partie II.2.), se transforme en défi colossal pour les équipes cherchant à développer des particules thérapeutiques, en particulier lorsque celles-ci doivent atteindre les cellules épithéliales protégées par le biopolymère. De nombreuses stratégies ont été développées pour maximiser les chances des particules thérapeutiques de franchir la barrière mucoale. Ces stratégies seront décrites dans la partie qui suit et sont résumées sur la figure 21.

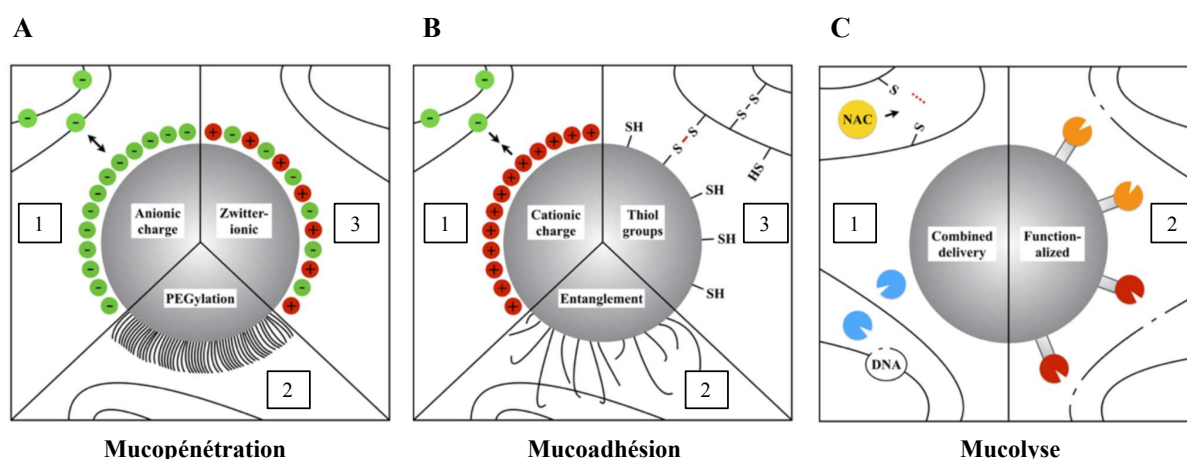


Figure 21. Stratégies développées pour vaincre la barrière du mucus (Murgia et al., 2018). **(A)** Pour favoriser la pénétration des particules dans le mucus, celles-ci peuvent A1-présenter une charge de surface négative, A2-être densément greffées de polymères hydrophiles comme le PEG ou A3-avoir une surface alternant des groupements chargés positivement et négativement, pour une charge de surface globalement neutre. **(B)** La mucoadhésion peut aussi permettre de vaincre la barrière du mucus, essentiellement dans l'intestin. Pour cela, contrairement à la mucopénétration, on peut exacerber l'interaction des particules avec le mucus en B1-favorisant les interactions électrostatiques en utilisant des particules de charge de surface positive B2-greffant de longs polymères sur la particule pour que ceux-ci s'enchevêtrent dans le réseau du mucus, ou B3-introduisant des fonctions thiols libres à la surface des particules pour former des ponts disulfures avec des cystéines des mucines. **(C)** Déstructurer le mucus est également un moyen d'améliorer la pénétration du mucus. Cette déstructuration peut être effectuée C1-par utilisation d'agents mucolytiques comme la NAC, apportés en amont ou en parallèle des particules ou C2-par des enzymes mucolytiques greffés sur la particule, ou d'autres composés mucolytiques incorporés dans la particule et libérés *in situ*.

IV.1. Limiter les interactions des particules avec le mucus

Si une charge de surface négative est considérée, pour une particule, comme une propriété de surface favorable à la traversée du mucus (cf. paragraphe 2.2.1) (figure 21A-1), d'autres modifications de surface ont été étudiées pour rendre les particules thérapeutiques encore moins adhérentes (ou plus « muco-inertes ») et obtenir une meilleure mucopénétration. Le greffage d'une molécule hydrophile à la surface de la particule est une méthode particulièrement utilisée pour masquer ses propriétés hydrophobes ou sa charge de surface (figure 21A-2). Depuis ses premières utilisations dans les années

1970, le PEG est le polymère hydrophile le plus utilisé dans ce but (Wu et al., 2018b). Il peut être adsorbé à la surface de la particule par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques ou hydrophobes, ou « greffé » par liaisons covalentes sur le cœur de la particule. Les études qui vantent les mérites du PEG sont particulièrement nombreuses et s'étendent à un nombre important de particules. Il a par exemple été montré qu'une décoration avec du PEG réduisait les interactions avec les mucines de particules à base de PAE (BAL de souris, Mastorakos et al., 2015), de PLL (expectorations de patients atteints de mucoviscidose, Suk et al., 2009), de PEI (mucine des glandes submandibulaires bovines, Nguyen et al., 2008), de polystyrène (PGM, Jia et al., 2021 ; expectorations de patients atteints de mucoviscidose et BAL murins, Schneider et al., 2017), de PLGA (expectorations de patients atteints de mucoviscidose et BAL murins, Schneider et al., 2017 ; PGM, Griffiths et al., 2015), de silice (PGM, Griffiths et al., 2015), mais aussi de peptides (expectorations de patients atteints de mucoviscidose et BAL de souris, Osman et al., 2018) et de polyplexes (BAL de souris, Uchida et al., 2012). Selon les techniques de mesure et les particules utilisées, il a été rapporté que l'ajout de PEG sur une particule permettait ainsi de multiplier sa vitesse de diffusion *in vitro* par un facteur de l'ordre d'un à quelques dizaines (expectorations de fumeurs sains ou BPCO, Chisholm et al., 2019 ; expectorations de patients atteints de mucoviscidose, Mastorakos et al., 2015; Osman et al., 2018; Schneider et al., 2017 ; mucus pulmonaire récupéré sur des tubes endotrachéaux, Schuster et al., 2013 ; mucus cervicovaginal humain, Cu and Saltzman, 2009), voire jusqu'à plusieurs milliers (mucus intestinal porcin, Abdulkarim et al., 2015 ; mucus cervicovaginal humain, Xu et al., 2015). Cette diffusion exacerbée est également observée dans les études *in vivo*, en particulier dans le poumon de souris, où les particules PEGylées ont une meilleure biodistribution, et/ou une meilleure efficacité de transfection, comparées à leurs analogues non PEGylées (particules de polystyrène ou de PLGA, Schneider et al., 2017 ; particules de PAE, Mastorakos et al., 2015 ; PEI et PLL, Nguyen et al., 2008; Suk et al., 2014 ; polyplexes, Uchida et al., 2012 ; peptides, Osman et al., 2018). On peut toutefois rappeler que si le PEG limite les interactions problématiques avec le mucus, il restreint aussi celles avec les membranes cellulaires et, donc, peut impacter en aval le taux d'internalisation cellulaire et l'efficacité de l'échappement endosomal (voir partie I.3.2.). Des études se sont concentrées sur l'importance de la longueur (masse moléculaire) de la chaîne de PEG utilisée et de la densité de son greffage. Wang *et al.*, en particulier, ont depuis plus de 10 ans fait prendre conscience de l'importance de ces deux paramètres pour la diffusion des particules dans le mucus (Wang et al., 2008). Ils ont en effet montré que lorsque 65-70% des fonctions carboxyliques de particules de polystyrène de 200 nm étaient greffées avec du PEG-2k ou du PEG-5k, celles-ci étaient environ 1000 fois moins ralenties dans le mucus cervicovaginal humain que les mêmes particules greffées avec du PEG-10k. De même, dans ce modèle de mucus, une baisse de 40% du *coating* en PEG-2k entraînait une réduction de plus de 700 fois de la vitesse de diffusion des particules de polystyrène carboxylées de 200 nm. Depuis, plusieurs études ont dressé des constats similaires avec d'autres techniques, d'autres particules et dans d'autres modèles de mucus (Boylan et al., 2012; Craparo et al., 2016; Griffiths et al., 2010; Osman et al., 2018; Xu et al., 2015), privilégiant presque systématiquement un *coating* dense pour

masquer efficacement la surface de la particule, mais un poids moléculaire du PEG faible pour éviter un enchevêtrement des chaînes de PEG avec les fibres de mucines (figure 21B-2). Parmi les nombreux autres polymères utilisés pour diminuer les interactions des particules avec le mucus, on peut citer un co-polymère tribloc, le PEG-PPO-PEG, aussi appelé poloxamère ou Pluronic[®], qui a été utilisé pour améliorer la diffusion de particules de PLGA dans le mucus cervicovaginal humain (Yang et al., 2011a) ou les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Schneider et al., 2017), ou encore celle de particules lipidiques dans le mucus de cellules Calu-3 ou d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Nafee et al., 2018).

Si la barrière du mucus peut être complètement infranchissable, il existe dans la nature des exemples d'agents exogènes qui traversent particulièrement bien cet obstacle. Certains virus, comme le papillomavirus humain et le virus de Norwalk, diffuseraient par exemple librement dans le mucus cervicovaginal humain (Olmsted et al., 2001). En cause dans cette performance, une petite taille (55 nm pour le papillomavirus et 38 nm pour le virus de Norwalk) et une surface constellée de groupements cationiques et anioniques (Pereira de Sousa et al., 2015a). En s'inspirant de cette seconde caractéristique, l'équipe de Bernkop-Schnürch a développé des particules innovantes pour la diffusion dans le mucus intestinal, alternant des charges positives et négatives à leur surface pour présenter une charge de surface globale proche de la neutralité (figure 21A-3), en mélangeant, par exemple, du chitosane et du sulfate de chondroïtine (Pereira de Sousa et al., 2015a), ou de l'acide polyacrylique et de la poly(allylamine) (Laffleur et al., 2014). De leur côté, Shan *et al.* ont choisi de mimer cette propriété des virus en utilisant des molécules zwitterioniques, *i.e.* électriquement neutres car composées d'un anion et d'un cation (Shan et al., 2016). Ils ont ainsi couvert la surface de particules à base d'acide polylactique avec de la dilauroylphosphatidylcholine, pour former des particules faiblement négatives et hydrophiles. Ces particules montraient alors une meilleure diffusion dans le mucus cervicovaginal humain et moins d'interaction avec la PGM que celles de PVA, pourtant elles aussi proches de la neutralité.

IV.2. Particules mucoadhésives

À l'inverse d'une particule muco-inerte, une particule mucoadhésive connaît des phénomènes d'adhésion importants avec le mucus (figure 21B). Le développement de particules mucoadhésives pour une diffusion augmentée dans le mucus peut sembler paradoxal. Pourtant, il s'agit d'un moyen astucieux de considérer le mucus comme une opportunité plutôt que comme un obstacle, en particulier pour les particules qui ne doivent pas directement accéder aux cellules épithéliales. L'adhérence au mucus peut en effet assurer à un objet transportant une molécule thérapeutique que cette dernière sera libérée dans le voisinage de l'épithélium couvert de mucus. La mucoadhésion est ainsi particulièrement intéressante dans l'intestin, dans lequel les particules doivent être en mesure de résider suffisamment longtemps (avant d'être éliminées par le transit), pour permettre la libération du principe actif. En revanche, cette

stratégie ne peut s'avérer efficace si la clairance de la couche de mucus est trop rapide, comme c'est le cas dans le tractus respiratoire. Le développement d'une particule mucoadhésive sera naturellement à l'exact opposé de celui de particules muco-inertes. Ainsi, dans ce contexte, un *coating* de la particule par une molécule de charge positive (figure 21B-1), comme le chitosane ou l'acide polyacrylique, présente un intérêt particulier, comme cela a été démontré dans l'intestin de rongeurs avec des particules lipidiques (Ramalingam et al., 2016) ou de PLGA (Kawashima et al., 2000). De la même manière, en raisonnant dans le sens inverse de ce qui a été montré dans la partie précédente, les longues chaînes de polymères (comme le PEG) greffées sur les particules peuvent leur permettre de s'accrocher et de s'entremêler dans les fibres de mucines (figure 21B-2).

Pour augmenter la mucoadhésion de particules, plusieurs stratégies de modification des particules se basent sur la présence de régions riches en cystéine dans les fibres de mucines (figure 21B-3). On sait en effet que, dans des conditions faiblement oxydantes, deux fonctions thiols auront tendance à réagir entre elles pour former un pont disulfure par le biais d'une liaison covalente. De plus, un pont disulfure peut se former entre le soufre d'une fonction thiol et un soufre déjà impliqué dans un pont disulfure. La fonction thiol d'une cystéine greffée à la surface d'une particule peut ainsi réagir avec un thiol libre d'une mucine ou interchanger sa place avec celle d'un atome de soufre impliqué dans un des nombreux ponts disulfures intra- ou inter-mucines : il en résulte un phénomène de mucoadhésion. L'équipe de Bernkop-Schnürch a particulièrement exploité ce phénomène. Laffleur *et al.* ont par exemple démontré l'efficacité de cette stratégie en mettant en évidence que des polymères anioniques à base d'alginate, de carboxyméthylcellulose ou d'acide hyaluronique avaient une mucoadhésion plus élevée avec la muqueuse buccale porcine lorsqu'ils étaient greffés avec des cystéines (Laffleur et al., 2017). De leur côté, Zhang *et al.* ont montré une meilleure persistance de leurs particules polymériques à base d'Eudragit-L100 greffées de cystéine dans l'intestin de rat (Zhang et al., 2012). Le phénomène de mucoadhésion a par la suite été confirmé par une augmentation plus importante de la viscoélasticité de la PGM après incubation avec ces particules greffées de cystéine comparées à celles non greffées (Zhang et al., 2015). Une autre modification de surface, également basée sur la présence de fonctions thiols dans les mucines, consiste à ajouter des motifs maléimides sur les particules. La formation d'une liaison C-S entre le maléimide et les mucines est un processus connu qui a été exploité, par exemple, par Liu *et al.* qui ont fusionné le maléimide sur une prodrogue anti-tumorale pour augmenter sa bioadhésion dans l'intestin (Liu et al., 2018).

IV.3. Agents mucolytiques

Les stratégies présentées dans les parties IV.1. et IV.2. consistent à adapter la structure des particules à celle du mucus pour limiter ou au contraire favoriser les interactions particules/mucus ; les objets conçus suivant cette stratégie sont dits « passifs » (Menzel and Bernkop-Schnürch, 2018). Dans le contexte de

la mucopénétration, tout un angle de réflexion n'a toutefois pas encore été présenté : celui des objets dits « actifs », en particulier les molécules mucolytiques (figure 21C). Dans l'ensemble des parties qui suivent, nous considérerons « mucolytique » toute molécule développée pour s'attaquer à la barrière du mucus et perturber sa structure tridimensionnelle, même si dans son sens le plus strict le terme mucolytique ne regroupe que les molécules réagissant avec les mucines par l'intermédiaire des fonctions thiols, en lysant des liaisons responsables de la structure 3D du biopolymère (Di Gioia et al., 2015).

La NAC, par exemple, est un agent dérivé de la cystéine qui rompt les ponts disulfures et peut être utilisé dans le traitement symptomatique de la BPCO ou de la mucoviscidose (Calverley et al., 2021). Les propriétés mucolytiques des agents comme la NAC découlent du fait qu'ils possèdent une fonction thiol libre. Comme dans les phénomènes de mucoadhésion vus plus haut (partie IV.2.), cette fonction thiol peut réagir avec les ponts disulfures qui réticulent les mucines, entraînant ainsi une ouverture des fibres de mucines. La NAC est de loin la molécule phare de l'action mucolytique par rupture des ponts disulfures, et son activité a été montrée dans de nombreux modèles de mucus : modèles à base de PGM (Charrier et al., 2014; Jia et al., 2021; Sheffner, 1963), mucus de cellules primaires HBE (Ahonen et al., 2019), mucus humain récupéré sur des tubes endotrachéaux (Vukosavljevic et al., 2017), expectorations de patients atteints de BPCO (Ehre et al., 2019) ou de mucoviscidose (Schuster et al., 2014; Sheffner, 1963; Suk et al., 2011b, 2011a; Yuan et al., 2015), et BAL de souris (Ehre et al., 2019). Dans le but de déterminer si la fragilisation du mucus mise en évidence *in vitro* entraîne effectivement une amélioration de l'efficacité de délivrance de particules de transfection *in vivo*, Suk *et al.* ont traité des souris hyperproductrices de mucus avec de la NAC pendant 30 minutes avant de les exposer à des polyplexes à base de PLL (Suk et al., 2011b). Ils ont alors observé que ce traitement permettait une expression du transgène en moyenne 12 fois plus importante que chez des souris non traitées, *i.e.* permettant d'avoir chez des souris hyperproductrices de mucus un niveau de transfection comparable à celui présent chez des souris saines (non prétraitées à la NAC). De leur côté, Ferrari *et al.* ont montré qu'un prétraitement à la NAC ou à la Nacystélyne (un sel de la NAC) donnait lieu à une efficacité de transfection par des lipoplexes et des polyplexes augmentée sur l'épithélium pulmonaire de mouton *ex vivo*, et de même avec la Nacystélyne *in vivo* dans le poumon de souris saines. Néanmoins, aucune amélioration significative de transfection apportée par un traitement avec la Nacystélyne n'était observée chez les souris présentant une anomalie du gène codant la CFTR (Ferrari et al., 2001). L'ensemble des 41 essais cliniques réalisés avec la NAC sur des patients atteints de pathologies respiratoires indique que celle-ci est bien tolérée par l'Homme, même aux doses les plus élevées testées (3000 mg/jour par voie orale et 700 mg/jour par voie respiratoire) (Calverley et al., 2021). Néanmoins, Ehre *et al.* ont observé que seuls 30% de la NAC administrée par voie respiratoire à des souris étaient encore retrouvés dans les BAL 15 minutes après son administration, et que les poumons des souris exposées à la NAC à une dose de 50 mg/kg présentaient un recrutement de neutrophiles et des signes de lésions épithéliales. Certaines études mettent aussi en doute l'efficacité de la NAC dans le traitement de

l'obstruction des bronches (Tam et al., 2013). Un certain nombre d'autres molécules analogues de la NAC ont prouvé leur activité mucolytique, en particulier le DTT (Ehre et al., 2019; Esther et al., 2019; Ramsey et al., 2016; Rohrer et al., 2016; Sheehan et al., 1995) et la TCEP (Morgan et al., 2021; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015). Le DTT montre même une activité mucolytique nettement supérieure à celle de la NAC à des concentrations en groupement thiols équivalentes (Ehre et al., 2019; Esther et al., 2019). En revanche, il est trop toxique pour que son utilisation clinique soit envisagée (Esther et al., 2019; Held and Biaglow, 1994).

Les autres agents mucolytiques, dont l'action ne repose pas sur l'ouverture des ponts disulfures, ont des cibles diverses. Les DNases, qui dégradent l'ADN, ont, comme la NAC, montré une capacité à déstructurer les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Duncan et al., 2016; Sanders et al., 2000; Suk et al., 2011b; Yuan et al., 2015). La dornase alfa (Pulmozyme®), une désoxyribonucléase recombinante humaine (rhDNase) qui dégrade l'ADN extracellulaire, particulièrement présent en cas d'infection, est d'ailleurs indiquée dans le traitement symptomatique de la mucoviscidose (Girón Moreno et al., 2021). Les protéases comme la papaïne, la bromélaïne et la pepsine quant à elles déstructurent le mucus en dégradant les protéines, comme les mucines (Müller et al., 2013).

En conclusion, la fragilisation du mucus en amont de l'exposition à des particules thérapeutiques (figure 21C-1) est un concept qui peut être séduisant de prime abord. Pour autant, des molécules qui allieraient une bonne efficacité mucolytique et une parfaite innocuité sont toujours recherchées. Pour nommer quelques essais de molécules, on peut citer le P3001 et le P2062, respectivement décrits par Ehre *et al.* en 2019 et Esther *et al.* en 2019, et le TDG, un galactose modifié porteur d'une fonction thiol, décrit par Yuan *et al.* en 2015 (Ehre et al., 2019; Esther et al., 2019; Yuan et al., 2015). Il faut également préciser que le concept de destruction généralisée du mucus pulmonaire par un prétraitement avec un agent mucolytique pourrait : 1-augmenter significativement la toxicité de molécules thérapeutiques administrées par la suite et 2-réduire la fenêtre d'activité thérapeutique en augmentant la vitesse de la clairance mucociliaire (Esther et al., 2019; Tomkiewicz et al., 1995). De ces problématiques est née une nouvelle idée d'utilisation du concept de mucolyse : le développement de particules « actives », porteuses de leur propre activité mucolytique (figure 21C-2), qui fera l'objet des deux prochaines parties. Comparée à la réalisation d'un prétraitement généralisé des voies respiratoires avec un agent mucolytique en amont de l'exposition à des particules thérapeutiques, un traitement avec des particules thérapeutiques mucolytiques permet de s'affranchir d'une étape d'administration. De plus, le fait que l'activité mucolytique se déclenche uniquement aux points de contact des particules avec le mucus permet d'éviter une dégradation du mucus dans tout l'arbre respiratoire, et ainsi 1-de limiter les problèmes de toxicité, 2-de réduire l'effet sur la clairance mucociliaire, et 3-de limiter les concentrations en agents mucolytiques administrés (Menzel and Bernkop-Schnürch, 2018). Ce dernier point est important car certaines études suggèrent qu'une réduction trop importante des propriétés

macrorhéologiques du mucus pourrait en réalité ralentir la diffusion des particules (Sanders et al., 2002b).

IV.4. Particules décorées par des enzymes mucolytiques

Les vecteurs décorés par des enzymes mucolytiques (MECS) sont des systèmes particulièrement développés par l'équipe de Bernkop-Schnürch pour l'administration par voie orale. Les enzymes mucolytiques utilisées par ce groupe sont des protéases, *i.e.* des enzymes capables de couper des liaisons peptidiques au sein des protéines. En 2013, Müller *et al.* ont évalué l'efficacité mucolytique de plusieurs protéases (papaïne, bromélaïne, trypsine, chymotrypsine, pepsine et protéinase) sur le mucus intestinal de porc à différents pH. Ces protéases diminuaient toutes la viscosité du mucus, mais les activités de la papaïne et de la protéinase étaient les plus importantes et les seules à être stables sur la gamme de pH testée (Müller et al., 2013). À partir de cette étude, l'équipe autrichienne a généré des systèmes mucolytiques (particules de PAA ou SEDDS (*Self-emulsifying Drug Delivery System*, qui forment des gouttelettes lipidiques)) avec les deux enzymes au meilleur potentiel (Lam et al., 2021; Müller et al., 2013). Ils ont également utilisé la bromélaïne, moins impliquée dans les allergies professionnelles que la papaïne et bien tolérée dans les essais cliniques (sur des particules de PAA, Pereira de Sousa et al., 2015b). De manière intéressante, une activité mucolytique était également observable pour des MECS à l'état de microparticules (diamètres d'environ 2-3 μm) avec la papaïne ou la bromélaïne, et elle conférait même à ces systèmes une capacité à pénétrer du mucus intestinal porcin *in vitro* et une rétention augmentée dans l'intestin de rat *in vivo* (Mahmood et al., 2017). On peut aussi noter que cette équipe a généré des particules de PAA innovantes greffées à la fois de papaïne et de cystéine, pour leur permettre de s'enfoncer dans le mucus grâce à l'activité mucolytique de la papaïne puis de s'accrocher aux fibres de mucines *via* les fonctions thiols des cystéines (Köllner et al., 2015). Ce système est particulièrement ingénieux dans les intestins dans lesquels, contrairement aux poumons, c'est la couche supérieure du mucus qui est renouvelée la plus rapidement (comme mentionné dans la partie II.1.2.). Ces particules combinaient ainsi les deux propriétés, même si la présence de cystéine ou de papaïne réduisait respectivement le potentiel mucolytique et la mucoadhésivité du système complet.

De leur côté, Deacon *et al.* ont cherché à augmenter le pouvoir antibactérien de particules polymériques d'alginate et de chitosane vectorisant un antibiotique, la tobramycine, dans le contexte de la mucoviscidose (Deacon et al., 2015). En fonctionnalisant les particules avec la dornase alfa (DNase), ils ont observé une meilleure pénétration de ces particules dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Néanmoins, celle-ci ne s'accompagnait pas réellement d'une amélioration de l'activité antibiotique des particules contre *Pseudomonas aeruginosa* colonisant les expectorations.

Enfin, il faut préciser que le choix de l'enzyme utilisée pour fonctionnaliser une particule dépend de plusieurs facteurs, comme la facilité de son incorporation aux particules, son activité en fonction du

pH, ses sites de clivage, ses autres activités enzymatiques et sa biocompatibilité. Par exemple, on peut noter que si la trypsine et la chymotrypsine ont été délaissées par l'équipe autrichienne du fait que leur activité n'était pas optimale à pH faible (Menzel and Bernkop-Schnürch, 2018; Müller et al., 2013), ces enzymes pourraient être considérées pour une délivrance par voie pulmonaire, le mucus y étant moins acide que dans les intestins. De plus, la papaïne et la trypsine sont également impliquées dans l'ouverture des jonctions serrées et seraient donc plus appropriées à la vectorisation de molécules devant aussi traverser la barrière épithéliale (Menzel and Bernkop-Schnürch, 2018).

IV.5. Autres particules mucolytiques

En dépit du fait que l'on sait désormais que le mucus est à l'origine de l'échec de la plupart des traitements développés pour des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose, en dehors des MECS, développés principalement par l'équipe de Bernkop-Schnürch, seules quelques études isolées ont exploré le concept de particules à activité mucolytique intrinsèque, et à notre connaissance aucune ne concerne des particules de transfection.

Rohrer *et al.* ont incorporé des composés porteurs d'une fonction thiol (*N*-dodécylamine-(4-mercaptobutyl)amidine ou TBA-D, 2-mercapto-*N*-octylacétamide ou TGA-O, et NAC) dans des SEDDS pour leur conférer la capacité de perturber le réseau formé par les mucines (Rohrer et al., 2016). Les composés thiolés pouvaient entraîner une diminution de plus de 60% de la viscosité du mucus intestinal porcin et y diffusaient en moyenne 4 (TGA-O), 19 (NAC) ou 66 (TBA-D) fois plus rapidement que les SEDDS sans composés thiols. Dans la même idée, Ahonen *et al.* ont généré des particules d'alginate libérant du monoxyde d'azote (NO), une molécule ayant des propriétés antibactériennes (Ahonen et al., 2019). Ces particules étaient capables de réduire la viscoélasticité du mucus de cellules primaires HBE, bien que le mécanisme de déstabilisation du mucus par le NO soit encore inconnu. Selon les auteurs, ces particules pourraient avoir un intérêt dans le traitement d'infections respiratoires chroniques, mais on pourrait aussi imaginer que ce système puisse avoir un potentiel dans la vectorisation de principes actifs.

Objectifs de la thèse

Au cours de cette partie introductive, nous avons entrevu le potentiel de la thérapie génique dans le traitement des maladies, en nous concentrant particulièrement sur certaines pathologies respiratoires, parmi lesquelles la cible la plus connue est la mucoviscidose. Aujourd'hui, une grande diversité de particules de transfection, combinant un acide nucléique thérapeutique et un vecteur, sont conçues et évaluées dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* et au travers d'essais cliniques. Dans notre équipe, nous développons des lipides monocationiques biolabiles dérivés d'un phospholipide endogène, la DOPC (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine), comme vecteurs non viraux. Ces lipides ont montré un potentiel de transfection intéressant *in vitro* et dans le poumon de la souris normale, avec *in vivo* une efficacité supérieure à celle du GL67A (Pierrat et al., 2016a). Cependant, comme mentionné dans la partie I.4., les lipoplexes à base de GL67A administrés par voie inhalée ont induit une amélioration très limitée des critères cliniques de patients atteints de mucoviscidose (Alton et al., 2015). Le GL67A n'est qu'un exemple parmi les vecteurs testés dans les plus de 2000 essais cliniques de thérapie génique réalisés à ce jour qui se sont soldés soit par une nocuité, soit par un manque d'efficacité (Ginn et al., 2018).

Dans les voies respiratoires, et en particulier en conditions pathologiques, l'une des grandes difficultés, parfois sous-estimée, qui s'ajoute à toutes celles qui sont inhérentes à la transfection, réside dans le fait que le tissu épithélial pulmonaire est recouvert de mucus. Pour appréhender l'impact de cette barrière biologique naturelle le plus fidèlement possible en amont des essais cliniques, de nombreuses techniques et modèles cellulaires et acellulaires ont été décrits. Ensemble, ils permettent jour après jour de mieux comprendre l'effet barrière du mucus, et les équipes de recherche à travers le monde s'orientent désormais vers la conception de particules qui auraient de meilleures chances de diffuser dans le mucus. Parmi les stratégies innovantes étudiées, on trouve celle qui consiste à déstructurer le mucus, notamment en conférant un pouvoir mucolytique à la particule. Pourtant, le nombre de particules utilisant ce mode d'action reste pour l'heure très limité, et à notre connaissance, aucune particule portant à la fois une activité mucolytique intrinsèque et la capacité de délivrer de l'acide nucléique n'a encore été décrite.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet LuTher, qui fait l'objet de ma thèse, et qui vise à améliorer les performances de transfection des vecteurs lipidiques monocationiques développés dans notre équipe en leur conférant des propriétés mucolytiques afin qu'ils puissent mieux diffuser dans le mucus pulmonaire. Les travaux effectués dans le cadre de ce projet sont présentés, ci-après, sous la forme de trois parties. La première recense les matériels et méthodes utilisés. Dans la seconde, les résultats du travail expérimental qui a été mené sont présentés. Enfin, la dernière partie a pour objectif la discussion des résultats et leur conclusion.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Synthèse des composés

La synthèse et la purification de l'ensemble des lipides cationiques oxygénés (iC3, C4, C8, C12, C12', Suc12), des lipides cationiques monosoufrés (TiC3, TC4, TC8, TC12, TC12', TSuc12), et des lipides *helper* polysoufrés (S3, S7) sous forme de solides cireux ont été entièrement conduites par les chimistes de l'équipe V-SAT. Les lipides cationiques monosoufrés et oxygénés ont été synthétisés à partir de la DOPC (Lipoid GmbH, Allemagne). Les lipides polysoufrés ont été élaborés en conjuguant un acide gras et un poly(thioester) de faible poids moléculaire, ce dernier étant lui-même préparé à partir de l'acide thioglycolique. Pour garantir leur stabilité, les lipides ont été conservés dans une atmosphère saturée en argon dans des piluliers en verre, à 4 °C.

II. Préparation des lipoplexes

II.1. Lipoplexes à base de lipides oxygénés ou monosoufrés, préparés à partir d'un film

Une quantité de lipide cationique oxygéné ou monosoufré dans un volume approprié d'éthanol (dépendant du rapport N/P, soit 9,70 nmol dans le cas d'un rapport N/P de 4, par exemple) a été déposée au fond d'un tube de 1,5 mL en polypropylène, à fond conique (Eppendorf). Dans certaines expériences, les lipides monosoufrés ont été mélangés avec leurs analogues oxygénés, dans des proportions relatives de 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 et 100/0%. Si nécessaire, les lipides *helper* polysoufrés (de 1 à 3 équivalents par rapport à la concentration molaire en lipide cationique), la DOPE (à 1 équivalent par rapport à la concentration molaire en lipide cationique, Avanti Polar Lipids, Alabaster, États-Unis) ou la rhodamine-PE (à 1% de la concentration molaire en lipide cationique, Avanti Polar Lipids), eux aussi repris dans l'éthanol, ont également été déposés au fond du tube. L'éthanol a ensuite été évaporé sous-vide pendant 1 h à l'aide d'un évaporateur Speedvac. L'ADN (plasmide pCMV-Gluc codant pour la luciférase *Gaussia*, 5,8 kpb, Nanolight Technology, Pinetop, États-Unis) en solution (40 µL à 0,02 µg/µL dans du glucose à 5%, correspondant à 2,42 nmol de phosphate) a ensuite été ajouté sur le film lipidique, puis le tube a été agité pendant 20 secondes au vortex à puissance maximale. Les formulations ont été utilisées après 30 min d'incubation à température ambiante.

II.2. Lipoplexes à base de lipides oxygénés ou monosoufrés, préparés par injection

Une quantité de lipide cationique oxygéné ou monosoufré dans un volume approprié d'éthanol a été déposée au fond d'un tube de 1,5 mL en polypropylène, à fond conique. Si nécessaire, les lipides *helper* polysoufrés (de 1 à 3 équivalents par rapport à la concentration molaire en lipide cationique) ou la rhodamine-PE (à 1% de la concentration molaire en lipide cationique), eux aussi repris dans l'éthanol,

ont également été déposés au fond du tube. Du glucose à 5% a été ajouté pour former des liposomes et de sorte à ce que la proportion en éthanol n'excède pas 20% (afin de limiter la concentration finale d'éthanol à 1% lors des expériences de transfection). L'ADN plasmidique en solution (0,04 µg/µL dans du glucose 5%) a ensuite été ajouté lentement, volume à volume, à la solution de liposomes, sans homogénéisation. Les formulations ont été utilisées après 30 min d'incubation à température ambiante.

II.3. Lipoplexes à base de lipofectamine

Les complexes ADN/lipofectamine (lipofectamine[®] 2000, Invitrogen) ont été préparés selon les recommandations du fournisseur. En bref, l'ADN plasmidique et la lipofectamine ont été dilués aux concentrations appropriées dans du milieu Opti-MEM[®]. L'ADN a ensuite été ajouté volume à volume à la lipofectamine, et, après 3 secondes de vortex, le mélange a été incubé pendant 5 min avant utilisation.

III. Caractérisation des formulations

III.1. Complexation de l'ADN

La complexation de l'ADN par les lipides a été étudiée par un test de retard de migration sur gel d'agarose. Les lipoplexes ont été préparés à différents rapports N/P (de 0,8 à 14) selon la méthode décrite ci-dessus. Un tampon de chargement (Invitrogen) a été ajouté aux échantillons, et chacun d'entre eux a été déposé dans un puits d'un gel d'agarose, préparé à 1% dans du tampon TAE (40 mM de Tris base, 20 mM d'acide acétique, 1 mM d'EDTA). De l'ADN seul (0,8 µg) additionné de tampon de chargement a été déposé dans un puits en tant que contrôle. Le gel a ensuite été soumis à un champ électrique de 80 V, dans du tampon TAE, pendant 50 min, puis plongé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) (Qbiogene) à 0,5 µg/mL pendant 15 min avant d'être lavé dans un bain d'eau ultrapure. L'ADN libre, marqué par le BET, a été révélé par excitation à 312 nm à l'aide d'un imageur (Amersham Imager, GE Healthcare).

III.2. Détermination de la taille, de la charge et de la concentration en particules

- Taille

La taille des lipoplexes a été déterminée par la mesure de leur diamètre, par la technique de DLS à l'aide d'un Zetasizer[®] nano-ZS (Malvern Instruments, Palaiseau, France) et, en parallèle, par analyse du suivi individuel des particules (ou *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) à l'aide de l'instrument Zetaview[®] (Particle Metrix GmbH, Inning, Allemagne). La mesure par DLS a été effectuée à 25 °C sur les formulations diluées au 1/10 dans du glucose 5%, avec un angle de dispersion de 173°. La cinétique et l'amplitude de fluctuation de l'intensité mesurées, dépendant de la taille des particules, ont été utilisées

pour extraire, à l'aide d'une analyse statistique de la fonction d'autocorrélation, une distribution de la taille des particules. Le *Z-average* et l'indice de polydispersité (Pdl) ont été calculés à partir des données d'intensité obtenues. Les résultats de la distribution en intensité ont aussi été convertis pour établir une distribution de la taille en fonction du volume ou en fonction du nombre, et ainsi décrire la proportion relative des différents constituants de l'échantillon en fonction de leur volume ou de leur nombre en présence de plusieurs modes ou pics. Pour le NTA, des vidéos de 8 secondes ont été enregistrées à température ambiante avec une cadence de 3,75 images par seconde (pour les formulations obtenues à partir d'un film) ou de 1 seconde à une cadence de 30 images par seconde (pour les formulations par injection), conformément aux recommandations du fournisseur en accord avec les tailles mesurées par DLS. Suivant ces recommandations, les formulations ont été diluées dans du glucose 5% de sorte à ce que chaque image contienne de 50 à 200 particules. Le logiciel Zetaview® a déterminé la trajectoire de chaque particule individualisée, puis a utilisé cette trajectoire pour calculer son diamètre, pour enfin déterminer le diamètre moyen des particules dans la formulation ainsi que le *span*, un indice de dispersité. Pour mesurer le diamètre des particules fluorescentes, illuminées avec un laser à 520 nm, un filtre de fluorescence bloquant les longueurs d'onde inférieures à 550 nm (inséré entre l'échantillon et le détecteur) a été utilisé. Les résultats du *Z-average* et du diamètre moyen ont été exprimés en nm, les résultats du Pdl et du *span* restant sans unité.

- Charge

La charge des lipoplexes a été évaluée par la mesure de leur potentiel zêta. Le potentiel zêta décrit la charge électrique de surface d'une particule et du nuage d'ions qui l'entoure quand elle est en suspension ou en solution. Il a été déterminé par l'appareil Zetasizer®, à la suite des mesures de taille, par vélocimétrie laser. Le logiciel fourni avec l'appareil utilise l'approximation de Smoluchowski pour calculer le potentiel zêta à partir de la mobilité électrophorétique des particules. Les résultats du potentiel zêta ont été exprimés en mV.

- Concentration

La technique de NTA a permis de déterminer la concentration en particules des formulations. Le logiciel Zetaview® calcule cette concentration à partir du nombre de particules identifiées sur les vidéos et du facteur de dilution. La concentration a été exprimée en nombre de particules par mL.

IV. Culture cellulaire

Sauf indication contraire, les milieux et réactifs de culture cellulaire provenaient de chez GIBCO-BRL (Cergy-Pontoise, France). Les cellules A549 (CCL-185, ATCC-LGC, Molsheim, France), Calu-3 (HTB-55, ATCC-LGC) et 16HBE14o- (16HBE, données par le Dr D. Gruenert, *California Pacific Medical Center Research Institute*, San Francisco, États-Unis) ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM/F12 complet, *i.e.* contenant 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 100 U/mL de pénicilline,

100 µg/mL de streptomycine, 5 mM d'HEPES et 2 mM de L-Glutamine. Les cellules NCI-H292 (CRL-1848, ATCC-LGC) ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI-1640 complet, *i.e.* supplémenté avec 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 10 mM d'HEPES, 1 mM de pyruvate de sodium et 2 mM de L-Glutamine. Les cultures ont été maintenues dans des flacons de culture de 75 cm², dans un incubateur à 37 °C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. À 80-100% de confluence, les cellules ont été détachées du support par un traitement avec un mélange trypsine-EDTA (à 0,05% dans du PBS), puis transférées dans de nouveaux flacons pour maintenir la culture, ou ensemencées pour les expériences dans des plaques, ou dans des inserts de culture en tétrahydrofur de polyéthylène avec des pores de 0,4 µm de diamètre. Les cellules Calu-3, NCI-H292, 16HBE et A549 ont respectivement été utilisées à des passages allant de 26 à 38, de 10 à 37, de 54 à 62, et de 84 à 101.

Pour les expériences, les cellules Calu-3 et NCI-H292 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de $1,0 \times 10^5$ et $3,0 \times 10^4$ cellules/puits (100 µL), respectivement. Les cellules Calu-3 ont été ensemencées sur des inserts 24 puits à une densité de $1,5 \times 10^5$ cellules/insert (400 µL), ou sur des inserts 6 puits à une densité de $2,1 \times 10^6$ cellules/insert (2,5 mL). Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules Calu-3 ont également été cultivées dans des plaques 24 puits après un ensemencement à une densité de 800 000 cellules/puits (500 µL). Les cellules NCI-H292, 16HBE et A549 ont été ensemencées dans des inserts 24 puits à une densité de $1,0 \times 10^5$, $1,1 \times 10^5$ et 6×10^4 cellules/insert (400 µL), respectivement. Le milieu de culture ajouté dans les compartiments apical et basolatéral des inserts a été remplacé 3 fois par semaine, jusqu'à ce que les cellules soient à confluence. Le milieu apical a alors été retiré afin de cultiver les cellules en ALI pendant 3, 7 ou 14 jours, le milieu dans le compartiment basolatéral étant toujours remplacé 3 fois par semaine. Dans certaines expériences, les cellules Calu-3 ont été cultivées en LLI, le milieu dans le compartiment apical étant dans ce cas lui aussi remplacé 3 fois par semaine.

IV.1. Induction de la production de mucus par les cellules NCI-H292 cultivées en plaque (modèle 2D)

Les cellules NCI-H292 ont été ensemencées en plaque 96 puits comme décrit ci-dessus et cultivées pendant 72 h, jusqu'à la confluence. Le milieu de culture complet a ensuite été remplacé par du milieu de culture sans sérum. Après 24 h de privation en sérum, la production de mucus a été induite en exposant les cellules à l'EGF (25 ng/mL dans du milieu de culture sans sérum, Sigma-Aldrich) et/ou à un extrait allergénique d'acariens *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1 à 1 µg/mL dans du milieu de culture sans sérum, Greer Laboratories, Worcester, États-Unis) pendant 24 h. Des cellules exposées à du milieu de culture sans sérum ont servi de contrôle (cellules non traitées). Au terme des 24 h d'exposition, les cultures ont été utilisées pour des expériences de transfection ou le mucus produit a été récupéré pour des dosages (*vide infra*).

IV.2. Induction de la production de mucus par les cellules Calu-3 cultivées sur inserts (modèle 3D)

Afin de moduler la production de mucus par les cellules Calu-3, ces cellules ont été cultivées sur inserts 6 ou 24 puits en ALI pendant 3, 7 ou 14 jours comme décrit ci-dessus. Les cultures ont ensuite été utilisées pour des expériences de transfection, ou pour le prélèvement du mucus produit afin de réaliser différents dosages, des mesures de rhéologie, ou des mesures de diffusion par MPT, comme détaillé ci-dessous.

IV.3. Expériences de transfection

Les expériences de transfection ont été réalisées sur les modèles de culture 2D, sur les modèles de culture 3D (sans ou avec retrait du mucus), ou sur les cellules cultivées sur inserts en LLI. Dans les modèles de culture en 2D, 10 μ L de lipoplexes fraîchement préparés ont été déposés dans le surnageant des cellules cultivées en plaque. Dans les modèles 3D sans retrait du mucus, 100 μ L de milieu de culture complet ont été déposés dans le compartiment apical juste avant l'ajout de 10 μ L de lipoplexes. Dans les modèles 3D avec retrait de mucus, après 14 jours de culture en ALI, 100 μ L de milieu de culture complet ont été déposés dans le compartiment apical des inserts. Le lendemain, le milieu (contenant le mucus) a été retiré par aspiration et remplacé par 100 μ L de milieu de culture complet frais, avant ajout des lipoplexes (10 μ L). Pour les cellules cultivées en LLI, le milieu dans le compartiment apical de l'insert (400 μ L) a été remplacé par 100 μ L de milieu de culture frais, avant ajout des lipoplexes (10 μ L). Certaines expériences de transfection sur inserts ont également été effectuées en présence de NAC (Alfa Aesar, Bismarck, France). Dans les inserts concernés, 10 μ L de NAC ont été ajoutés juste avant l'ajout des lipoplexes. La concentration finale de NAC était de 463 μ M, correspondant à la concentration en soufre en cas d'hydrolyse totale de 3 équivalents de lipide polysoufré S7 dans des formulations au rapport N/P de 4. Dans tous les cas, la quantité d'ADN déposée par puits ou par insert était de 0,2 μ g. Les cellules exposées à un volume équivalent de solution de glucose à 5% ont été pris comme contrôles négatifs. Dans les modèles 2D, les modèles 3D avec retrait de mucus, et les cultures sur inserts en LLI, l'efficacité de transfection a été évaluée 24 h après exposition. Dans les modèles 3D, elle a été mesurée 24, 48 ou 72 h après la transfection et dans certaines expériences, les lipoplexes ont été retirés 4 ou 24 h après le début de l'exposition. Pour cela, le milieu de culture contenant les lipoplexes a été aspiré et remplacé par du milieu de culture complet. L'activité de transfection a été évaluée en mesurant l'activité de la luciférase *Gaussia* dans le surnageant des cultures. Pour cela, le substrat de l'enzyme (coelentérazine, Nanolight Technology) à 1,5 μ M a été ajouté à un aliquot de surnageant, et la production de lumière évaluée sur 1 seconde par luminométrie (Varioskan Lux, Thermo Scientific). Dans toutes ces expériences, chaque condition a été testée en duplicats ou en triplicats, et les intensités de luminescence (exprimées en RLU/puits ou RLU/insert) ont été rapportées au signal de luminescence basal mesuré dans les cellules non exposées aux lipoplexes (contrôle négatif).

IV.4. Mesure de la viabilité et de la nécrose cellulaires

Une mesure de l'activité mitochondriale des cellules (test colorimétrique au MTT) a été systématiquement effectuée en parallèle des expériences de transfection pour évaluer la viabilité cellulaire. Pour cela, à la fin de l'expérience de transfection, le surnageant cellulaire a été retiré puis remplacé par 100 μ L de MTT (Sigma-Aldrich) à 1 mg/mL dans du milieu de culture complet. Après 1 h d'incubation à 37 °C, le MTT a été retiré et remplacé par 100 μ L de DMSO pour lyser les cellules et dissoudre le MTT réduit par l'activité mitochondriale. L'absorbance des lysats cellulaires a été ensuite mesurée par spectrophotométrie à 570 nm avec une correction à 690 nm (Varioskan Lux). La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de l'absorbance mesurée dans les cellules non exposées aux lipoplexes (contrôle négatif).

De plus, dans les modèles 3D, une mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), dont la présence dans le surnageant témoigne de phénomènes de mort cellulaire par nécrose, a été réalisée sur un aliquot de surnageant cellulaire. Pour cela, un kit commercial a été utilisé, selon les recommandations du fournisseur (Roche), et l'activité de la LDH a été déterminée *in fine* par mesure de l'absorbance des échantillons à 492 nm avec une correction à 690 nm (Varioskan Lux). Le pourcentage de nécrose induite dans chaque échantillon a été déterminé en comparant l'absorbance de l'échantillon à celles d'une condition à 100% de nécrose induite (cellules lysées à l'aide d'un tampon de lyse fourni avec le kit) et d'une condition à 0% de nécrose induite (cellules non exposées).

IV.5. Mesure de l'internalisation des lipoplexes

L'internalisation des lipoplexes a été étudiée par cytométrie en flux dans les modèles 2D (plaques 24 puits, pour avoir un nombre représentatif d'événements) et 3D obtenus avec les cellules Calu-3. Pour cela, les lipoplexes ont été préparés avec de l'ADN plasmidique marqué au Cy5 par les chimistes de l'équipe. L'exposition aux lipoplexes a été réalisée suivant la procédure de transfection décrite dans la partie IV.3. Vingt-quatre heures après l'exposition, les cellules ont été détachées du support en les incubant avec une solution de trypsine/EDTA à 5X (0,25% dans du PBS), pendant 12 (modèle 2D) ou 20 min (modèle 3D) à 37 °C. L'action de la trypsine a été interrompue par un ajout de milieu de culture complet, et la suspension cellulaire centrifugée pendant 5 min à 200 g. Le surnageant cellulaire a été aspiré et remplacé par 500 μ L de milieu de culture contenant 1% de FBS. La fluorescence des différents échantillons cellulaires ainsi obtenus a été mesurée à l'aide d'un cytomètre LSRFortessa X-20TM (BD Biosciences) piloté par le logiciel FACSDivaTM (BD Biosciences). Les échantillons ont été excités à l'aide d'un laser à 633 nm et le signal émis a été détecté entre 650 et 670 nm. Dans chaque expérience, les données ont été collectées sur un minimum de 20 000 événements par condition. L'analyse des résultats a été effectuée avec le logiciel FlowJo (version 10.2, Ashland, États-Unis). Les événements de

très petite taille ou de très haute granulosité (débris, identifiés sur un cytogramme FSC-A/SSC-A), ainsi que les multiplets de cellules (identifiés sur un cytogramme FSC-H/SSC-W), ont été exclus de l'analyse.

V. Récupération du mucus produit par les cellules en culture

Les échantillons de mucus des modèles 2D (Calu-3 et NCI-H292) et 3D (Calu-3) et des cultures sur inserts en LLI (Calu-3) ont été collectés pour des expériences de rhéologie ou de MPT ou pour des dosages de mucines. Dans les modèles 2D, le surnageant cellulaire a été collecté 24 h après l'ensemencement des cellules (Calu-3) ou au terme de l'induction de la production de mucus par l'EGF ou les allergènes (NCI-H292). Dans les modèles 3D, 100 μ L (inserts 24 puits) ou 1 mL (inserts 6 puits) de milieu de culture complet ont été déposés dans le compartiment apical de l'insert, puis repris 24 h plus tard par aspiration lente à la micropipette. Dans les cultures sur inserts en LLI (Calu-3), le surnageant cellulaire a été collecté après 14 jours de culture. Les échantillons ainsi obtenus ont été soit utilisés extemporanément pour les analyses de MPT ou de rhéologie, soit centrifugés pendant 5 min à 3000 g pour éliminer les débris cellulaires, puis stockés à -20°C pour le dosage des mucines.

VI. Caractérisation du mucus cellulaire

VI.1. Dosage de MUC5AC

La protéine MUC5AC a été dosée dans les échantillons de mucus par ELISA. Après décongélation, les échantillons ont été distribués dans les puits d'une plaque de titration (Maxisorp Nunc immuno plate, Thermo Scientific), puis incubés pendant une nuit à 40°C . La plaque a ensuite été lavée 3 fois avec un tampon PBST (PBS contenant 0,05% de tween[®] 20), puis bloquée pendant 1 h à température ambiante avec une solution contenant 2% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich) diluée dans du PBS. Les puits ont été à nouveau lavés 3 fois, puis exposés pendant 2 h à un anticorps (IgG1) monoclonal de souris spécifique de la mucine MUC5AC humaine (Abcam, $d = 1/200$). Après 3 lavages, les puits ont été incubés pendant 1 h avec un anticorps polyclonal de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les IgG de souris (Jackson ImmunoResearch, $d = 1/5000$). Enfin, après une dernière série de lavages, le TMB (Sigma-Aldrich), substrat de la peroxydase, a été ajouté à chaque puits. La réaction enzymatique a été arrêtée par ajout de H_2SO_4 (0,5 N) et l'absorbance mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Varioskan Lux). Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

VI.2. Dosage des mucines totales

La quantité relative de mucines totales présentes dans les échantillons de mucus issus des modèles 2D (NCI-H292 et Calu-3) a été déterminée à l'aide d'un test ELLA (*Enzyme Linked Lectin Assay*), en utilisant la lectine WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) comme décrit précédemment (Chen et al., 2011). Les surnageants des cellules (cultivées en absence de FBS, car celui-ci interfère avec le dosage) ont été déposés dans les puits d'une plaque 96 puits (Maxisorp Nunc immuno plate) et incubés pendant 2 h à 37 °C. La plaque a ensuite été lavée 3 fois avec un tampon PBST (PBS contenant 0,05% de tween 20) et bloquée pendant 1 h à 37 °C avec une solution de BSA (1% dans du PBST). Les puits ont ensuite été lavés 3 fois et exposés à la WGA couplée à la peroxydase (1 µg/mL dans le PBST, Sigma-Aldrich) pendant 1 h à 37 °C. Après une nouvelle étape de lavage au PBST, le TMB, substrat de la peroxydase, a été ajouté à chaque puits. La réaction enzymatique a été arrêtée par ajout de H₂SO₄ (0,5 N) et l'absorbance des échantillons a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Varioskan Lux). Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

VI.3. Observation du mucus en microscopie confocale

Le mucus produit par les modèles 3D a été observé par microscopie confocale à balayage laser à l'aide d'un marquage des mucines par la lectine WGA couplée à un fluorophore. Le jour de l'observation, la culture a été doucement lavée avec du PBS, puis de la WGA conjuguée à l'Alexa-647® (100 µL à 5 µg/mL dans du PBS, Molecular Probes) a été ajoutée sur les cellules. Après 10 min d'incubation à 37 °C, la solution de WGA a été retirée et les cellules doucement lavées avec du PBS, puis la membrane de l'insert a été découpée, déposée sur une lame de microscope, puis recouverte d'une lamelle à l'aide d'une solution de montage aqueuse permanente (Bio-Rad). Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à balayage Leica SP2 (Leica) équipé d'une lentille 63 × à immersion en huile, après une excitation à 635 nm et une détection entre 650 et 735 nm (ouverture numérique = 1,4). Les acquisitions d'images ont été effectuées tous les 0,8 µm de profondeur (z), de la surface de la couche de mucus (définie comme z = 0) à 40 µm de profondeur, chaque acquisition correspondant à la moyenne de deux prises. Pour pouvoir observer l'échantillon sur toute son épaisseur, la puissance du laser a été paramétrée de sorte à augmenter progressivement avec la profondeur. Les mêmes réglages ont été conservés pour l'ensemble des conditions. Des représentations 3D ont été reconstruites à partir de la pile d'images à l'aide du logiciel Fiji et du plug-in 3D Viewer.

VI.4. Mesure des propriétés rhéologiques du mucus

Les propriétés rhéologiques des échantillons de mucus prélevés sur les cellules Calu-3 cultivées pendant 7 ou 14 jours en ALI ont été mesurées à l'aide d'un rhéomètre oscillatoire Haake Mars 60 (Thermo

Electron, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une géométrie plan/plan de 25 mm de diamètre. La température de la plaque Peltier a été maintenue à 37 °C pendant 2 min avant le dépôt de l'échantillon (180 µL). Une fois l'échantillon déposé, le plateau (rotor) a été rapproché de l'échantillon jusqu'à un entrefer de 0,3 mm, puis, après une nouvelle période d'équilibrage de 2 min à 37 °C, les mesures ont été effectuées à cette même température. Le domaine de viscoélasticité linéaire a été déterminé en effectuant un balayage en contrainte de déformation ($\gamma = 0,0001 - 10$), à une fréquence (ω) de 1 Hz (6,28 rad/s). Le module de stockage (G'), le module de perte (G'') et l'angle de phase (δ) ont été mesurés à différentes fréquences, allant de 0,1 à 17,8 Hz, dans le domaine viscoélastique linéaire ($\gamma = 0,01$). L'angle de phase δ a été calculé à partir de G' et G'' ($\tan(\delta) = G''(\omega)/G'(\omega)$) à une fréquence de 1 Hz. Les mesures ont été effectuées sur 3 échantillons de mucus indépendants.

VII. Interaction des lipoplexes avec le mucus

VII.1. Stabilité des lipoplexes dans le mucus

Le test de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose a été utilisé pour évaluer la stabilité des lipoplexes dans le mucus. Les lipoplexes fraîchement préparés au rapport N/P de 4 (ou de l'ADN plasmidique seul, en contrôle) ont été mélangés, volume à volume, à une solution de glucose 5% ou à du mucus. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 0, 1, 4 ou 24 h sous agitation lente (rotateur) à température ambiante, puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose, préparé à 1% dans du tampon TAE. L'électrophorèse et la révélation de l'ADN au BET ont ensuite été effectuées en suivant la procédure décrite dans la partie III.1.

VII.2. Effet des lipoplexes sur les propriétés rhéologiques du mucus

Pour étudier l'effet des lipoplexes sur les propriétés macrorhéologiques du mucus, 20 µL de lipoplexes préparés au rapport N/P de 4 ont été ajoutés à 180 µL de mucus produit par le modèle 3D de Calu-3 (en ALI pendant 14 jours). Dans ces essais, les lipoplexes ont été préparés de sorte à atteindre, dans le mucus, la concentration maximale utilisée dans les expériences de transfection. Pour calculer cette concentration, nous avons estimé qu'il y avait 3,6 µL de mucus dans un insert 24 puits, car il est possible de récupérer 50 µL de mucus d'un insert 6 puits présentant une surface 14 fois plus grande. En transfection, au rapport N/P = 4 dans les inserts 24 puits, 2,42 nmol de lipoplexes sont déposées sur les cellules, ce qui permet grossièrement d'estimer que si tous les lipoplexes se retrouvent dans une couche de mucus de 3,6 µL, on atteint une concentration en lipides dans cette couche d'environ 0,6 mM. Les formulations ont ainsi été préparées au rapport N/P de 4 mais avec des quantités de lipide et d'ADN augmentées (le reste du protocole restant inchangé) pour atteindre une concentration en lipides finale

dans le mucus de 0,6 mM. Cette concentration a constitué également une limite de faisabilité car, au-delà de celle-ci, les formulations étaient trop fortement perturbées par la quantité de matériel élevée. Dans les formulations préparées par injection, le même raisonnement a conduit à la présence de 2% d'éthanol dans le mucus après ajout des lipoplexes. Certaines mesures de rhéologie ont également été effectuées avec l'octan-1-ol ($C_8H_{17}-OH$, résidu libéré par le lipide C8 après hydrolyse) ou l'octan-1-thiol ($C_8H_{17}-SH$, résidu libéré par le lipide TC8 après hydrolyse), dilués dans un mélange eau/éthanol pour obtenir une concentration finale dans le mucus de 0,6 mM et 1% d'éthanol. Le mucus traité avec du DTT (Sigma-Aldrich) à 1 mM (concentration finale) ou une solution de glucose 5% ont été utilisés en contrôles. Les mélanges mucus-lipoplexes (ou résidu ou DTT) ont ensuite été incubés pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente (rotateur), avant que les mesures de leurs propriétés rhéologiques en balayage de fréquence n'aient été effectuées selon le protocole décrit dans la partie VI.4.

VII.3. Pénétration des lipoplexes dans la couche de mucus

Le protocole de microscopie confocale à balayage laser décrit dans la partie VI.3. a été adapté, comme indiqué ci-après, pour visualiser les lipoplexes dans la couche de mucus produit par des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Pour visualiser les mucines, une WGA couplée à l'Alexa-488 a dû être utilisée pour ne pas interférer avec la fluorescence de la rhodamine (lipoplexes). Le jour de l'observation, les lipoplexes marqués à la rhodamine (10 μ L) ont été déposés sur la couche de mucus. Après 20 min d'incubation à 37 °C, le milieu a été retiré par aspiration douce (sans lavage). La lectine WGA couplée à l'Alexa-488® (Invitrogen, 100 μ L à 5 μ g/mL dans du PBS) a ensuite été déposée sur les cellules et incubée pendant 10 min à 37 °C. Après le retrait de la solution de WGA et un lavage au PBS, les inserts ont été immédiatement découpés et montés sur une lame de microscope. Les acquisitions d'images ont été effectuées tous les 0,8 μ m (z) sur 40 μ m, avec, successivement, une excitation à 488 nm (pour la WGA, avec une fenêtre de détection entre 500 et 556 nm et 2 images moyennées), et une excitation à 561 nm (pour les lipoplexes, avec une fenêtre de détection entre 581 et 662 nm et 4 images moyennées). Pour pouvoir observer l'échantillon sur toute son épaisseur, la puissance des lasers a été paramétrée de sorte à augmenter progressivement avec la profondeur. Les mêmes réglages ont été conservés pour l'ensemble des conditions. Les représentations 3D ont été reconstruites à partir de la pile d'images à l'aide du logiciel Fiji et du plug-in 3D Viewer. Pour que le signal récupéré avec l'excitation à 561 nm corresponde le plus fidèlement possible à celui des lipoplexes, un traitement post-acquisition, consistant à exclure les valeurs de fluorescence en-dessous d'un certain seuil dans le canal de la rhodamine (provenant majoritairement de l'auto fluorescence des cellules puisque présent sur les cellules non exposées), a été réalisé.

VII.4. Diffusion des lipoplexes dans le mucus

Le MPT a été utilisé pour étudier la diffusion des lipoplexes (ou de billes de polystyrène) dans le mucus collecté sur le modèle 3D obtenu avec des cellules Calu-3. Des échantillons de mucus fraîchement collectés (200 μ L) ont été déposés dans chacun des puits d'une lame IbiTreat® (IBIDI). Dans une première étape de validation, des billes de polystyrène carboxylées fluorescentes (Fluoresbrite® YG) de 200 et 500 nm (Polyscience) ont été déposées à raison de 50 μ L/puits de sorte à obtenir des concentrations finales en particules dans les puits de 6,3 μ g/mL et 35,7 μ g/mL, respectivement. De leur côté, les lipoplexes fraîchement préparés (50 μ L), marqués avec 1% molaire de rhodamine-PE, ont été déposés sur les échantillons de mucus à une concentration finale en lipide cationique de 48,5 μ M. Enfin, dans certaines conditions, le mucus a été prétraité pendant 1 h en rotation lente à température ambiante avec du DTT à une concentration finale de 1 mM, ou bien un ajout extemporané de NAC à une concentration finale de 20 mM a été réalisé au moment du dépôt des lipoplexes sur le mucus. Pour toutes les conditions, après 2 h d'incubation, le liquide subsistant sur la couche de mucus a été lentement retiré à la micropipette (environ 50 μ L). Dans chaque expérience, des acquisitions ont été effectuées dans du milieu de culture complet en tant que contrôle de la diffusion des particules en absence de mucus. Les acquisitions ont été effectuées sur un microscope Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments, Melville, États-Unis) équipé d'une lentille 100 \times à immersion en huile (ouverture numérique = 1,49) couplé à des lasers. Les échantillons ont été excités avec un laser continu à 532 nm (lipoplexes) ou à 488 nm (billes de polystyrène), et leur émission a été filtrée, pour les lipoplexes, à l'aide d'un miroir dichroïque (Di02-R532-25x36) et d'un filtre *longpass* (Semrock BLP01-532R-25), et pour les billes de polystyrène à l'aide d'un miroir dichroïque (Di02-R488-25x36) et d'un filtre *bandpass* (FF01-520/35-25). Une lentille supplémentaire a été utilisée pour obtenir un grossissement final de 150X, chaque pixel ayant ainsi une taille de 106,67 nm. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une caméra Imagem CCD (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Avant chaque acquisition, les particules immobilisées au fond des puits ont été localisées, afin d'identifier le fond de la plaque et de permettre de se placer à une hauteur suffisante dans l'échantillon pour limiter leur interférence, tout en restant dans la limite de 40 μ m, au-delà de laquelle les acquisitions ne répondent plus aux critères de qualité de la méthode. Les acquisitions ont été effectuées dans des zones choisies aléatoirement, après avoir vérifié l'absence de cellules en lumière transmise pour ne mesurer que des événements extracellulaires. Dans chaque expérience, et pour chaque condition expérimentale, au moins 100 particules ont été suivies sur des vidéos d'au moins 200 images successives avec les formulations à partir d'un film et les billes de polystyrène de 500 nm ou d'au moins 50 images successives avec les formulations par injection et les billes de polystyrène de 200 nm. Cette distinction est issue de la différence de vitesse de diffusion inhérente à la différence de taille des particules. À l'aide de l'application Fiji, les vidéos ont été ensuite soumises à un traitement de type flou Gaussien pour faciliter le suivi des particules. Les particules ont été suivies, et leurs trajectoires (position à chaque intervalle de temps) ont été extraites à l'aide du plug-in *Particle Tracker* (Sbalzarini and Koumoutsakos, 2005), avec les paramètres suivants : *radius* 6-18, *cut-off* 0,001, *Per/Abs* 0,1 à 0,8, *link range* 2, *displacement* 10.

Les coordonnées spatiales des particules à chaque intervalle de temps ont ensuite été exportées sur le logiciel Igor Pro 8 pour déterminer leurs MSD à l'aide de l'équation :

$$MSD = 1/(N - n) \sum_{i=1}^{N-n} |x_{i+n} - x_i|^2 \quad , \quad n = 1, \dots, N - 1$$

dans laquelle N correspond au nombre de coordonnées consécutives d'une particule $x_i = (x_i, y_i)$, dont la trajectoire a été enregistrée avec un intervalle de temps constant Δt sur une période de temps $T = (N - 1)\Delta t$. Les MSD ont ensuite été modélisés à l'aide d'un modèle de diffusion confinée (Saxton and Jacobson, 1997; Wagner et al., 2017), défini par :

$$MSD = r_c^2 \times (1 - A_1 \exp(-4A_2Dt/r_c^2))$$

dans laquelle r_c correspond au rayon de la zone de confinement, D au coefficient de diffusion, et les constantes $A1$ et $A2$ (ici fixées à 1) caractérisent la forme de la zone de confinement. En modélisant les MSD de chaque particule, les valeurs de D et de r_c des particules ont été calculées. En accord avec la structure du mucus décrite dans la littérature (Meziu et al., 2021), un seuil a été établi à 5 μm pour le r_c , toute trajectoire présentant un r_c supérieur à cette valeur étant par la suite ignorée. Cette dernière étape avait pour objectif d'exclure toute valeur qui n'aurait aucune signification physiologique (pore > 10 μm de diamètre).

Dans certains cas, le coefficient de diffusion théorique des particules dans l'eau à 37 °C a été calculé avec l'équation de Stokes-Einstein, définissant :

$$D = \frac{k \times T}{\mu \times 6\pi \times r}$$

avec D , le coefficient de diffusion (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ kg}.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), T la température en Kelvin (310,15 K), μ la viscosité de l'eau ($6,92 \times 10^{-4} \text{ Pa}.\text{s}^{-1}$ à 37 °C), et r le rayon hydrodynamique de la particule.

VIII. Analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0. Dans les représentations en histogramme, les différences entre groupes ont été analysées avec un test ANOVA (*Analysis of Variance*) à 1 ou 2 facteurs suivi du test de comparaison multiple approprié. Des corrélations étaient recherchées à l'aide du test de corrélation de Pearson permettant de calculer le coefficient de Pearson, r . En MPT, les données de plusieurs expériences ont été regroupées pour chaque condition, puis l'analyse entre les conditions a été réalisée avec le test de rang de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Les données étaient considérées comme significativement différentes lorsque la p valeur était inférieure à 0,05.

RÉSULTATS

I. Conception des lipides, et préparation et caractérisation des formulations

I.1. Conception des lipides

Nous avons vu, dans la partie I.2. de l'introduction bibliographique, qu'il existe une grande diversité de vecteurs de transfert de gènes. Les vecteurs utilisés dans ce travail sont des vecteurs non viraux, qui font partie, à l'instar du DOTMA, de la famille des lipides monocationiques. Leur conception est basée sur des travaux qui ont été réalisés antérieurement au laboratoire, sur la DOPC (figure 2). Ce phospholipide qui présente une structure zwitterionique est un constituant majeur des membranes cellulaires. L'équipe de MacDonald a été la première à l'exploiter pour proposer des *O*-alkyl DOPC, comme la *O*-éthyl DOPC (EDOPC), en tant que vecteurs d'acide nucléique (figure 22A) (MacDonald et al., 1999). Ces lipides résultent de la transformation du motif phosphodiester de la DOPC en phosphotriester, démasquant de ce fait une charge positive nette au niveau de la tête polaire de la DOPC. Cette charge positive permet au lipide de complexer l'acide nucléique par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques établies avec les groupements phosphates anioniques des nucléotides (figure 22B). Les interactions hydrophobes entre les chaînes grasses des lipides provoquent la condensation du matériel génétique sur lui-même et la formation des particules de transfection, appelées lipoplexes.

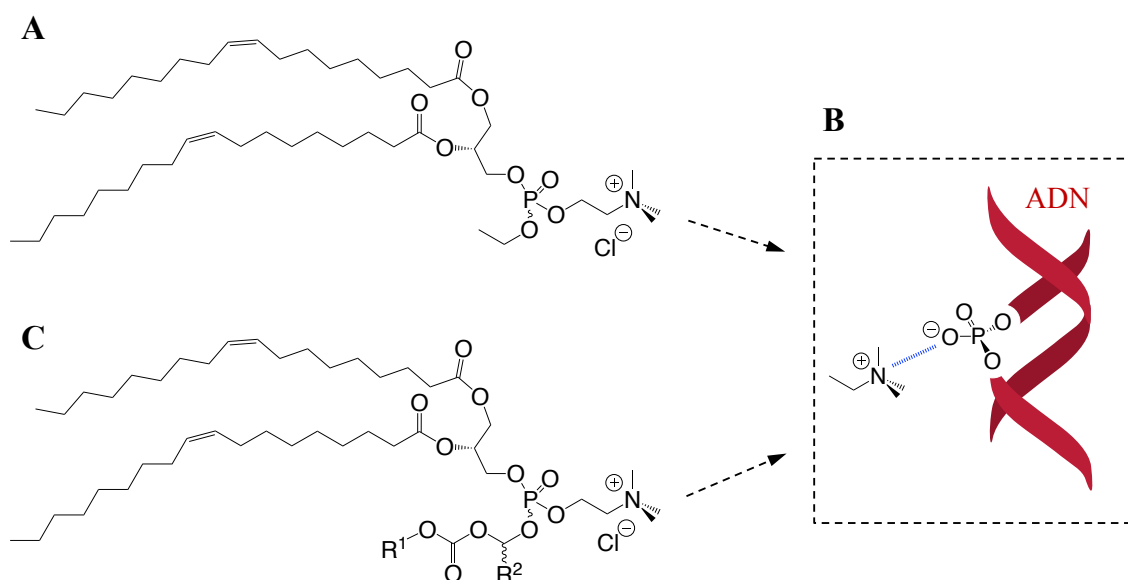


Figure 22. (A) Formule chimique de l'EDOPC. (B) Illustration de l'interaction électrostatique entre l'amine du lipide, chargée positivement, et le phosphate de l'acide nucléique (ici, de l'ADN), chargé négativement. (C) Structure générique des lipides cationiques biolabiles développés dans l'équipe V-SAT.

Dans l'équipe V-SAT, des dérivés plus sophistiqués de la DOPC ont été synthétisés afin de leur conférer, outre des propriétés de complexation de l'acide nucléique, des propriétés de biodégradabilité et un caractère fusogène et/ou endosomolytique. La structure générique de ces vecteurs est présentée

dans la figure 22C (Pierrat et al., 2013a). L'originalité de ces lipides provient du fait que le groupement greffé sur le motif phosphate de la DOPC est sensible à l'hydrolyse, tant chimique qu'enzymatique, conduisant à : 1-la libération d'un motif R^1 -OH (alcool ou acide, dans certaines versions) et 2-la régénération du lipide parent, la DOPC. La DOPC qui retrouve son état zwitterionique n'est alors plus en mesure d'établir une liaison électrostatique avec l'acide nucléique, ce qui enclenche la phase de désassemblage des lipoplexes et de libération de l'acide nucléique. On peut relever que la DOPC libérée n'induit aucune toxicité puisque ce composé est déjà massivement présent dans les membranes. Les alcools libérés (R^1 -OH), lorsqu'ils ont des propriétés tensio-actives, sont capables de déstabiliser les membranes lipidiques, membrane plasmique ou membrane de l'endosome, par exemple, et peuvent concourir à une augmentation de l'efficacité de transfection des particules en facilitant des étapes critiques du processus de transfection telles que l'internalisation cellulaire et l'échappement endosomal (Pierrat et al., 2013a). Parmi les lipides développés, sur ce principe, par l'équipe V-SAT, certains ont montré un potentiel de transfection intéressant dans le poumon de la souris normale, avec une efficacité supérieure à celle de l'agent de référence en thérapie génique par voie pulmonaire, le GL67A (Pierrat et al., 2016a).

Comme nous l'avons discuté dans la partie I.4. de l'introduction bibliographique, malgré l'efficacité reconnue du GL67A en tant que vecteur pour la transfection dans le poumon, le niveau d'expression du transgène reste encore trop faible pour conduire à un effet thérapeutique suffisant. Ceci est sans conteste dû, au moins en partie, à la présence de la barrière que représente le mucus pulmonaire. Comme nous l'avons vu précédemment, un effet mucolytique peut être obtenu en introduisant dans le milieu une molécule portant une fonction thiol (par exemple, de la NAC) qui va pouvoir cliver des ponts disulfures reliant les mucines entre-elles, ponts disulfures qui sont à l'origine des propriétés viscoélastiques et du maillage du mucus. Néanmoins, un traitement généralisé du biopolymère par un agent mucolytique conduit concomitamment à l'apparition d'oligo-mucines de faibles poids moléculaire, qui pourraient augmenter significativement la microviscosité du milieu et ainsi constituer un frein à la diffusion des particules. L'hypothèse qui est à la base du travail présenté ici est que l'utilisation d'un agent mucolytique dans le poumon devrait montrer toute son efficacité si l'on est en mesure de libérer cet agent uniquement à proximité directe de la particule de transfection, permettant ainsi d'éviter une augmentation de la microviscosité locale (figure 23).

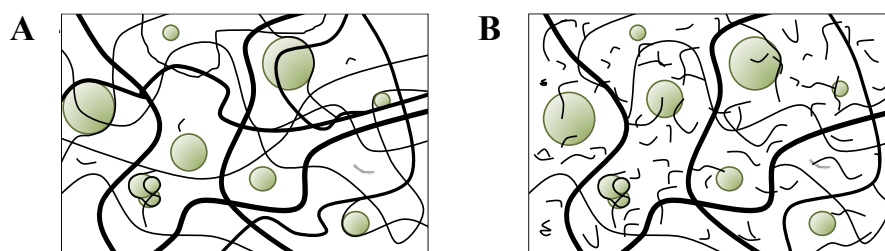


Figure 23. Particules dans la couche de mucus. **(A)** Le réseau tridimensionnel du biopolymère (lignes noires) gêne la diffusion des particules de transfection (sphères vertes) par obstruction stérique ou en se liant à celles-ci (interactions électrostatiques ou hydrophobes). **(B)** Le traitement par un agent mucolytique diminue la viscoélasticité du milieu par coupure de ponts disulfures entre des sous-unités de mucines. Le maillage du biopolymère est élargi, mais la microviscosité locale peut être significativement augmentée en fonction de la quantité de petits fragments de mucines (oligo-mucines) libérés dans le milieu, ce qui peut, au final, constituer un frein à la diffusion des particules de transfection.

Dans ce contexte, les chimistes de l'équipe ont proposé de conférer à leurs lipides cationiques des propriétés mucolytiques intrinsèques. Pour cela, sur la base des résultats précédemment acquis, des structures lipidiques sensibles à l'hydrolyse et capables de libérer localement un groupement thiol pouvant exercer l'effet mucolytique recherché ont été conçues en introduisant un atome de soufre en bonne place dans les structures présentées dans la figure 22 (figure 24). Ce concept a été développé à travers la synthèse d'une série de lipides monocationiques soufrés, et de leurs analogues oxygénés (figure 25). Les variations structurales introduites sur les lipides en modifiant la nature du bras espaceur (segment en rouge) et du résidu alkyl R' visent à moduler la susceptibilité hydrolytique des composés et, *in fine*, la cinétique de libération du groupement thiol dans le milieu.

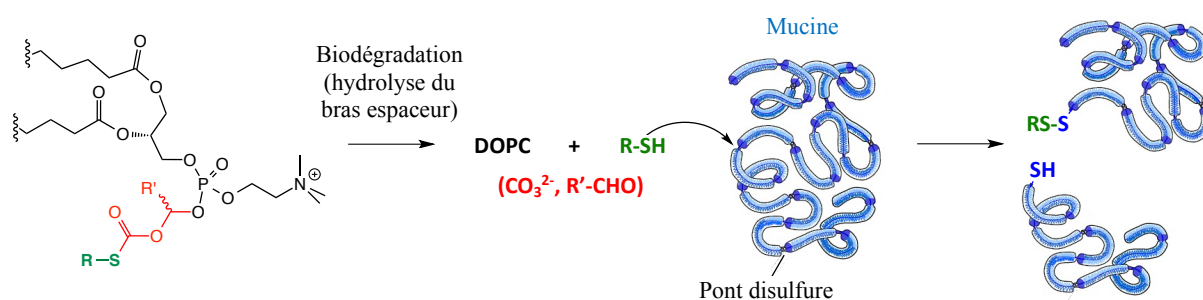


Figure 24. Principe d'action des lipides monocationiques mucolytiques développés dans ce travail.

Ainsi, six lipides monocationiques soufrés (que nous désignerons lipides monosoufrés par opposition aux lipides *helper* polysoufrés décrits plus loin) ont été préparés : 1-quatre lipides dans lesquels la partie labile comporte une chaîne à 3, 4, 8 ou 12 atomes de carbone, linéaire ou ramifiée, et reliée à la DOPC par un pont (bras espaceur ou *linker*) acétal de thiocarbonate, et 2-deux lipides dans lesquels la chaîne présente 12 atomes de carbone, mais le *linker* est différent, *i.e.* comporte un groupement méthyl sur l'atome de carbone acétalique ou incorpore un motif thiosuccinate. Ces lipides

ont été respectivement nommés TiC3, TC4, TC8, TC12, TC12' et TSuc12 (figure 25). Leurs analogues non soufrés, présentant un atome d'oxygène à la place du soufre et libérant donc un alcool (R-OH) plutôt qu'un groupement thiol après hydrolyse, ont été également synthétisés et ont été nommés iC3, C4, C8, C12, C12' et Suc12 (figure 25). Ces analogues oxygénés (que nous désignerons lipides oxygénés) seront utilisés : 1-comme vecteurs pour développer des modèles d'épithélium pulmonaire producteur de mucus nécessaires à l'étude de la délivrance d'acide nucléique dans le poumon (cf. partie II.) et 2-comme « référence » pour évaluer l'activité de nos vecteurs mucolytiques (cf. parties III. et IV.).

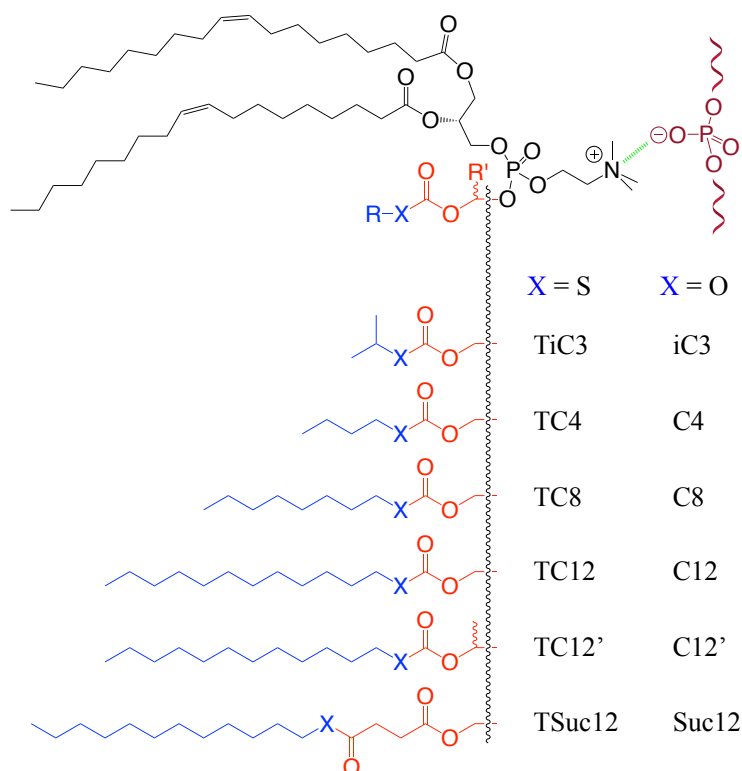


Figure 25. Formule chimique des lipides hydrolysables monosoufrés et de leurs analogues oxygénés étudiés dans ce travail. Le résidu R-X (en bleu) est libéré après hydrolyse du lipide, dont la susceptibilité dépend de la nature du bras espaceur (en rouge) et du résidu alkyl R' (R' = H, sauf pour TC12' et C12' où R' = CH₃).

Avec l'objectif d'augmenter le potentiel mucolytique des lipoplexes, des lipides *helper* capables de libérer plusieurs entités soufrées ont également été imaginés. Ne portant pas de charge positive, ces lipides *helper* n'ont pas la capacité de former des complexes avec l'acide nucléique et doivent donc être incorporés dans les lipoplexes en association avec des lipides cationiques. Deux lipopolythioesters, S3 et S7, qui résultent de la conjugaison de petits oligomères de polythioesters à l'acide oléique, ont ainsi été synthétisés (figure 26). Ces lipides portent plusieurs sites clivables par hydrolyse, ce qui leur permet de libérer respectivement jusqu'à 3 ou 7 motifs thiols (acides 3-mercaptopropionique et thioglycolique). L'activité mucolytique des résidus thiols R-SH libérés suit le même schéma que celle des motifs thiols libérés par les lipides cationiques monosoufrés (figure 24).

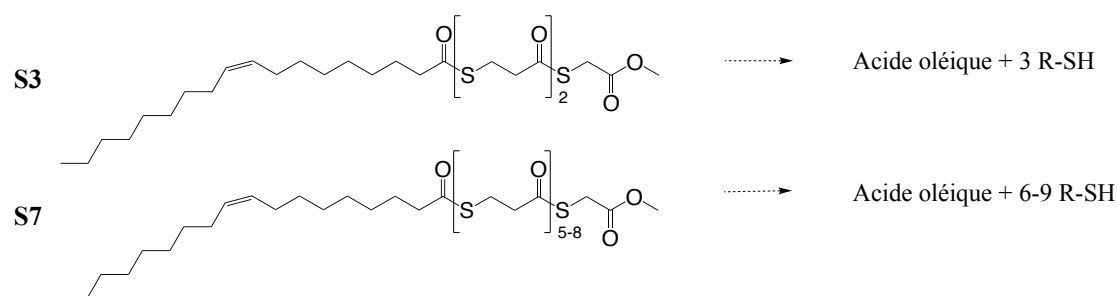


Figure 26. Formule chimique des lipides *helper* polysoufrés S3 et S7 utilisés dans cette étude.

Ainsi, 12 lipides cationiques (6 monosoufrés, et leurs 6 analogues oxygénés) et 2 lipides *helper* polysoufrés seront utilisés dans cette étude pour former des lipoplexes. Les lipides mono- et polysoufrés ont été imaginés pour libérer des entités thiols. Ces motifs thiols, libérés avec une cinétique qui dépend de la sensibilité du lipide à l'hydrolyse, ont pour but de rompre localement les ponts disulfures au sein du mucus, obstacle incontournable à la transfection dans le poumon, afin d'améliorer la pénétration et donc l'efficacité des lipoplexes. La suite de cette partie permettra de décrire la préparation des lipoplexes, la capacité des lipides à complexer de l'ADN, et les caractéristiques physiques des lipoplexes formés. Ces mesures ont été effectuées en parallèle du reste de l'étude, mais nous avons choisi de les regrouper dans cette première partie pour faciliter leur lecture et leur comparaison. À noter que dans la suite du manuscrit, le terme « formulation » sera utilisé pour désigner les préparations de lipoplexes.

I.2. Préparation des formulations

Les lipoplexes sont les structures qui résultent de l'assemblage de l'acide nucléique et d'une espèce cationique lipidique. L'interaction entre le lipide cationique et l'acide nucléique dépendant des liaisons électrostatiques créées entre les deux entités, on utilise généralement une grandeur, le rapport N/P, pour décrire les proportions d'acide nucléique et de lipide dans les lipoplexes. Le N/P correspond au rapport entre la quantité molaire d'amine (ionisable ou ionisée) du lipide cationique (représentée par le N) et celle du phosphate de l'acide nucléique (représenté par le P), *i.e.*, au rapport de charge entre le lipide cationique et l'acide nucléique. Dans ce travail, tous les lipides cationiques utilisés sont monocationiques, et la quantité molaire d'azote (N) correspond donc simplement à la quantité molaire de lipide cationique. Dans l'acide nucléique, chaque mole de nucléotide contient une mole de phosphate, et la quantité molaire de phosphate (P) correspond donc à la quantité molaire de nucléotide. Dans les études antérieures du laboratoire sur l'activité de transfection des lipoplexes à base de lipides cationiques biolabiles, la quantité d'ADN déposée sur les cellules *in vitro* a été fixée à 0,2 µg par puits d'une plaque de culture à 96 puits (Pierrat et al., 2013a). Dans ce travail, nous avons également fixé la quantité d'ADN utilisée pour les expériences de transfection à cette valeur : les différents N/P utilisés résultent donc uniquement de changements dans les quantités de lipide cationique utilisées.

L'organisation supramoléculaire des lipoplexes ne dépend pas uniquement des proportions entre lipide cationique et acide nucléique (donc du N/P), mais aussi des conditions dans lesquelles s'opère le mélange de ces deux constituants. Dans ce travail, nous avons utilisé deux méthodes de préparation des lipoplexes schématisées sur la figure 27 : la méthode de préparation à partir d'un film, durant laquelle un film mince de lipide est hydraté par une solution aqueuse d'acide nucléique (figure 27A), et la méthode dite par injection, selon laquelle l'acide nucléique est ajouté à des liposomes cationiques préformés (figure 27B). Avec ces deux méthodes, des lipides *helper*, comme S3 et S7, ou des lipides couplés à un fluorophore (comme la rhodamine-PE), peuvent être incorporés dans les formulations en les ajoutant simplement au lipide cationique lors de la préparation du film de lipide ou bien lors de l'étape de préparation des liposomes dans la méthode par injection.

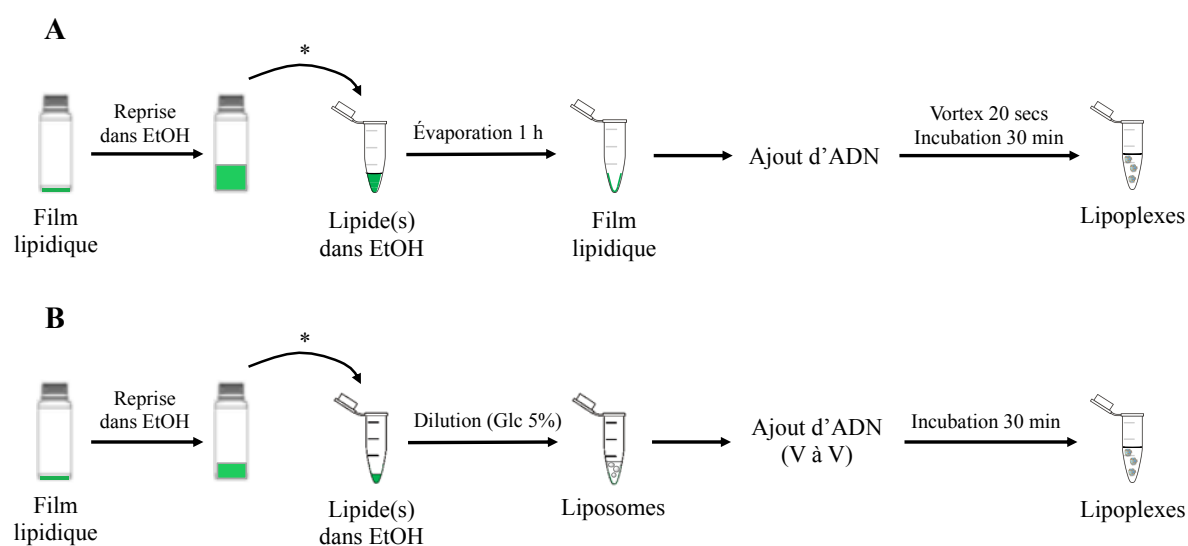


Figure 27. Schéma récapitulatif des deux méthodes de préparation des lipoplexes utilisées dans ce travail. **(A)** Protocole de formulation à partir d'un film. **(B)** Protocole de formulation dite par injection. (*) Si nécessaire, un fluorophore (couplé à un lipide) et/ou un lipide *helper*, repris dans l'éthanol, peut/peuvent également être ajouté(s) à cette étape. EtOH = éthanol.

I.3. Caractérisation des formulations

En amont de l'évaluation de l'activité biologique des formulations, il est nécessaire de les caractériser : 1-en s'assurant que la complexation de l'acide nucléique a bien lieu et en identifiant un N/P optimal pour cela, et 2-en déterminant les caractéristiques physiques des complexes obtenus, à savoir leur taille et leur charge.

I.3.1. Caractérisation des formulations obtenues à partir d'un film

Ce paragraphe regroupe les résultats de la caractérisation des lipoplexes obtenus avec la méthode de préparation à partir d'un film. Cette méthode est généralement privilégiée dans l'équipe, car le solvant utilisé pour solubiliser les lipides n'est pas retrouvé dans les formulations *in fine*. C'est la méthode de préparation sur laquelle nous avons travaillé en première intention. Ainsi, des données de caractérisation ont été obtenues pour l'ensemble des lipides cationiques, comme décrit ci-dessous.

Les capacités de complexation de l'ADN des différents lipides cationiques de notre étude (oxygénés ou monosoufrés) ont été évaluées par la technique de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose en testant des valeurs de N/P allant de 0,8 à 5. Ainsi, il est possible de déterminer une valeur de N/P_c qui correspond au N/P à partir duquel tout l'ADN est complexé au lipide. Un exemple de résultat est présenté dans la figure 28 avec le lipide oxygéné C4 et le lipide monosoufré TSuc12. Nos résultats ont montré que tous les lipides cationiques oxygénés parviennent à complexer la totalité de l'acide nucléique à partir d'un rapport N/P de 2, mis à part le lipide C12 qui nécessite une valeur de N/P plus élevée ($N/P_c = 4$) (tableau 5). Parmi les lipides monosoufrés, seuls 3 lipides (TiC3, TC4, TC8) sont en mesure d'entièrement complexer l'ADN au rapport $N/P \leq 4$ (tableau 5). Il faut en effet une proportion plus élevée de TC12 (N/P de 5) pour complexer entièrement l'ADN. Par ailleurs, les lipides TC12' et TSuc12, présentant respectivement, dans leur bras espaceur, un groupement méthyl sur l'atome de carbone acétalique ou un motif thiosuccinate, montrent une moins bonne complexation de l'ADN, puisque de l'ADN libre est encore détecté au rapport N/P de 14 (figure 28B), ce qui suggère un N/P_c supérieur à 14.

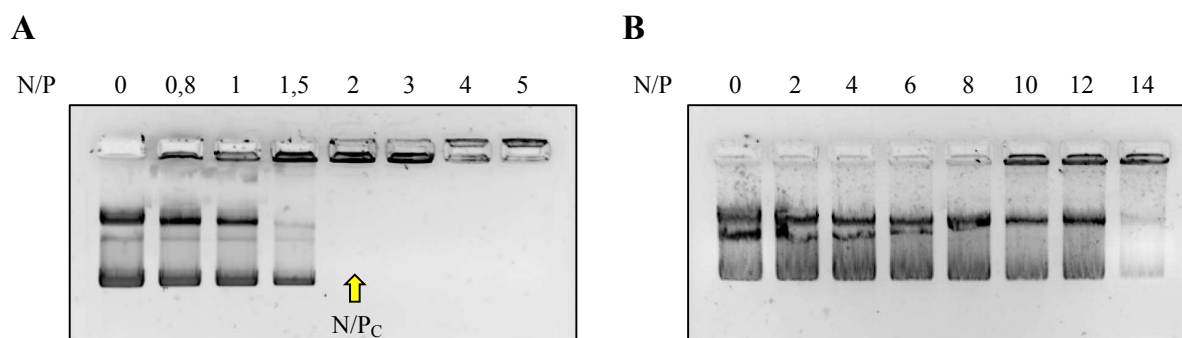


Figure 28. Détermination du rapport N/P_c (valeur du rapport N/P à partir de laquelle tout l'ADN est complexé au lipide) par la technique de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose. Le BET, agent intercalant de l'acide nucléique, est utilisé pour mettre en évidence l'absence de migration de l'ADN quand celui-ci est complexé au lipide. Le contrôle (ADN plasmidique seul) correspond au rapport N/P de 0. **(A)** Exemple du lipide C4. Une migration d'ADN non complexé au lipide est visible jusqu'au rapport N/P de 1,5. Le N/P_c est fixé à 2. **(B)** Exemple du lipide TSuc12. De l'ADN libre est encore détecté au rapport N/P de 14. Le N/P_c est donc supérieur à 14.

Lipide	N/P _c	Lipide	N/P _c
iC3	2	TiC3	2
C4	2	TC4	3
C8	2	TC8	2
C12	4	TC12	5
C12'	2	TC12'	> 14
Suc12	2	TSuc12	> 14

Tableau 5. Capacité des lipides cationiques oxygénés (colonnes de gauche) ou monosoufrés (colonnes de droite) à complexer l'ADN dans les formulations obtenues à partir d'un film. Chaque gel d'électrophorèse a été reproduit au moins 2 fois.

La taille des formulations obtenues à partir d'un film a été mesurée par deux techniques en parallèle, la DLS et le NTA. La DLS consiste à faire passer un faisceau laser dans un échantillon et à mesurer les fluctuations de diffusion de ce faisceau induites par les particules, fluctuations qui dépendent de la taille de ces dernières. Le NTA, quant à lui, permet de déterminer la trajectoire et la vitesse de diffusion des particules de manière individuelle, en suivant celles-ci par vidéomicroscopie. Dans les deux techniques, le coefficient de diffusion des particules en mouvement Brownien déterminé est utilisé dans la relation de Stokes-Einstein pour calculer le diamètre des particules. Ces deux techniques permettent de caractériser une formulation par le diamètre de ses particules, la dispersion des valeurs ou la proportion d'agrégats. En DLS, l'analyse des cumulants des données d'autocorrélation permet d'extraire des distributions de taille. Le *Z-average* est une valeur moyenne globale de taille qui est calculée à partir des données de distribution en intensité obtenues et s'accompagne du calcul d'un paramètre de dispersion, l'indice de polydispersité (PdI). Un PdI < 0,2 indique que la dispersion des valeurs est faible, tandis qu'un PdI > 0,7 indique que l'échantillon est probablement trop hétérogène pour que l'analyse puisse être considérée. Les résultats de la distribution en intensité peuvent être convertis pour établir une distribution de la taille en fonction du volume ou en fonction du nombre qui permettront de décrire la proportion relative des différents constituants de l'échantillon en fonction de leur volume ou de leur nombre en présence de plusieurs modes ou pics. En NTA, l'analyse de la répartition en nombre absolu permet d'extraire les caractéristiques d'une population monomodale ou de mélanges bimodaux ou polymodaux. Les valeurs caractéristiques du diamètre hydrodynamique (moyenne, médiane) ou de dispersion (*span*) sont déterminées d'après une répartition monomodale pondérée en nombre. Le *span* est calculé à partir des valeurs au-delà desquelles se trouvent, respectivement, 10% de valeurs les plus faibles et 10% de celles les plus élevées. Les échantillons monodisperses ont un *span* < 1, tandis que les échantillons ayant une dispersion élevée ont un *span* > 1,5. PdI et *span*, indices de dispersion sans unité, permettent de comparer les dispersions de taille autour de valeurs moyennes très différentes, mais aussi de comparer les dispersions observées avec des techniques de mesure de taille différentes.

Dans un premier temps, les techniques de DLS et de NTA ont été utilisées pour analyser la reproductibilité de notre méthode de préparation des lipoplexes à partir d'un film et mener une étude comparative des deux techniques de mesure de taille, le NTA étant une technique nouvellement mise en œuvre au laboratoire. Des mesures de taille ont été réalisées sur 6 préparations indépendantes de lipoplexes à base du lipide C8 au rapport N/P de 4 (tableau 6). L'analyse des préparations par DLS a permis de déterminer un *Z-average* de 500 nm et un PDI de 0,337. Le coefficient de variation (CV) inter-essai était de 9% pour le *Z-average* et de 5% pour le PDI, ce qui semble satisfaisant puisque nous avons obtenu des CV de 2% sur le *Z-average* et le diamètre moyen en intensité de billes de référence en polystyrène de 500 nm ($n = 6$ analyses indépendantes). Cependant, la valeur de PDI indique que les formulations obtenues sont polydisperses. Cette dispersion est visible dans la distribution en nombre, dans laquelle 97% des lipoplexes ont un diamètre de 320 nm, et celle en volume qui indique que 77% des particules ont un diamètre de 996 nm. Ces proportions sont peu variables entre les préparations (CV de 4%), mais la variabilité entre les préparations apparaît davantage sur les valeurs du diamètre avec un CV de 16% dans la distribution en nombre et de 45% dans la distribution en volume. Ce dernier mode d'analyse des résultats indique clairement une part constante de la préparation, principalement constituée de particules de grand diamètre qui sont probablement des agrégats. Cependant, la taille de ces agrégats semble variable d'une préparation à l'autre. L'analyse des préparations par NTA indique également une dispersion de la taille des lipoplexes avec un diamètre moyen de 505 nm et un diamètre médian de 441 nm, confirmée par une valeur du *span* supérieure à 1. Néanmoins, la bonne reproductibilité entre les préparations se confirme avec les CV de 4 et 5% pour les diamètres moyen et médian, respectivement. Nous avons obtenu un CV de 3% sur le diamètre moyen de particules de référence du constructeur de 100 nm ($n = 22$ analyses indépendantes). Une plus grande variabilité s'observe avec la représentation en nombre absolu, puisque la valeur modale de 444 nm présente un CV de 12% sur les 6 préparations. Cette étude nous a amené à choisir, comme paramètre d'analyse afin de caractériser l'ensemble de nos formulations et comparer les méthodes de préparation entre elles : le *Z-average* moyen et le PDI pour la DLS, et le diamètre moyen et le *span* pour le NTA.

DLS									NTA				
<i>Z-average</i>	PdI	Diamètre (moyenne)	Proportion (%)	Diamètre (moyenne)	Proportion (%)	Diamètre (moyenne)	Proportion (%)		Diamètre (médiane)	Diamètre (moyenne)	<i>Span</i>	Diamètre (mode)	Largeur à mi-hauteur
(nm)		(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)		(nm)	(nm)		(nm)	(nm)
			Nombre		Volume		Intensité						
Moyenne	500	0,377	320	97	996	77	511	89	441	505	1,3	444	444
SD	45	0,020	50	4	445	3	75	3	22	20	0,1	52	9
CV (%)	9	5	16	4	45	4	15	3	5	4	4	12	2

Tableau 6. Tableau comparatif des principales valeurs caractéristiques de taille et de dispersion de taille obtenues par NTA et DLS sur des formulations à base du lipide C8 obtenues à partir d'un film. Les moyennes, écart-types (SD) et coefficients de variation (CV) ont été calculés à partir des résultats obtenus sur 6 formulations indépendantes préparées au rapport N/P de 4.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la taille et la charge (potentiel zêta) des formulations pour chacun des lipides cationiques oxygénés ou monosoufrés (tableau 7). La taille des formulations a été mesurée par DLS et NTA, et la charge par DLS uniquement, la technique de NTA nous ayant donné, de façon inexplicée, des résultats incohérents. Trois rapports N/P ont été testés : 1, 2 et 4, le rapport N/P de 4 ayant été identifié comme étant le ratio optimal pour obtenir l'efficacité de transfection la plus élevée avec des formulations à base de lipide C8. Les résultats aux rapports N/P de 1 et 2 ont généralement été obtenus sur une seule préparation et restent donc préliminaires. Néanmoins, ces mesures confortent les données de complexation obtenues par la technique du retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose, avec la détermination des N/P_c. En effet, les lipoplexes au rapport N/P de 1 sont généralement de taille plus petite qu'au rapport N/P de 4 quel que soit le lipide, comme le montrent les données obtenues avec le lipide C8, avec un *Z-average* de 374 ± 91 nm au rapport N/P de 1 et 546 ± 88 nm au rapport N/P de 4. De plus, au rapport N/P de 1, tous les lipides oxygénés et monosoufrés donnent des formulations présentant un potentiel zêta négatif, ce qui indique une complexation de l'ADN incomplète. Au rapport N/P de 2, certaines formulations, en particulier celles obtenues avec les lipides TiC3 ou TC8, présentent une agrégation importante des particules, entraînant une augmentation du *Z-average* au-delà du micromètre. Au rapport N/P de 2, le potentiel zêta est positif dans le cas des lipides qui présentent un N/P_c de 2 (iC3, C4, C8, C12', Suc12, TiC3 et TC8), et négatif dans le cas contraire (C12, TC4, TC12), confirmant les différences de capacité de complexation des lipides précédemment mises en évidence. Enfin, au rapport N/P de 4, toutes les formulations présentent un potentiel zêta positif, excepté celles à base de TC12 qui présentent un potentiel zêta très variable, en moyenne proche de la neutralité (-1 ± 40 mV). Enfin, la concentration de particules en suspension déterminée par NTA, quant à elle, augmente systématiquement avec le rapport N/P. Ainsi, la taille, la charge et la concentration des formulations sont nettement liées au rapport N/P et à la capacité des lipides à former des lipoplexes.

Lipide	N/P	DLS			NTA		
		Z-average (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)	Moyenne (nm)	Span	Concentration ($\times 10^9$ part./mL)
iC3	1	495	0,339	-26	408	1,3	0,62
	2	562	0,318	+22	410	1,3	3,4
	4	394 \pm 12	0,248	+44 \pm 3	491 \pm 17	1,2	15
C4	1	261	0,238	-22	342	1,3	0,69
	2	415	0,321	+35	374	1,1	4,4
	4	409 \pm 45	0,320	+40 \pm 7	451 \pm 40	1,2	12
C8	1	374 \pm 91	0,197	-34 \pm 8	307 \pm 68	1,0	0,55
	2	559	0,261	+27	285 \pm	1,2	1,5
	4	546 \pm 88	0,385	+44 \pm 5	505 \pm 20	1,3	10
C12	1	506	0,269	-26	480	1,4	0,39
	2	643	0,246	-23	487	1,4	0,92
	4	751 \pm 151	0,309	+36 \pm 11	567 \pm 32	1,2	4,0
C12'	1	344	0,291	-32	350	1,1	0,66
	2	654	0,192	+26	422	1,2	3,1
	4	634 \pm 107	0,438	+43 \pm 5	497 \pm 46	1,3	11
Suc12	1	326	0,310	-29	346	1,6	0,81
	2	795	0,119	+20	448	1,3	1,5
	4	541 \pm 62	0,288	+41 \pm 5	504 \pm 36	1,4	11
TiC3	1	252	0,354	-29	389,3	1,2	0,39
	2	1220	0,452	+18	nd	nd	nd
	4	368 \pm 40	0,398	+36 \pm 8	445 \pm 50	1,4	13
TC4	1	268	0,268	-23	329	1,2	0,59
	2	523	0,476	-13	403	1,3	1,3
	4	341 \pm 44	0,291	+38 \pm 13	431 \pm 53	1,5	15
TC8	1	390 \pm 9	0,278	-31 \pm 7	430 \pm 44	1,3	0,91
	2	1530	0,350	+19	735	1,2	1,1
	4	520 \pm 41	0,320	+48 \pm 8	530 \pm 57	1,3	9,1
TC12	1	600	0,444	-25	477	1,0	0,22
	2	469	0,383	-29	461	1,1	0,48
	4	564 \pm 107	0,303	-1 \pm 40	468 \pm 153	1,4	0,70
TC12'	1	Complexation incomplète					
	2						
	4						
TSuc12	1	Complexation incomplète					
	2						
	4						

Tableau 7. Caractéristiques de taille et de charge des lipoplexes dans les formulations obtenues à partir d'un film à base de lipide oxygéné ou monosoufré pour des rapports N/P de 1, 2 et 4. Résultats des mesures du diamètre (*Z-average* et diamètre moyen), de la polydispersité (PdI et *span*), de la charge (potentiel zêta) et de la concentration en particules obtenus par DLS et/ou NTA. Les résultats du *Z-average*, du diamètre moyen, et du potentiel zêta sont exprimés sous la forme de moyennes \pm SD des mesures effectuées sur 2 à 11 préparations indépendantes. nd = non déterminé.

Si l'on compare les données des lipides monosoufrés et de leurs analogues oxygénés en se concentrant sur le rapport N/P de 4 (N/P utilisé dans toutes les évaluations biologiques qui suivront), on constate que les valeurs moyennes de taille, de polydispersité et de potentiel zêta sont peu différentes. Par exemple, le diamètre moyen obtenu en NTA varie de 431 \pm 53 à 530 \pm 57 nm pour les lipoplexes à base de lipides monosoufrés, contre 451 \pm 40 à 567 \pm 32 nm pour les lipoplexes à base de lipides oxygénés. Le potentiel zêta varie de -1 mV à +48 mV pour les formulations à base de lipides monosoufrés (respectivement TC12 et TC8), alors qu'il varie de +36 à +44 mV pour les formulations à base des lipides oxygénés (respectivement C12 et C8). Ainsi, seules les formulations à base des lipides

C12 ou TC12 (deux lipides pour lesquels la complexation de l'ADN était totale aux rapports N/P de 4 et 5, respectivement) présentent une différence de potentiel zêta, avec un potentiel zêta neutre des formulations à base de lipide TC12 et un potentiel zêta largement positif de celles à base de lipide C12.

1.3.2. Caractérisation des formulations obtenues par injection

La méthode de préparation des lipoplexes par injection a été utilisée en deuxième intention dans notre travail, afin de tenter d'obtenir des lipoplexes plus petits. Nous avons alors privilégié l'étude du couple de lipides C8/TC8. Les données de caractérisation présentées ci-dessous ne concernent donc que ce couple, et sont moins complètes que celles obtenues par la méthode de préparation à partir d'un film. Notamment, la technique de DLS a été majoritairement utilisée pour caractériser les formulations.

Une étude de la complexation de l'ADN a été menée sur le lipide C8 uniquement. Elle a montré que les lipoplexes obtenus par injection parviennent à une complexation totale de l'ADN à partir d'un rapport N/P de 2 (résultats non montrés). Ce N/P_c de 2 est identique à la valeur obtenue pour des lipoplexes préparés à partir d'un film de lipide C8.

La reproductibilité de notre méthode de préparation des lipoplexes par injection a été étudiée, en réalisant des mesures de taille par DLS sur 7 préparations indépendantes obtenues à partir du lipide C8 au rapport N/P de 4 (tableau 8). Le *Z-average* de ces formulations était de 169 nm, soit bien plus petit que pour les lipoplexes préparés à partir d'un film (500 nm environ), et son coefficient de variation de 5% restait satisfaisant. Le PDI (0,350) indique que la formulation est polydispersée. Les différences qui apparaissaient entre l'analyse de la distribution en nombre (population homogène de 86 nm de diamètre) et les analyses de distribution en volume (58% des lipoplexes avec un diamètre de 491 nm) et en intensité (66% des lipoplexes avec un diamètre de 176 nm) témoignent à nouveau d'une grande polydispersité. Associés à l'important coefficient de variation de ces valeurs (> 18%), ces résultats indiquent que, bien que contenant des lipoplexes de tailles assez faibles (< 200 nm), les formulations obtenues par injection comprennent aussi, comme celles des formulations obtenues à partir d'un film, une part de particules de grand diamètre (ou agrégats), de tailles très variables d'une préparation à l'autre. Une mesure de taille réalisée par NTA sur l'une des 7 préparations a révélé une taille de 173,3 nm, un *span* de 1,1 et une concentration de 75×10^9 particules/mL (soit 7,5 fois plus élevée que pour la formulation à partir d'un film, toutes les autres conditions étant égales par ailleurs). Ainsi, la préparation des lipoplexes par injection permet la formation de particules de plus petits diamètres par rapport à la préparation à partir d'un film de lipides, mais ces deux méthodes génèrent des préparations polydispersées.

	<i>Z-average</i>	PdI	Diamètre (moyenne) (nm)	Proportion (%)	Diamètre (moyenne) (nm)	Proportion (%)	Diamètre (moyenne) (nm)	Proportion (%)
			Nombre		Volume		Intensité	
Moyenne	169	0,350	86	100	491	58	176	66
SD	9	0,062	15	0	510	11	61	15
CV (%)	5	18	18	0	104	20	35	23

Les données de taille et de charge obtenues par DLS pour les formulations à base de lipide C8 ou TC8, préparées par injection au rapport N/P de 4, sont présentées dans le tableau 9, en comparaison de celles obtenues pour les formulations obtenues à partir d'un film. Les valeurs de *Z-average* sont nettement plus faibles et celles de la charge sont légèrement réduites dans les formulations par injection par rapport aux formulations à partir d'un film, ceci pour les deux lipides. À méthode de préparation équivalente, les diamètres mesurés pour les lipoplexes à base de lipide C8 ou TC8 sont comparables (film : 546 vs 520 nm, injection : 169 vs 174 nm), tout comme les PDI (film : 0,385 vs 0,320, injection : 0,350 vs 0,348) et les potentiels zêta (film : +44 vs +48 mV, injection : +29 vs +30 mV).

Méthode de préparation	Lipide	N/P _c	<i>Z-average</i> (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)
Film	C8	2	546 ± 88	0,385	+44 ± 5
	TC8	2	520 ± 41	0,320	+48 ± 8
Injection	C8	2	169 ± 9	0,350	+29 ± 4
	TC8	nd	174	0,348	+30

I.3.3. Caractérisation des formulations incorporant les lipides polysoufrés

L'ajout de lipides polysoufrés dans les formulations constituait notre deuxième stratégie pour former des lipoplexes à activité mucolytique intrinsèque. Nous avons donc vérifié que ces lipides *helper*,

dénommés S3 et S7, ne perturbaient pas l'obtention des lipoplexes et leurs caractéristiques. Une gamme de quantités d'entités thiols ajoutées aux lipoplexes a pu être testée en préparant des formulations contenant 1 ou 3 équivalents molaires (par rapport au lipide cationique) de lipide polysoufré. De manière intéressante, sans qu'une étude approfondie n'ait été réalisée, l'incorporation des lipides polysoufrés, à 1 équivalent de la concentration molaire en lipide cationique, dans le protocole de préparation des lipoplexes à partir d'un film, semblait fortement perturber la formation des lipoplexes. Les données de caractérisation décrites ci-dessous ne concernent donc que des formulations préparées par injection. De même que précédemment, la majeure partie du travail a été effectuée sur le lipide C8.

Une étude de la complexation de l'ADN a été menée sur le lipide C8, uniquement, en présence de 1 ou 3 équivalents de lipide *helper* S3 ou S7. Elle a montré que l'incorporation des lipides polysoufrés dans les formulations, et ceci même à concentration relativement élevée (3 équivalents molaires par rapport au lipide cationique), ne perturbait pas la complexation de l'ADN (tableau 10).

Lipide	N/P _c
C8	2
C8 + 1 S3	2
C8 + 1 S7	2
C8 + 3 S3	2
C8 + 3 S7	2

Tableau 10. Capacité du lipide C8 à complexer de l'ADN dans des formulations obtenues par injection en présence, ou non, de 1 ou 3 équivalents molaires de lipide polysoufré S3 ou S7.

Des mesures de taille et de charge ont été effectuées, par DLS, sur les formulations à base de lipide C8 incorporant différentes proportions de l'un ou l'autre des lipides polysoufrés (tableau 11). Un diamètre légèrement plus petit et une dispersion nettement réduite ont été mesurés sur les formulations incorporant 3 équivalents de lipides polysoufrés, en comparaison à celles ne contenant que le lipide C8 (*Z-average* de 141 ± 5 vs 169 ± 9 nm et PdI de 0,137 vs 0,350 pour les formulations de lipide C8 comprenant 3 équivalents de lipide S3 vs C8 seul, respectivement, au rapport N/P de 4). En revanche, la présence de lipide polysoufré dans les formulations ne semble avoir aucune incidence sur la charge des particules (potentiel zêta de $+28 \pm 3$ vs $+29 \pm 4$ mV, pour les deux formulations précédentes). Pour compléter cette étude, des mesures de taille et de charge ont été effectuées sur des formulations préparées à partir des autres lipides oxygénés, en présence ou non de 3 équivalents de lipide S3 (tableau 11). Ces formulations avaient des valeurs de *Z-average* et de potentiel zêta comparables à celles des formulations ne contenant que le lipide C8, confirmant la taille et la charge plus petites des formulations préparées par injection par rapport à celles préparées à partir d'un film. De plus, les formulations préparées avec 3 équivalents de lipide S3 présentaient une taille et surtout une polydispersité plus faibles que celles

préparées sans lipide polysoufré (à l'exception de la taille des formulations avec le lipide iC3, qui présentaient déjà un *Z-average* < 150 nm en l'absence de lipide polysoufré).

Sans lipide polysoufré				Avec lipide polysoufré			
Lipide	<i>Z-average</i> (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)	Lipide	<i>Z-average</i> (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)
C8	169 ± 9	0,350	+29 ± 4	C8 + 1 S3	150 ± 10	0,230	+31 ± 4
				C8 + 1 S7	165 ± 19	0,334	+29 ± 6
				C8 + 3 S3	141 ± 5	0,137	+28 ± 3
				C8 + 3 S7	145 ± 6	0,170	+32 ± 4
iC3	125 ± 11	0,298	+28 ± 7	iC3 + 3 S3	138 ± 5	0,121	+23
C4	171 ± 29	0,342	+23 ± 4	C4 + 3 S3	142 ± 19	0,134	+24
C12	170 ± 23	0,370	+29 ± 7	C12 + 3 S3	144 ± 11	0,151	+27
C12'	185 ± 31	0,365	+29 ± 10	C12' + 3 S3	143	0,186	+25
Suc12	145	0,355	+34	Suc12 + 3 S3	nd	nd	nd

Tableau 11. Taille et charge des formulations à base de lipides oxygénés (N/P de 4) obtenues par injection en présence, ou non, de lipide polysoufré S3 ou S7 (1 ou 3 équivalents molaires). Résultats du *Z-average*, du diamètre moyen, et du potentiel zêta, obtenus par DLS et exprimés sous la forme de moyenne ± SD des mesures effectuées sur 2 à 7 préparations indépendantes. nd = non déterminé.

I.3.4. Caractérisation des formulations incorporant un fluorophore

Dans ce travail, des formulations à base du lipide C8 ont été préparées avec de la rhodamine-PE pour pouvoir suivre les lipoplexes *in vitro* dans des échantillons de mucus par des techniques de microscopie. Les caractéristiques de taille et de charge de ces formulations, obtenues par la méthode de préparation à partir d'un film ou par injection au rapport N/P de 4, ont été déterminées par NTA ou DLS (tableaux 12 et 13).

Par NTA, nous avons observé que la taille des lipoplexes à base de lipide C8 obtenus à partir d'un film était peu modifiée par l'incorporation de 1% molaire de rhodamine-PE dans les formulations (diamètre moyen : 455 vs 505 nm, avec ou sans rhodamine-PE, respectivement) (tableaux 12 et 7). En installant un filtre dans le *Nanoparticle Tracker* permettant de ne détecter que les particules fluorescentes, les concentrations en lipoplexes mesurées étaient moins élevées, environ 70% des lipoplexes n'étant plus détectés. Par ailleurs, les diamètres moyens des lipoplexes ayant incorporé la

rhodamine-PE étaient près de deux fois plus élevés que lorsque la mesure était effectuée en l'absence du filtre (889 vs 455 nm, respectivement). Ces résultats suggèrent que seule une faible population des lipoplexes est marquée ($\approx 30\%$), et que les lipoplexes marqués ont un diamètre moyen supérieur à celui des lipoplexes non marqués.

Lipide	Filtre de fluorescence	Diamètre moyen (nm)	Span	Concentration ($\times 10^9$ part./mL)
C8	Désactivé	455	1,3	10
	Activé	889	1,2	2,9

Tableau 12. Taille des formulations obtenues à partir d'un film du lipide C8 dopé à 1% molaire avec de la rhodamine-PE (rapport N/P de 4). Résultats des mesures du diamètre moyen, du *span*, de la concentration en particules obtenus par NTA. Les mesures ont été effectuées en installant ou non le filtre de fluorescence du NTA, qui permet de considérer uniquement les lipoplexes ayant incorporé assez de rhodamine-PE.

Des mesures de taille et de charge ont également été réalisées, par DLS, sur des formulations à base de lipide C8 dopées à la rhodamine-PE (1% molaire) et obtenues par injection, en présence, ou non, de lipide polysoufré S3 ou S7 (tableau 13). Les formulations incorporant 3 équivalents de lipide S3 présentaient, encore une fois, des valeurs de taille et de polydispersité réduites par rapport à celles n'en incorporant pas (*Z-average* : 146 vs 187 nm, Pdl : 0,092 vs 0,295, respectivement). Les lipoplexes ayant incorporé de la rhodamine-PE présentaient, de manière générale, une taille similaire à ceux n'en incorporant pas (par exemple, *Z-average* : 187 ± 31 nm vs 169 ± 9 nm pour les formulations à base de lipide C8 avec et sans rhodamine-PE, respectivement) (tableaux 13 et 11). Toutefois, une analyse par NTA mettait à nouveau en garde sur les différences résultant du marquage et de son hétérogénéité (diamètre moyen de 322 nm avec le filtre de fluorescence, et de 168 nm sans filtre, non présenté dans les tableaux).

Lipide	<i>Z-average</i> (nm)	Pdl	Potentiel zêta (mV)
C8	187 ± 31	0,295	$+34 \pm 6$
C8 + 1 S7	168	0,269	+32
C8 + 3 S3	146 ± 5	0,092	$+40 \pm 4$

Tableau 13. Taille et charge des formulations à base de lipide C8 incorporant un fluorophore, obtenues par injection. Résultats des mesures du diamètre (*Z-average*), de la polydispersité (Pdl) et du potentiel zêta obtenues par DLS sur des formulations au rapport N/P de 4, incorporant ou non 1 équivalent de lipide polysoufré S7 ou 3 équivalents de lipide polysoufré S3, et additionnées de 1% de rhodamine-PE. Les valeurs du *Z-average* et du potentiel zêta sont exprimées sous la forme de la moyenne \pm SD des mesures effectuées sur 2 à 4 préparations indépendantes.

En conclusion, les 6 lipides cationiques oxygénés sont en mesure de complexer l'ADN au rapport N/P de 4 quand les formulations sont préparées à partir d'un film. Les lipoplexes à base des lipides iC3, C4, C8, C12, C12' ou Suc12 présentent des valeurs de *Z-average* autour de 550 nm, une polydispersité élevée et une charge positive avec des valeurs de potentiel zêta autour de +40 mV. Les formulations obtenues avec les lipides monosoufrés TiC3, TC4 ou TC8 ont des caractéristiques physiques similaires à celles obtenues avec le lipide oxygéné correspondant : une valeur de *Z-average* autour de 450 nm, une polydispersité élevée et une charge positive. Les lipides monosoufrés présentant une chaîne carbonée "latérale" plus longue, TC12, TC12' et TSuc12, ont quant à eux plus de mal à complexer de l'ADN. Au rapport N/P de 4, seule la formulation à base de lipide TC12 présente un début de complexation de l'ADN.

Lorsque les formulations sont préparées par injection, le N/P_c du lipide C8 reste inchangé. La méthode de préparation par injection nous a aussi permis d'obtenir des formulations de taille systématiquement plus petite comparée à la méthode de préparation à partir d'un film, puisque les *Z-average* étaient alors < 200 nm, sans modification du PdI. Les formulations avaient aussi des charges légèrement plus faibles, avec des valeurs de potentiel zêta autour de +30 mV.

Enfin, les formulations de lipides cationiques oxygénés contenant des lipides *helper* polysoufrés S3 et S7 ont dû être préparées par injection. Les lipoplexes à base des lipides iC3, C4, C8, C12, ou C12', formés avec 3 équivalents de lipide polysoufré S3, se caractérisent par une plus petite taille, avec des valeurs de *Z-average* autour de 140 nm, et une polydispersité fortement réduite comparées aux lipoplexes en l'absence de lipide S3. Ils ont une charge positive avec des valeurs de potentiel zêta autour de +30 mV.

L'ensemble de ces résultats sont résumés dans le tableau 14.

	Lipide	Film					Injection			
		N/P _c	Z-average (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)		N/P _c	Z-average (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)
Lipides oxygénés	iC3	2	394	0,248	+44		nd	125	0,298	+28
	C4	2	409	0,320	+40		nd	171	0,342	+23
	C8	2	546	0,385	+44		2	169	0,350	+29
	C12	4	751	0,309	+36		nd	170	0,370	+29
	C12'	2	634	0,438	+43		nd	185	0,365	+29
	Suc12	2	541	0,288	+41		nd	145	0,355	+34
Lipides monosoufrés	TiC3	2	368	0,398	+36		nd	163	0,300	+31
	TC4	3	341	0,291	+38		nd	166	0,408	+29
	TC8	2	520	0,320	+48		nd	174	0,348	+30
	TC12	5	564	0,303	-1		nd	203	0,383	+34
	TC12'	> 14	nd	nd	nd		3	192	0,342	+27
	TSuc12	> 14	nd	nd	nd		4	1418	0,564	+7
Lipides oxygénés + polysoufrés	C8 + 1 S3	nd	nd	nd	nd		2	150	0,230	+31
	C8 + 3 S3	nd	nd	nd	nd		2	141	0,137	+28
	C8 + 1 S7	nd	nd	nd	nd		2	165	0,334	+29
	C8 + 3 S7	nd	nd	nd	nd		2	145	0,170	+32
	iC3 + 3 S3	nd	nd	nd	nd		nd	138	0,121	+23
	C4 + 3 S3	nd	nd	nd	nd		nd	142	0,134	+24
	C12 + 3 S3	nd	nd	nd	nd		nd	144	0,151	+27
	C12' + 3 S3	nd	nd	nd	nd		nd	143	0,186	+25
	Suc12 + 3 S3	nd	nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd

Tableau 14. Tableau récapitulatif des valeurs de N/P_c, déterminées par la technique de retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose, et des valeurs de taille, de dispersion de taille, et de charge de l'ensemble des formulations (au rapport N/P de 4) déterminées par DLS. Les écart-types et les résultats de NTA ne sont pas représentés. Les formulations surlignées en vert sont celles qui sont évaluées dans la suite du travail. nd = non déterminé.

II. Modèles d'épithélium producteurs de mucus pour étudier la délivrance d'acide nucléique dans le poumon

Afin d'étudier le potentiel de lipides mucolytiques conçus, dans ce projet, comme agents de transfection dans le poumon, nous avons besoin de : 1-un modèle de mucus permettant d'évaluer les interactions de nos formulations avec le mucus pulmonaire, et plus particulièrement la modification de structure du mucus résultant de l'activité mucolytique de nos formulations, et 2-un modèle cellulaire recouvert d'une couche de mucus suffisante pour évaluer l'apport d'une telle activité mucolytique sur l'efficacité de transfection des formulations. Dans ce but, nous avons mis en place différents modèles cellulaires 2D (cellules cultivées en plaque avec ou sans inducteur de mucus, à savoir EGF ou allergènes d'acariens) ou 3D (cellules cultivées en ALI pendant 3, 7 ou 14 jours), à partir des lignées épithéliales pulmonaires humaines NCI-H292 et Calu-3. Nous avons caractérisé ces modèles en mesurant leur production de mucus, par dosage de la mucine MUC5AC, et en visualisant l'épaisseur du mucus présent à la surface des cultures. De même, le mucus produit par ces modèles a été prélevé et caractérisé par rhéologie et par MPT. Enfin, la pertinence de ces modèles, pour évaluer l'activité de nouveaux vecteurs de gènes, a été étudiée à l'aide des lipoplexes obtenus avec les 6 lipides oxygénés (iC3, C4, C8, C12, C12' ou Suc12) par la méthode de préparation à partir d'un film.

Nos résultats ont montré que les cellules NCI-H292 cultivées en 2D produisent peu de mucus à l'état basal, mais que cette production peut être significativement augmentée par un traitement avec l'EGF ou avec des allergènes (extrait d'acariens). Les concentrations en MUC5AC dans le surnageant cellulaire sont alors multipliées par 8 et 16, respectivement. Les cellules Calu-3 cultivées en 2D produisent une quantité de mucus très supérieure à celle des cellules NCI-H292 non induites (concentration en MUC5AC 137 fois supérieure). La culture 3D des cellules Calu-3 (culture en ALI pendant 3, 7 ou 14 jours) permet d'atteindre des concentrations en MUC5AC encore plus élevées, et l'élévation est proportionnelle à la durée de culture en ALI. Ainsi, nous avons obtenu 6 modèles cellulaires, caractérisés par une production de mucus de quantité croissante.

Après avoir déterminé que le rapport N/P de 4 permettait d'obtenir l'efficacité de transfection la plus élevée sur le modèle Calu-3 en 2D, quel que soit le lipide testé, ce rapport a été utilisé pour comparer l'efficacité de transfection des 6 lipides dans les différents modèles, au temps 24 h après le dépôt des lipoplexes sur les cultures. Dans les cellules NCI-H292 non traitées, tous les lipides avaient une activité de transfection significative. Cette activité de transfection restait inchangée lorsque les cellules étaient traitées avec l'EGF, mais elle était réduite, pour l'ensemble des lipides, lorsque les cellules étaient traitées avec les allergènes. Dans le modèle Calu-3 en 2D, les niveaux de transfection des lipoplexes étaient plus de 10 fois plus faibles que dans les cellules NCI-H292 traitées avec les allergènes, les lipides C8 et Suc12 conservant la meilleure activité de transfection. Dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 3 jours, les niveaux de transfection étaient encore plus sévèrement réduits pour

les lipoplexes à base des lipides iC3 et C4, mais peu impactés pour les autres. À ce stade des évaluations, le lipide C8 était celui qui présentait l'activité de transfection la moins impactée, quel que soit le modèle cellulaire. Enfin, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours (présentant la plus importante production de mucus parmi les 6 modèles cellulaires), aucune activité de transfection n'était obtenue pour l'ensemble des lipoplexes. L'observation de ce modèle par microscopie confocale nous a permis de mettre en évidence la présence d'une couche de mucus de 20 μm environ, à la surface du tapis cellulaire. Une activité de transfection a été rétablie dans ce modèle en retirant, même partiellement, le mucus avant le dépôt des lipoplexes sur les cellules, ou en quantifiant l'activité de transfection 72 h, et non 24 h, après le dépôt des lipoplexes. Ces données ont permis de montrer que le mucus présent dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours était bien responsable de l'inhibition de l'activité de transfection, et non la quiescence des cellules engendrée par la durée de culture. La culture en ALI permettant d'obtenir une couche de mucus importante, d'autres lignées épithéliales pulmonaires, NCI-H292, A549 et 16HBE, ont été cultivées en ALI pendant 14 jours et leur mucus a été caractérisé quantitativement et visuellement. Dans ces conditions de culture, les cellules A549, à l'instar des cellules Calu-3, étaient recouvertes d'une couche de mucus d'une vingtaine de micromètres d'épaisseur, tandis que les cellules NCI-H292 et 16HBE n'avaient formé qu'une fine couche de mucus. L'activité de transfection était totalement inhibée dans les cellules A549, alors qu'une activité nettement détectable était présente dans les cellules NCI-H292 et 16HBE. Ceci suggère de manière intéressante qu'au-delà de la spécificité de chaque lignée cellulaire, l'impact de l'épaisseur de la couche du mucus est prédominant.

Suite à ces données de transfection, nous avons poursuivi la caractérisation du mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Ainsi, nous avons observé que ce mucus présente des propriétés rhéologiques proches de celles décrites dans la littérature pour le mucus pulmonaire humain, c'est-à-dire celles d'un gel viscoélastique ($G' > G''$) avec un angle de phase δ de $18,5^\circ$. En étudiant la diffusion des lipoplexes à base de lipide C8 dans ce mucus par MPT, nous avons également montré que parmi nos modèles de mucus, le mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours est celui qui entraîne le ralentissement le plus important des lipoplexes, en les confinant dans des pores de l'ordre du micromètre, impliquant une architecture du mucus plus complète.

Pour conclure, nous avons mis en place 6 modèles cellulaires produisant du mucus en quantité croissante, qui nous ont permis, dans la suite de notre travail, d'évaluer le potentiel (activité de transfection, sûreté) de nos formulations préparées à base de lipides monosoufrés ou polysoufrés, en présence de mucus. De plus, l'épaisseur, les propriétés rhéologiques et l'architecture du mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, font de ce modèle cellulaire, un modèle complet, en permettant l'étude des interactions entre nos formulations et le mucus (stabilité et capacité à diffuser des lipoplexes dans le mucus, activité mucolytique) en parallèle de l'évaluation de leur efficacité de transfection. Les résultats de ce travail sont présentés, de façon détaillée, dans l'article qui suit et qui a été soumis pour publication.

Mucus producing epithelium models for investigating the activity of gene delivery systems in the lung

Thomas Sonntag^a, Mickael Rapp^a, Pascal Didier^b, Luc Lebeau^a, Françoise Pons^a, Anne Casset^{a,*}

^a*Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France*

^b*Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7021, CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France*

* Corresponding author: Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France.

E-mail address: casset@unistra.fr (A. Casset)

ABSTRACT

Inhaled transfection particles have to penetrate the mucus layer lining the airways to successfully deliver their therapeutic nucleic acid payload to target cells in the underlying epithelium. However, the *in vitro* models used for evaluating gene carrier efficiency often disregard this viscous defensive barrier. In this study, the two mucus-secreting cell lines NCI-H292 and Calu-3 were selected to develop a series of epithelium models displaying gradual mucus production. In NCI-H292 models, a gradual increase in the MUC5AC mucin was obtained after cell exposure to inducers. In Calu-3 models, MUC5AC production increased as a function of culture duration (3, 7, 14 days) at the air-liquid interface (ALI). Six DOPC-derived cationic lipids were designed and their pDNA delivery activity was evaluated to validate these cellular models. The strongest impairment of the lipid delivery activity was observed in the Calu-3 14-d ALI model. The MUC5AC production in this model was the greatest and the mucus layer was 20 µm thick. The mucus exhibited a solid viscoelastic behaviour, and represented a major hindrance to lipoplex diffusion. The Calu-3 14-d ALI model will be highly useful for accurate evaluation of gene carriers intended for airway administration and characterization of their interactions with the mucus.

Keywords: gene delivery; lipoplexes; airway mucus; cell models; rheology; multiple particle tracking

Abbreviation

ALI: Air-liquid interface; CF: Cystic fibrosis; CLSM: Confocal laser scanning microscopy; DLS: Dynamic light scattering; DOPC: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-choline; EDMPC: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine; EDOPC: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine; EGF: Epidermal growth factor; EGF-R: Epidermal growth factor receptor; GL67: Genzyme lipid 67; HDM: House dust mite; L2k: Lipofectamine® 2000; LLI: Liquid-liquid interface; MPT: Multiple particle tracking; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MSD: Mean squared displacement; NTA: Nanoparticle tracking analysis; Pdl: Polydispersity index; pDNA: plasmid DNA; Rh-PE: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl); rt: Room temperature; WGA: Wheat germ agglutinin

1. Introduction

Gene therapy relies on the successful delivery of therapeutic nucleic acids into target cells and holds great promise for curing congenital as well as acquired diseases. With respect to lung diseases, the pulmonary route is considered as a highly accessible and noninvasive administration route for therapeutics, including gene therapy products. It offers several advantages when compared to the systemic route, such as reduced drug side effects and limited interaction of drugs with serum proteins, and requires lower drug doses. On these bases, a large variety of gene carriers have been developed for lung gene therapy. First to be developed, the viral gene vectors have rapidly shown some limitations such as toxicity, insufficient gene transfer in human airways requiring repeated administrations, and therapy-inactivating immunogenicity. Non-viral gene carriers have been developed as an alternative, including polymer- and lipid-based vectors. Although they are generally less effective for intracellularly delivering nucleic acids, non-viral carriers are less toxic and less immunogenic than viral vectors, and their mass production is more feasible and much less costly. Among lipid-based gene vectors available to date, the Genzyme lipid 67 (GL67) is by far the most advanced in the clinic for the treatment of obstructive lung diseases by inhaled gene therapy. Nevertheless, its last clinical evaluation with repeated nebulization provided a significant but moderate improvement in lung function in patients with cystic fibrosis (CF) (Alton et al., 2015), suggesting that further work has still to be conducted to improve the bioavailability of gene carriers in the lung. Recently, a new family of biodegradable nucleic acid carriers derived from the 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), a major constituent of biological membranes, has been developed and transfection efficiency of these carriers was demonstrated *in vitro* and *in vivo* (Pierrat et al., 2013b, 2016b). Upon airway administration, these cationic DOPC-detergent conjugates outperformed the best performing GL67-based formulation (GL67A), showing that these new delivery systems might be promising for lung gene therapy (Pierrat et al., 2016a). Nevertheless, in the particular case of administration into the lung, the transfection particles have to overcome the airway mucus, that constitutes a viscous defensive line which is overproduced in obstructive lung diseases.

Airway mucus consists in a viscoelastic gel which contains a complex mixture of water (*ca.* 95%), glycoproteins (mucins, *ca.* 2-5%), non-mucin proteins, salts, lipids, DNA, cells, and cellular debris (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2006). Thus, mucins are the major component of the mucus, and MUC5AC and MUC5B are the two main mucins of the human airway mucus. MUC5AC is secreted by goblet cells and MUC5B by submucosal glands (Hovenberg et al., 1996; Reid et al., 1997; Thornton et al., 2008). Mucin proteins contain alternating regions of globular hydrophobic domains and polyanionic oligosaccharide brushes mainly composed of sialic acid and sulfated groups. The globular hydrophobic domains are composed of cysteine residues and hydrophobic amino acids involved in intradomain disulfide bonds and hydrophobic interactions between mucin fibers. The high sialic acid and sulfate content confers a strong net-negative surface charge to the biopolymer and imparts stiffness of the mucin superstructure *via* electrostatic repulsions (Leal et al., 2017). In addition, cysteine-rich domains in the C-terminal region of the mucin protein core enable the formation of oligomers *via* disulfide bridge formation, leading to a cross-linked mucin 3D-array of molecular weight ranging from 0.5 to 20 MDa and with a mesh structure and marked viscoelastic properties (Carlstedt and Sheehan, 1989; Leal et al., 2017; Thornton and Sheehan, 2004). This grants mucus the ability to adsorb a wide range of molecules and particles (Demouveau et al., 2018). Besides, mucus is continuously secreted (1.5-2 L, daily), forming a dynamic layer on epithelial cells that is in constant movement. The thickness of this mucus blanket is determined by the balance between the rate of mucin secretion and degradation. Clearance of the mucus from the lower airways to the pharynx through the beating of cilia from epithelial cells enables a complete renewal of the mucus layer every 20 minutes in healthy subjects (Di Gioia et al., 2015). This mucociliary clearance acts as a dynamic barrier to protect the respiratory tract from inhaled microorganisms, particles or drug molecules adsorbed or trapped in the mucus mesh structure (Murgia et al., 2018). Therefore, airway mucus constitutes a physiological barrier due to i-its viscoelastic properties and mesh-spacing, resulting in size filtering mechanisms, ii-its composition and net-negative surface charge, resulting in interaction filtering mechanisms, and iii-its rapid turnover, resulting in very short time window for successful delivery of therapeutic particles, including nucleic acid-containing particles, to epithelial cells.

In patients with obstructive lung diseases such as CF, chronic obstructive pulmonary disease or asthma, mucus hypersecretion and (or) increase in mucus viscoelasticity are found, expanding the already complicated process of delivering therapeutic agents through the airways. In gene therapy strategies, rationally-designed approaches have been proposed to develop carriers capable of perfusing the altered mucus barrier and reaching the underlying target epithelial cells, taking into account that the thickness of the mucus layer covering the human airway epithelium from the trachea to the bronchi varies from 10 to 30 μm , and 2 to 5 μm , respectively (Kurbatova et al., 2015; Leal et al., 2017). However, cellular models usually used to evaluate gene transfer efficiency contain no or very low amount of mucus which may lead to significantly overrated performances of the investigated carriers (Aissaoui et al.,

2011; Mastorakos et al., 2015; Osman et al., 2018; Raik et al., 2018; Suk et al., 2011b). Thus, cell culture models better mimicking *in vivo* physiological conditions are needed, and multiple parameters related to the intrinsic properties of the mucus layer in these models (*e.g.*, mucus composition, viscoelastic properties, layer thickness...) should be considered for ultimately getting relevant data for a proper evaluation of gene carriers.

In our quest for efficient carriers for gene delivery through the airways, we were pushed to design original biodegradable DOPC-derived cationic lipids based on results that were previously obtained with DOPC-detergent conjugates (Fig. 1) (Pierrat et al., 2012, 2013a, 2013b, 2016b, 2016c, 2016a). However, in order to do a proper evaluation of the plasmid DNA (pDNA) delivery activity of these DOPC-based cationic lipids in the context of airway administration, we decided to improve the standard cell models commonly used in the field of lung gene therapy and develop more relevant ones with adjustable levels of mucus, with a particular emphasis on the characterization of the rheology and thickness of the mucus produced by these models and the capacity of the transfection particles to diffuse through it. To establish our cell models and evaluate the effect of the mucus layer on gene transfer activity of our new carriers, two main human pulmonary cell lines, the NCI-H292 and Calu-3 cells were used. These cells were cultured in plates and on inserts, and treated, or not, with mucus inducers or cultured at the air-liquid interface (ALI) to obtain 2D- or 3D-models producing increasing amount of mucus (Table 1). NCI-H292 cells are human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cells known to constitutively express the epidermal growth factor receptor (EGF-R) which stimulation by its ligands results in MUC5AC production (Takeyama et al., 1999, 2000). Therefore, EGF and house dust mite (HDM) allergen extract were used to set up NCI-H292 2D-models with increased mucus production. Calu-3 cells are submucosal-gland carcinoma cells producing mucus when cultured in plates, and whose mucus production can be modulated by ALI culture on inserts (Kreda et al., 2007; Kreft et al., 2015). This cell line was thus used to set up 2D- and 3D-models (Table 1). In some experiments, 3D-models of NCI-H292, A549 or 16HBE were also used (Table 1). In the obtained cultures, mucus production was characterized by assessing MUC5AC levels in culture supernatants (2D-models) or in collected mucus samples (3D-models), and/or by visualizing mucus layer on the top of cultures by confocal microscopy (3D-models). These cellular models allowed us to investigate and finely characterize properties of mucus by rheology and transfection particle diffusion by multiple particle tracking (MPT). As well, gene transfer efficiency of our DOPC-derived gene carriers was evaluated in these different *in vitro* models to probe the impact of mucus on their activity.

Table 1. 2D- and 3D-models used in the study. In 2D-models, NCI-H292 and Calu-3 cells were grown in plates and treated, or not, with EGF or mite allergen. In 3D-models, the different cell lines were cultured on inserts at the ALI for 3 (3-d ALI), 7 (7-d ALI) or 14 d (14-d ALI).

Model	Cell line	Treatment/Culture duration
2D (plate)	NCI-H292	None EGF Allergen
	Calu-3	None
3D (insert)	Calu-3	3,7 or 14-d ALI
	16HBE	14-d ALI
	A549	14-d ALI
	NCI-H292	14-d ALI

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Cell lines

The human epithelial adenocarcinoma cell line Calu-3 (HTB-55), the human epithelial mucoepidermoid carcinoma cell line NCI-H292 (CRL-1848), and the human epithelial carcinoma cell line A549 (CCL-185) were purchased from ATCC-LGC (Molsheim, France). The SV40ori-transformed human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- (16HBE) was a generous gift from Dr D. Gruenert (California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco, CA, USA).

2.1.2. Reagents

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), bovine serum albumin (BSA), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and epidermal growth factor (EGF) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Allergen extract from the HDM *Dermatophagoides pteronyssinus* was from Greer Laboratories (Worcester, MA, USA). Culture media (DMEM/F12, Opti-MEM, and RPMI-1640), fetal bovine serum (FBS) and other medium supplements were from GIBCO-BRL (Cergy-Pontoise, France). Lipofectamine® 2000 (L2k) was obtained from Invitrogen (Cergy-

Pontoise, France). Plasmid encoding for *Gaussia* luciferase (pCMV-Gluc, 5.8 kbp) and *Gaussia* luciferase substrate, coelenterazine, were purchased from Nanolight Technology (Pinetop, AZ, USA). Alexa-647[®]-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Goat anti-mouse IgG1 and mouse anti-human MUC5AC IgG1 (clone 45M1) were from Jackson ImmunoResearch (Cambridgeshire, UK) and Abcam (Cambridge, UK), respectively. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rh-PE) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

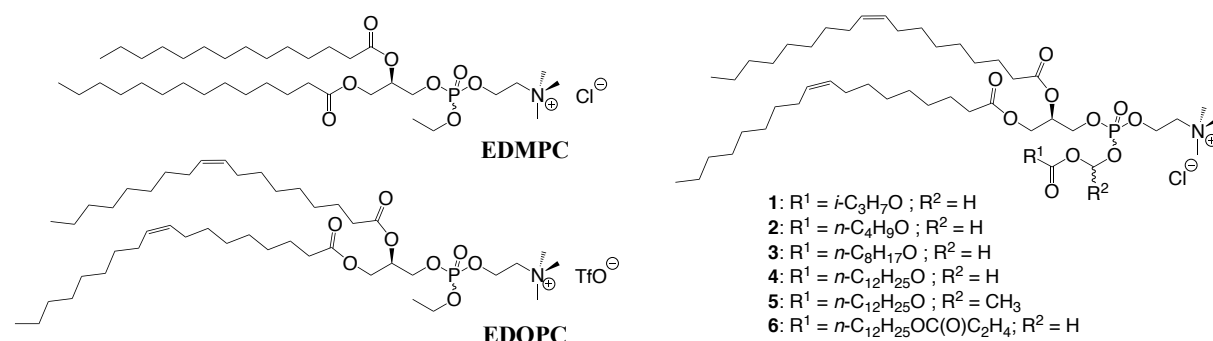


Fig. 1. Chemical structure of EDMPC (Gorman et al., 1997), EDOPC (MacDonald et al., 1999) and of the biolabile DOPC-based cationic lipids 1-6 investigated herein.

2.2. Methods

2.2.1. Lipid synthesis

The detailed synthesis and characterization of the 6 cationic lipids investigated herein are provided as Supplementary Material.

2.2.2. Lipoplex preparation

Appropriate volumes according to the desired charge ratio (lipid ammonium/pDNA phosphate ratio, N/P) of a freshly prepared ethanolic solution of a cationic lipid (1-6) were deposited at the bottom of polyethylene tubes and dried under vacuum for 1 h using a SpeedVac concentrator. Then, 40 µL of a pCMV-Gluc solution (0.02 µg/µL prepared in 5% (w/w) glucose) were added to each tube. The tubes were stirred by vortex for 20 s and allowed to stand at rt for 30 min before the resulting lipoplex preparations were used. The pDNA-L2k-based formulations were prepared as recommended by the manufacturer. Briefly, pDNA and L2k were diluted at the appropriate concentration in Opti-MEM[®] medium. pDNA was then added to L2k (1:1, v/v) and the mixture was incubated for 5 min before use.

2.2.3. Measurement of size and zeta potential of the lipoplexes

The average diameter of lipoplexes was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer[®]

nano-ZS instrument (Malvern Instruments, Palaiseau, France) at 25 °C with a scattering angle of 173°. Freshly prepared lipoplexes were diluted to the tenth in a 5% glucose solution before measurement. The Z-averaged sizes and polydispersity indexes (PDI) were obtained by cumulant analysis of the autocorrelation function. Each analysis, giving an average of 3 measurements, was carried out on 3 independent preparations. Simultaneously, the size distribution and the concentration of lipoplex preparations were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a Zetaview® instrument (Particle Metrix GmbH, Inning, Germany). The samples were diluted to reach the optimal range of 50 to 200 particles per frame and measurements were made at rt. For each sample, videos were acquired for 8 s at the frame rate of 3.75 s⁻¹, as recommended by the manufacturer with regard to the size range of the particles. Detected tracks were analyzed using the Zetaview® software and translated into particle size distribution profile from which the mean diameter of the particles was expressed. Zeta potential (ζ -potential) of the lipoplexes was determined at 25 °C on samples diluted to the tenth in a 5% glucose solution, using the Zetasizer® nano-ZS instrument. Measurements were performed on 3 independent preparations and analyzed with the Zetasizer® software, using the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation. Data were expressed as mean value \pm standard deviation (SD).

2.2.4. Cell culture

A549, Calu-3 and 16HBE cells were grown in a DMEM/F12 medium containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 5 mM HEPES and 2 mM L-Glutamine. NCI-H292 cells were grown in a RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-Glutamine. All cultures were carried out in culture flasks using a humidified incubator at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. At 80-100% confluency, cells were released from the flasks with trypsin-EDTA (0.05%, w/w, in PBS) and transferred into new flasks, to establish subcultures, or seeded in 96-well culture plates (2D-models) or on polyethylene terephthalate inserts with 0.4 μ m pore size (3D-models), for experiments. Calu-3, NCI-H292, 16HBE and A549 cells were used from passage 26 to 38, 10 to 37, 54 to 62, and 84 to 101, respectively.

For experiments, Calu-3 and NCI-H292 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1.0×10^5 and 3.0×10^4 cells/well, respectively, in 100 μ L of culture medium. Calu-3 cells were seeded on 24-well inserts at a density of 1.5×10^5 cells/insert in 400 μ L of culture medium, or on 6-well inserts at a density of 2.1×10^6 cells/insert in 2.5 mL of culture medium. NCI-H292, 16HBE and A549 cells were seeded on 24-well inserts at a density of 1.0×10^5 , 1.1×10^5 and 6×10^4 cells/insert, respectively, in 400 μ L of culture medium. The medium in both compartments of the inserts was changed three times a week until cells formed a confluent layer. After cells had reached confluency, apical culture medium was removed and cultures were maintained at the ALI for 3, 7 or 14 d. Meanwhile, the medium at the basolateral side of the inserts was changed three times a week. For some experiments, Calu-3 cell

cultures on inserts were maintained at the liquid-liquid interface (LLI) for 14 d after reaching confluency.

2.2.4.1. Induction of mucus production in the NCI-H292 2D-models

NCI-H292 cells were seeded in 96-well plates as described above and grown for 72 h until culture confluency. Then, they were starved of serum for 24 h by changing complete medium for FBS-free medium. Afterwards, mucus production was induced by exposing cells to EGF (25 ng/mL in FBS-free culture medium) or a HDM allergen extract (1 µg Der p 1/mL in FBS-free culture medium) for 24 h. Cells exposed to FBS-free culture medium were used as control (untreated cells). Mucus sample collection or transfection experiments in these 2D-models were carried out at the end of the 24-h incubation period as described below.

2.2.4.2. Induction of mucus production in the Calu-3 3D-models

Calu-3 cells were seeded on 24-well inserts as described above and grown for 72 h until culture confluency. Then, apical culture medium was removed and cells were grown at the ALI for 3, 7 or 14 d. Mucus sample collection or transfection experiments in these 3D-models were conducted afterwards as described below.

2.2.4.3. Transfection experiments

Transfection experiments were conducted on 2D-models, 3D-models without mucus removal, 3D-models after mucus removal and on cell cultures on inserts at the LLI. In the 2D-models, cells grown in plates were exposed to freshly prepared lipoplexes at the desired N/P ratio by adding 10 µL of preparation to the cell culture supernatant. In the 3D-models without mucus removal, 100 µL of culture medium were deposited in the apical compartment of inserts just before adding 10 µL of lipoplexes. In the 3D-models with mucus removal, 100 µL of culture medium were deposited in the apical compartment of the insert at day 14 of ALI culture. The day after, the culture medium in the apical compartment was removed with the mucus and replaced by 100 µL of fresh culture medium, just before adding 10 µL of the lipoplex preparations. On insert cultures maintained at the LLI, 10 µL of the lipoplex preparations were added to the culture medium present in the apical compartment of the inserts. In all cases, the pDNA quantity added to the cultures was 0.2 µg/well or insert. Cultures exposed to an equal volume of a 5% glucose solution were used as negative control. Transfection efficiency was evaluated after a 24-h exposure by measuring luciferase activity in the culture supernatant. To do so, coelenterazine (1.5 µM) was added to an aliquot of culture supernatant and light production was measured for 1 s using a Centro LB960 XS luminometer (Berthold Technologies, Thoiry, France). A time course experiment was also performed on the 14-d Calu-3 3D-model without mucus removal, as

described above, with transfection efficiency measurements after 24, 48, or 72-h of exposure to lipoplex preparations. In all experiments, each sample was assessed in triplicate and luminescence values (expressed as RLU/well or insert) were normalized to the basal luminescence measured in negative controls.

2.2.5. Mucus sample collection and characterization

2.2.5.1. Mucus sample collection

Mucus samples were collected from NCI-H292 2D-models, Calu-3 2D- and 3D-models and Calu-3 cultures on inserts at the LLI as follow. For 2D-models, culture supernatant was collected 24 h after cell seeding (Calu-3 cells) or after a 24-h mucus induction by EGF or allergen (NCI-H292 cells). In the 3D-models, culture medium (100 μ L for 24-well inserts and 1 mL for 6-well inserts) was deposited in the apical compartment of the inserts and collected back 24 h later by gently pipetting. In the Calu-3 cultures on inserts at the LLI, culture medium supernatant was collected after 14 d of culture. Mucus samples were used extemporaneously for rheological or MPT analyses. They were centrifuged at $3,000 \times g$ for 5 min to discard cell debris and stored at -20°C for MUC5AC assay.

2.2.5.2. MUC5AC assay

MUC5AC protein was assayed in mucus samples by ELISA. Frozen samples were thawed, distributed into the wells of a titration plate (Maxisorp Nunc immuno plate, Thermo Scientific) and incubated overnight at 40°C . The coated plate was then washed 3 times with PBS-0.05% Tween[®] 20 and blocked at rt for 1 h with a 2% BSA solution prepared in PBS. Wells were washed again 3 times and exposed for 2 h to a monoclonal mouse IgG1 directed against the human MUC5AC. After another step of washings, samples were incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG. Finally, after a last washing step, the peroxidase substrate, TMB, was added to each well for peroxidase measurement. The reaction was stopped with 0.5 N H_2SO_4 and absorbance of the samples was measured at 450 nm with a plate reader (Varioskan Lux, Thermo Scientific). Results were expressed as arbitrary units. They correspond to the mean \pm SEM of at least 3 independent experiments.

2.2.5.3. Mucus observation by confocal laser scanning microscopy

Mucus on 3D-cultures was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) after mucin labelling with the WGA. On the day of observation, the culture was gently washed with PBS and Alexa-647[®]-labeled WGA (100 μ L of a 5 $\mu\text{g/mL}$ solution in PBS) was added on the top of the cells for a 10-min incubation period at 37°C . After WGA removal and cell washing with PBS, the insert membrane was cut and mounted onto a microscope slide using a permanent aqueous mounting medium (Bio-Rad).

Samples were then observed (NA = 1.4) after excitation at 635 nm and detection from 650 to 735 nm, using a Leica SP2 confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a 63 × oil immersion objective. Images were acquired every 0.8 μm from the top of the mucus layer (defined as $z = 0 \mu\text{m}$) to 40 μm depth. To avoid excitation intensity decrease with deepness, laser power was configured to progressively increase while scanning deeper into the samples. The same increase scale and observation parameters were used for all samples. For each section, two images were acquired and averaged. 3D representations were reconstructed from image stacks using the Fiji image processing software and its 3D Viewer plug-in.

2.2.5.4. *Mucus rheology*

Rheological properties of mucus samples collected from Calu-3 3D-cultures were analyzed on a Haake Mars 60 Rheometer (Thermo Electron, Karlsruhe, Germany) equipped with a 25-mm plate-plate geometry. The temperature-controlled Peltier plate was allowed to equilibrate at 37 °C for 2 min before sample deposition (180 μL). After another equilibration period, oscillatory measurements were performed at 37 °C, using a gap width of 0.3 mm between the two plates. The linear viscoelastic region of the samples was determined by performing a stress sweep (0.0001–10) at 1 Hz (6.28 rad/s). The elastic or storage moduli (G'), the viscous or loss moduli (G''), and the phase angle (δ) dependence to frequency were then evaluated by performing frequency sweeps (0.1–17.8 Hz) in the linear viscoelastic region (constant stress of 0.01). The phase angle or loss tangent value δ , calculated from the inverse tangent of the ratio G''/G' (with $\tan(\delta) = G''(\omega)/G'(\omega)$), is usually determined at the frequency (ω) of 1 rad/s to approximate the low velocity of mucociliary clearance in mucus rheological studies (Innes et al., 2009). The phase angle δ ranges between 0° for a Hookean solid and 90° for an ideal liquid, thereby $\delta < 45^\circ$ characterizes viscoelastic solids. Measurements were performed on 3 independent mucus samples.

2.2.5.5. *Multiple particle tracking experiments*

MPT was used to study lipoplex diffusion in the mucus collected from Calu-3 3D-cultures. Fresh mucus samples (200 μL) were deposited into each well of an IbiTreat® μ-slides (1.5 polymer coverslip, IBIDI, Gräfelting, Germany). Freshly prepared lipoplexes (50 μL) labelled by adding 1:100 molar ratio of Rh-PE in the lipid ethanolic solution at the time of lipoplex preparation (see protocol above) were subsequently deposited on mucus samples and incubated for 2 h at 37 °C. Prior to particle tracking analysis, the remaining liquid on the mucus layer was slowly removed by pipetting. Complete cell culture medium was used as a negative control in each experiment to evaluate the diffusion of lipoplexes in the absence of mucus. Widefield imaging of the samples was performed on a home-built setup based on a Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon Instruments, Melville, NY, USA) equipped with a 100 × oil-

immersion objective (NA = 1.49) and coupled to a 532 nm cw laser. Emission from the samples was spectrally filtered with the help of a dichroic mirror (Di02-R532-25x36) and a long pass filter (Semrock BLP01-532R-25), and was then imaged on an ImagEM CCD camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). An additional lens was used to obtain a final magnification of $150 \times$ corresponding to a pixel size of 106.67 nm. Immobilized particles at the bottom of the well were discarded from observation by defining the baseline of the observation areas. Then, mucus observation areas were randomly chosen between 0 up to 40 μm after checking the absence of residual cells by transmitted light observation to avoid tracking potential intracellular lipoplexes. Five thousand frame videos were acquired in the chosen observation areas. At least 100 lipoplexes were tracked for at least 200 frames in each experimental condition. Thereafter, acquired videos were analyzed using the Fiji software after application of a gaussian blur to facilitate the subsequent tracking. Lipoplexes were tracked and their trajectories were extracted by the particle tracker plug-in (Sbalzarini and Koumoutsakos, 2005) using the following set of parameters: radius 6-18, cut-off 0.001, Per/Abs 0.1 to 0.5, link range 2 and displacement 10. Positions of the lipoplexes at each time interval were then exported to the Igor Pro 8 software to calculate their mean squared displacements (MSDs) using the following equation:

$$MSD = 1/(N - n) \sum_{i=1}^{N-n} |x_{i+n} - x_i|^2 \quad , \quad n = 1, \dots, N - 1$$

where N is the number of consecutive two-dimensional positions of a particle $x_i = (x_i, y_i)$ recorded with a constant time interval Δt over a period of time $T = (N - 1)\Delta t$. MSDs were fitted with a model of confined diffusion (Saxton and Jacobson, 1997; Wagner et al., 2017), defined by:

$$MSD = r_c^2 \times (1 - A_1 \exp(-4A_2 D t / r_c^2))$$

where r_c corresponds to the radius of the confinement, D to the diffusion coefficient, and the constants A_1 and A_2 (here both fixed at 1) characterize the shape of the confinement. From the MSD fit of each individual particle, the D and the r_c of tracked lipoplexes were then calculated. A cut-off was established for the r_c values based on mucus structure analysis in the literature in order to exclude non-physiologic values. A 5 μm cut-off was applied to the r_c from trajectories obtained in the mucus before data analyses and representations (Meziu et al., 2021).

2.2.6. Statistical analysis of the results

Data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software. In the bar chart representations, statistical differences between groups were evaluated by one or two-way ANOVA followed by the Dunnett's or the Tukey test. The Pearson's correlation test was applied to evaluate the correlation and calculate the Pearson's r . Data were considered as significantly different when p value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Lipid synthesis

In 1997, Gorman *et al.* were the first to demonstrate that a phospholipid-derived phosphotriester (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC, Fig. 1) can mediate intracellular gene delivery (Gorman *et al.*, 1997). Thereafter, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (EDOPC, Fig. 1) and other PC derivatives have been developed by MacDonald *et al.* and their physical and transfection properties extensively investigated (Kennedy *et al.*, 2000; Koynova and MacDonald, 2003; Koynova *et al.*, 2006, 2009; MacDonald *et al.*, 1999, 2006; Rakhmanova *et al.*, 2000; Rosenzweig *et al.*, 2000; Tenchov *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). Later on, DOPC-detergent conjugates have been proposed that showed extended fusogenic properties and improved gene delivery capabilities (Pierrat *et al.*, 2012, 2016c). And more recently, a sophisticated version of these DOPC-based compounds, with programmed biodegradability and lower cytotoxicity, has been described. These last DOPC-derived carriers incorporate a biolabile phospho(alkyl)enecarbonate moiety that pushes transfection efficiency to another level (Pierrat *et al.*, 2013a, 2013a, 2016b, 2016c, 2016a). As was demonstrated, these carriers are sensitive to hydrolysis depending on pH conditions and are potential substrates for various enzymes. Upon hydrolysis or metabolization, they are transformed into DOPC. This zwitterionic phospholipid is a major constituent of the cell membranes and thus lacks any toxicity. Furthermore, the electrostatic interactions with the anionic nucleic acid payload cannot be maintained and the latter is slowly decondensed and released. On the timing of this decondensation/release, in the extracellular milieu, in the endosome or lysosome compartments, in the cytosol or the nucleus, depends the overall transfection rate.

Focusing on the biodegradability of such gene carriers, we prepared a series of 6 related phosphotriesters in order to perform extensive evaluation in characterized mucus-producing airway epithelium models (Fig. 1). Varying the structure of substituents R¹ and R² in the compounds allows for the modulation of their hydrolytic stability, as was shown previously (Pierrat *et al.*, 2013a, 2016b). Cationic lipids **1-3** were prepared by reacting DOPC with chloromethyl *i*-propyl carbonate, chloromethyl *n*-butyl carbonate, and chloromethyl *n*-octyl carbonate, respectively. The detailed synthetic procedures and full characterization of these compounds are provided as supplementary materials. The synthesis of compounds **4-6** has already been reported elsewhere (Pierrat *et al.*, 2013a).

3.2. Physicochemical characterization of the lipoplexes

The ability of cationic lipids **1-6** to interact with nucleic acids and form lipoplexes was determined by conventional electrophoretic retardation assay. Charge ratios ranging from 0.8 to 5 were evaluated to identify for each lipid the minimal N/P value at which pDNA is integrally condensed into particles. All

the lipids fully retarded pDNA at N/P 2, except compound **5** that required a N/P ratio of 4 (Fig. S1). This can be explained by the lower stability of this compound in aqueous media (Pierrat et al., 2013a). Lipoplexes formed at N/P ratio of 4 exhibited Z-averaged sizes ranging from 400 to 750 nm with a polydispersity index (PDI) higher than 0.2 revealing polydisperse distributions, regardless the lipid (Table 2). NTA size measurements gave similar values with sizes between 450 and 570 nm. Polydisperse distributions were also revealed by span indices superior to 1.2. The largest pDNA complexes were obtained with cationic lipid **4**, either measured by DLS or NTA, with values of 751 and 567 nm, respectively. This is consistent with the lowest particle concentration achieved with that compound (0.4×10^{10} particles/mL). Also consistent with the electrophoresis data, all the lipoplexes were positively charged at the N/P ratio of 4 and exhibited a ζ -potential value around +35-45 mV.

Table 2. Physical characteristics of the lipid/pDNA complexes prepared from compounds **1** to **6** at N/P of 4. Data are mean values \pm SD of at least 3 independent experiments.

Compound	DLS			NTA		
	Z-average (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	Size (nm)	Span	Particles/mL ($\times 10^{10}$)
1	394 \pm 12	0.248 \pm 0.021	+44 \pm 3	491 \pm 17	1.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
2	409 \pm 45	0.320 \pm 0.063	+40 \pm 7	451 \pm 40	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2
3	546 \pm 88	0.385 \pm 0.033	+44 \pm 5	505 \pm 20	1.3 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
4	751 \pm 151	0.309 \pm 0.064	+36 \pm 11	567 \pm 32	1.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2
5	634 \pm 107	0.438 \pm 0.051	+43 \pm 5	497 \pm 46	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
6	541 \pm 62	0.288 \pm 0.100	+41 \pm 5	504 \pm 36	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3

3.3. Mucus production in the different culture models

Mucus production by the NCI-H292 and Calu-3 2D- and/or 3D-models (Table 1) was characterized by measuring MUC5AC protein levels by ELISA. The MUC5AC production varied significantly in the three NCI-H292 2D-models. It was low in untreated NCI-H292 cultures, but increased significantly by 8- ($p < 0.01$) and 16-fold ($p < 0.001$) when the cultures were exposed to EGF and allergen, respectively (Fig. 2A). MUC5AC production by Calu-3 cells grown in plates without further treatment (2D-model) was 137 times greater than the one of the untreated NCI-H292 2D-model. These data were confirmed by quantifying the total mucin content in the culture supernatants by enzyme-linked lectin assay (ELLA), as this content increased with the levels of MUC5AC protein (Fig. S2).

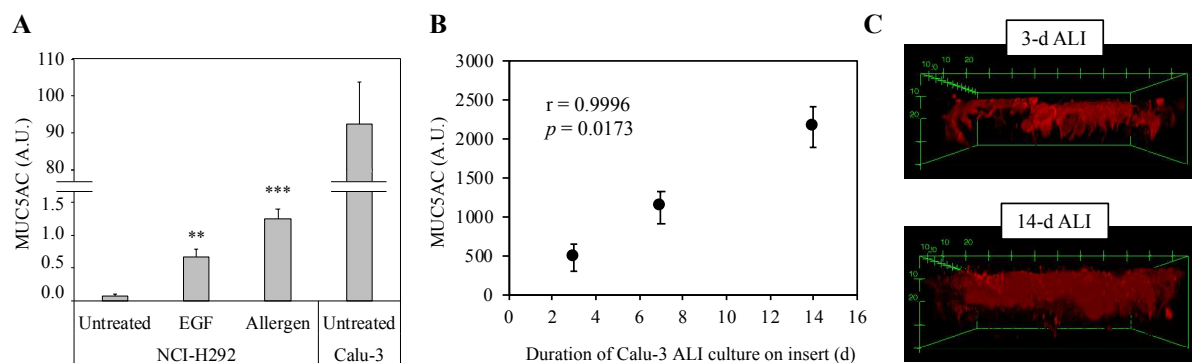


Fig. 2. Mucus production in the NCI-H292 and Calu-3 2D- and/or 3D-models. **(A)** NCI-H292 or Calu-3 cells were grown in plates with or without treatment with EGF or allergen for 24 h (2D-models). **(B-C)** Calu-3 cells were cultured on inserts at the ALI for 3, 7 or 14 d. **(A-B)** MUC5AC levels in the supernatant of cultures grown in plates or in the mucus collected at the surface of cultures grown on inserts, as determined by ELISA. Data are mean values \pm SEM of at least 3 independent experiments. **(A)** Statistical significance between NCI-H292 groups was determined by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test (** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; vs. the untreated group). **(B)** Statistical significance of the data was determined by the Pearson's correlation test. **(C)** Orthogonal projection of (x,z) sections of the 3-d or 14-d Calu-3 3D-model, as acquired by CLSM. Mucins (red) are stained by Alexa-647[®]-labeled WGA. Spatial system unit (green): μ m.

In the Calu-3 3D-models, the amount of MUC5AC protein increased significantly with the number of culture days at the ALI, namely 3, 7 or 14 ($r = 0.9996$, $p = 0.0173$) (Fig. 2B). The mucus layer covering the cells cultured for 3 and 14 d was observed after insert staining with Alexa-647[®]-labeled WGA (red fluorescence). For each condition, optical sections acquired by CLSM were processed in order to create an orthogonal projection (Fig. 2C). The mucus layer increased in thickness with the number of culture days at the ALI. It was clearly thicker in the 14-d culture, reaching approximately 20 μ m, which is consistent with the MUC5AC protein levels measured by ELISA (Fig. 2B). Thus, using two cell lines and different culture conditions and treatments, we developed *in vitro* models with increasing quantity of secreted mucus, forming layers of different thicknesses.

3.4. Lipid-mediated transfection activity in the different culture models

We then evaluated how mucus secretion observed in the above described culture models impairs the pDNA delivery activity of our DOPC-based lipids, and of Lipofectamine[®] 2000 used as a control. As a preliminary study, we assessed the transfection activity of the various lipids at different N/P ratios, to determine for each one the N/P ratio offering the optimal transgene expression. This study was carried out in the Calu-3 2D-model which is characterized by a mucus secretion of middle intensity, *i.e.*, higher than in the NCI-H292 2D-models but lower than in the Calu-3 3D-models (Fig. 2). The tested N/P ratios ranged from 1 to 4, based on pDNA complexation experiments (Fig. S1). Viability of transfected cells was determined in parallel to assess safety of the lipoplexes. All the lipids exhibited a transfection activity that increased with the N/P ratio up to N/P of 4, with minimal viability loss ($< 30\%$) whatever the N/P ratio (Fig. 3). A test with lipid 3 at higher N/P ratios confirmed the ratio of 4 to be optimal to obtain maximal gene expression and minimal toxicity (data not shown). Consequently, this N/P ratio

was selected for further evaluation of the pDNA delivery activity of lipids **1-6** in the NCI-H292 and Calu-3 2D- and/or 3D-models, as well as in all subsequent transfection experiments.

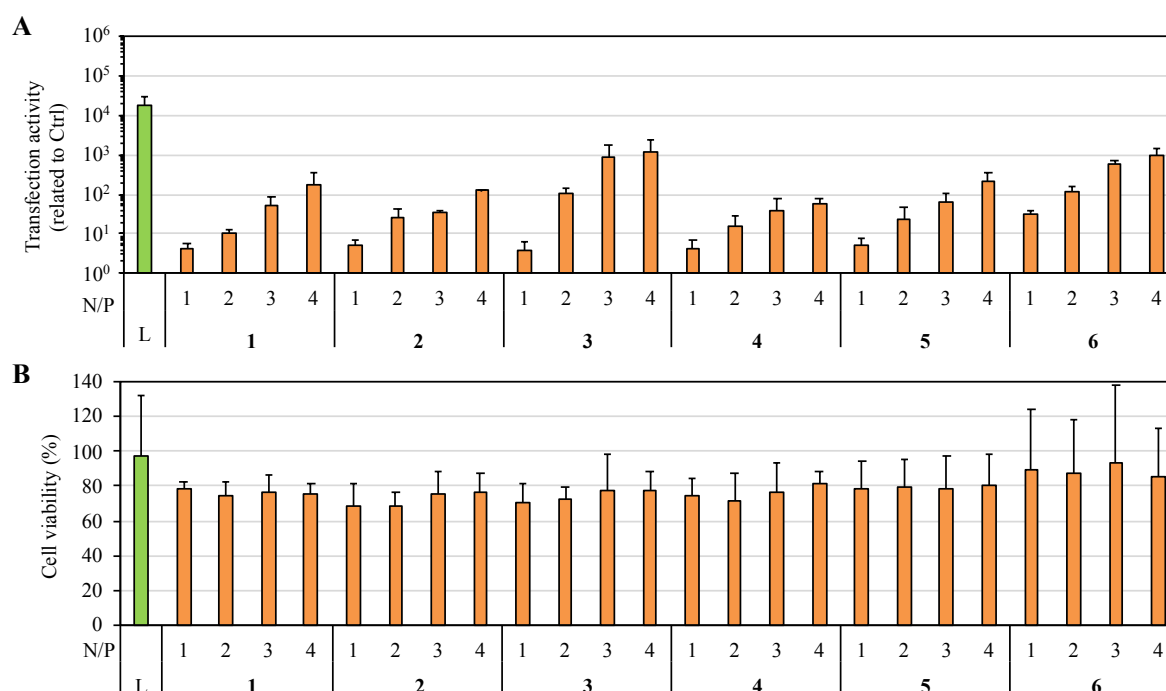


Fig. 3. Transfection efficiency of the lipids **1-6**, as a function of the N/P ratio in the Calu-3 2D-model. Calu-3 cells were grown in plates without further treatment and exposed to **1-6**/pDNA complexes at N/P of 1, 2, 3 or 4. **(A)** Luciferase activity was normalized to the luminescence measured in untransfected cells (*i.e.* 5.8×10^4 RLU/well). **(B)** Cell viability was assessed by mitochondrial activity measurements using the MTT assay. Data were expressed as percent of mitochondrial activity measured in untransfected cells. L2k (L) was used as a positive control. Data are mean values \pm SD of 2 independent experiments performed in triplicate.

In the different NCI-H292 2D-models, all the investigated lipids as well as L2k mediated significant transgene expression (Fig. 4A). Transfection was of similar rate for all the lipids in untreated cells and in the EGF-exposed model. Activity of lipids **1-6** and L2k tend however to decrease in allergen-exposed cultures that exhibited a greater increase in MUC5AC secretion (16-fold) than EGF-treated ones (8-fold). In this model, lipid **3** performed slightly better than the other carriers. In the Calu-3 2D-model, the general transfection activity profile was roughly preserved when comparing the carriers with each other, but transgene expression was decreased by one to two orders of magnitude with respect to the allergen-treated NCI-H292 2D-model (Fig. 4B), which is consistent with the greater MUC5AC production by Calu-3 cells when compared to allergen-treated NCI-H292 cells (cf. Fig. 2A). Lipids **3** and **6** were slightly less impacted, whereas lipids **1**, **2**, **4** and **5** exhibited similar activity. At last, in the Calu-3 3D-models, transfection activity of the lipids and L2k was much severely affected as a function of mucus production (Fig. 4B). In the 3-d ALI model, activity of **3**, **4**, **5** and **6** revealed similar to that in the Calu-3 2D-model, but that of **1** and **2** was significantly lowered. In the 14-d ALI model, none of the lipids, nor L2k, were able to transfect cells. It is worth to note that in all models, cell viability was not affected by any of the lipids, nor L2k (Fig. S3). Thus, in the 14-d ALI Calu-3 model, characterized by

the more abundant MUC5AC secretion forming a mucus layer of 20 μm thickness, none of the investigated carriers could mediate any measurable transfection signal.

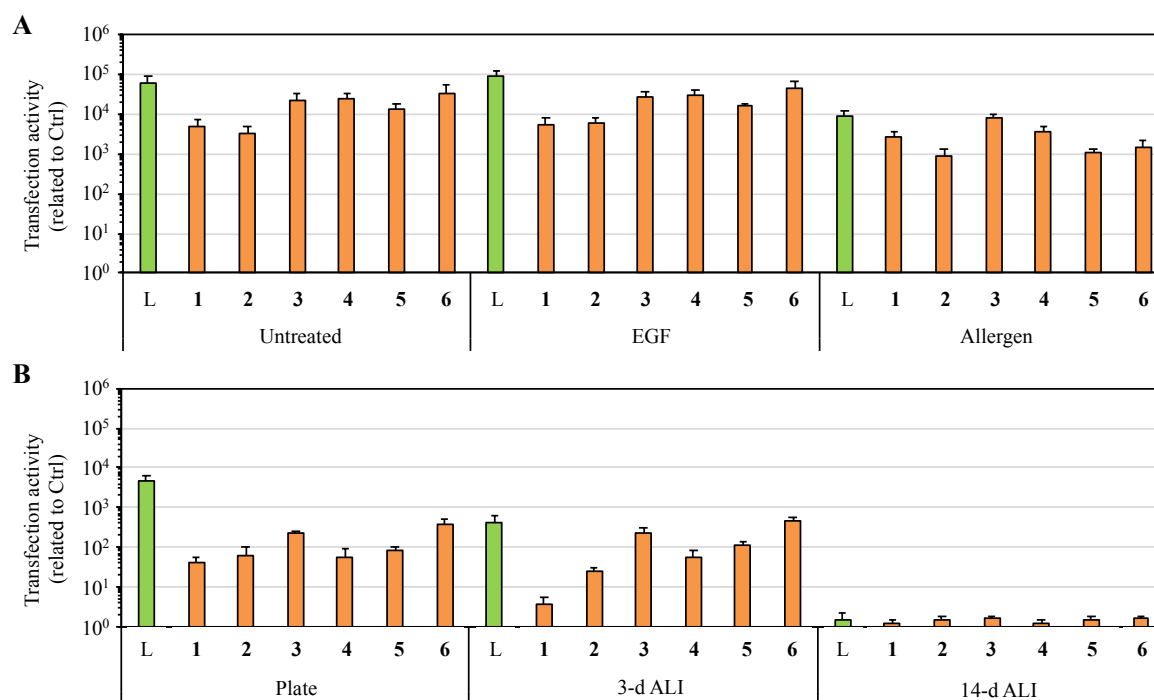


Fig. 4. pDNA transfection mediated by the lipids 1-6 and L2k in the different culture models. **(A)** Luciferase expression in the NCI-H292 2D-models (untreated, or EGF- or allergen-treated) exposed to the 1- to 6-based lipoplexes (N/P of 4) or to L2k/pDNA formulation (L). Luciferase activity was normalized to the basal luminescence measured in untransfected cells (1.9×10^5 , 1.9×10^5 , and 2.0×10^5 RLU/well in untreated and EGF- and allergen-treated cells, resp.). **(B)** Luciferase activity in the Calu-3 2D-model (plate) and 3D-models (3-d ALI and 14-d ALI) exposed to the 1- to 6-based lipoplexes (N/P 4) or L2k/pDNA formulations. The luminescence of the untransfected cells was 2.2×10^5 , 0.7×10^5 , and 0.4×10^5 RLU/well, in the 2D-model and the 3-d ALI and 14-d ALI models, resp. Data presented are mean values \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicate.

To determine whether mucus produced by Calu-3 cells grown on inserts at the ALI for 14 d was solely responsible for the drastic decrease of gene delivery efficiency of our carriers, we first checked that Calu-3 cells had kept their ability to be transfected after 14 d of culture on inserts. To do so, transfection rate of the 3/pDNA complexes, which proved the most potent in the different models, was measured on Calu-3 cells grown on inserts at the LLI for 14 d and compared to the rate obtained in the Calu-3 2D-model (Fig. S4A). Results showed that 3/pDNA complexes generated a significant transfection signal in Calu-3 cells grown on inserts at the LLI for 14 d, as did L2k/pDNA, suggesting that 14-d culture duration on insert had no impact on the sensitivity of Calu-3 cells to the transfection reagents. Interestingly, levels of luciferase activity measured in these cultures were similar to that in the Calu-3 2D-model (Fig. S4A). As the two models were characterized by similar levels of MUC5AC secretion (Fig. S4B), the correlation previously found between transfection activity and mucus production is further supported. Besides, transfection activity of 3/pDNA and L2k/pDNA complexes

was evaluated in the Calu-3 14-d ALI model over an extended period of time. Some activity was observed at 48 and/or 72 h (Fig. S5), comforting the idea that ALI culture was not responsible for the loss of activity of the vectors. At last, partial removal of mucus on the Calu-3 cultures after a 14d-period at the ALI was directly associated with a restoration of the transfection activity of both 3/pDNA and L2k/pDNA complexes (Fig. S6), fully demonstrating that total loss of transfection activity in the Calu-3 14d-ALI model after a 24-h exposure period resulted from increased mucus secretion acting as a barrier for carrier/pDNA complexes.

3.5. Effect of mucus thickness on gene delivery in various 3D-models

In the above described data, 3D-models established with Calu-3 cells exhibited a mucus layer which thickness increased with culture duration at the ALI, and the 14-d ALI model that was characterized by the presence of a thick layer resulted in the most potent impairment of gene transfer. To further investigate the effect of mucus thickness on transfection, we established similar 3D-models with three other pulmonary cell lines, namely NCI-H292, 16HBE and A549 (Fig. 5). These models were characterized by measuring MUC5AC secretion, visualizing mucus layer by CLSM, and assessing transfection activity of the L2k/pDNA formulation. Calu-3 and A549 models secreted higher amounts of MUC5AC than the NCI-H292 model, whereas the 16HBE model was characterized by almost no MUC5AC secretion (Fig. 5A). Along with these data, CLSM observations allowed separation of the 4 models into 2 groups: thin mucus layer models including the NCI-H292 and 16HBE models, and thick mucus layer models including the Calu-3 and A549 models (Fig. 5C). Transfection assays performed with L2k/pDNA complexes showed some significant luciferase activity in the NCI-H292 and 16HBE models and no activity in the Calu-3 and A549 models (Fig. 5B). These data provide another confirmation that mucus layer thickness is the major obstacle limiting gene delivery to the airway epithelium.

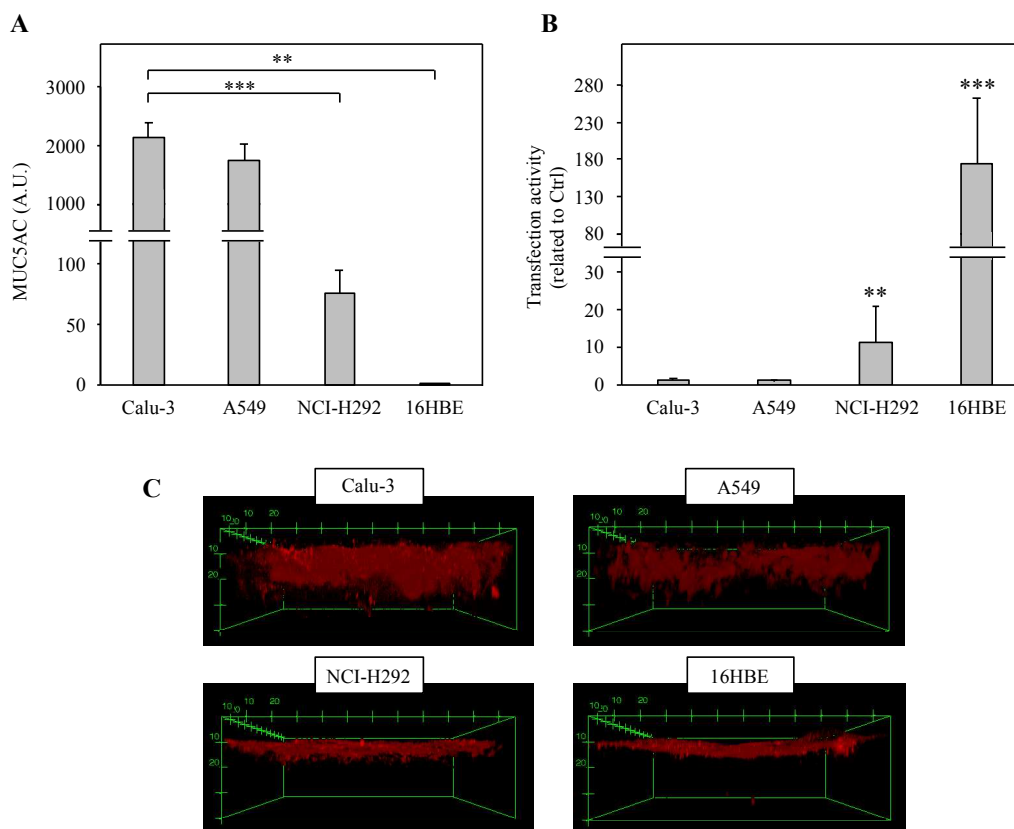


Fig. 5. Mucus production and transfection efficiency in various 3D-models. Calu-3, A549, NCI-H292 and 16HBE cells were grown on inserts at the ALI for 14 d and exposed to L2k/pDNA formulation (L) before assessment of mucus production and transfection activity. **(A)** MUC5AC protein in the mucus collected from the different models was assessed by ELISA. Data are mean values \pm SEM of 2 (A549 and 16HBE) or 3 (Calu-3 and NCI-H292) independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by a Dunnett's test ($**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ vs. Calu-3 cells). **(B)** Luciferase activity in the different models. Luciferase activity was normalized to the basal luminescence measured in untransfected cells (2.5×10^4 , 2.4×10^4 , 2.8×10^4 , and 1.2×10^6 RLU/insert for Calu-3, A549, NCI-H292, and 16HBE cultures, resp.). Data are mean values \pm SEM of 3 to 5 independent experiments performed in triplicate. Statistical differences between transfected and control cells was determined by the Student's test ($**p < 0.01$ and $***p < 0.001$). **(C)** Orthogonal projection of (x,z) sections of Calu-3, A549, NCI-H292 and 16HBE cultures, as acquired by CLSM. Mucins (red) are stained by Alexa-647[®]-labeled WGA. Spatial system unit (green): μm .

3.6. Macro- and micro-rheological properties of mucus produced by Calu-3 3D-models

The rheological behavior of the mucus can be determined at the macroscale, useful to characterize its physical properties, and at the microscale, necessary to identify the effective characteristics of its 3D network which both are decisive for the diffusion of transfection particles. To further characterize the potential of the Calu-3 3D-models as highly relevant models for investigating intracellular delivery of transfection particles through the airways, the mucus covering Calu-3 cells grown on inserts at the ALI for 7 or 14 d was collected and its macro-rheological properties were investigated using a rheometer equipped with a plate-plate geometry. The frequency-dependent elastic (G') and viscous (G'') moduli were used to characterize the viscoelastic nature of the collected mucus. They were first tested over a large scale of strain (γ) to determine the viscoelastic linear range that revealed to extend up to *ca.* 10%

(Fig. S7). A strain of 1% was therefore chosen to investigate the frequency dependence of G' and G'' (Fig. 6). The general viscoelastic properties of the Calu-3 mucus increased with the ALI culture duration. Indeed, the elastic and the viscous moduli of the 14-d ALI mucus were 12.6- and 12.0-times greater, respectively, than those of the 7-d ALI mucus. However, it is to note that the mucus collected after 7-d cultures already presented a solid viscoelastic behavior (defined by a phase angle δ below 45°), as its δ value was $19.5 \pm 4.5^\circ$, and similar to the δ value of the mucus collected after 14 d of culture ($18.5 \pm 0.6^\circ$). Besides, the elastic modulus was always higher than the viscous one ($G' > G''$) revealing that mucus already showed an elastic behavior after 7 d of culture. Overall, rheological properties of both mucus presented a G' predominance and a weak dependence of G' and G'' on frequency indicative of cross-linked gels, as previously reported for human airway mucus (Innes et al., 2009; Murgia et al., 2017; Schuster et al., 2013). Nevertheless, the increase in G' and G'' between the 7-d and 14-d ALI mucus indicated both increased cross-linking and concentration of mucins. Consequently, varying the duration of the Calu-3 cell culture at the ALI offers models of bronchial epithelium mucus with different physical characteristics.

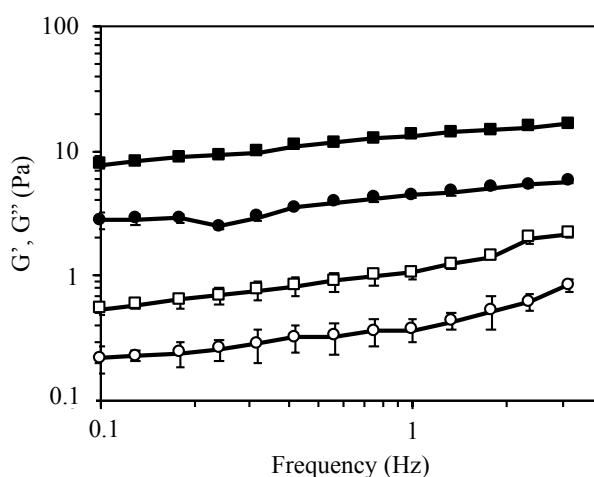


Fig. 6. Bulk rheology of the mucus produced by Calu-3 cells grown at the ALI for 7 (open symbols) and 14 d (solid symbols). Frequency-dependent storage (G' , \square) and loss (G'' , \circ) moduli were recorded as a function of frequency at 1% strain. Data presented are mean values \pm SD of 3 mucus samples obtained from different cultures.

To characterize the micro-rheology of the Calu-3 cell mucus, we analyzed the diffusive properties of 3/pDNA lipoplexes in mucus samples collected from the Calu-3 2D- and 3D-models by MPT. Fig. 7A presents calculated individual MSDs of 100 lipoplexes which were randomly and equally selected among independent experiments performed in culture medium, in mucus collected from Calu-3 cultures conducted in plates (2D-model) or on inserts at the ALI for 7 or 14 d (3D-models). These qualitative data reveal a trend toward an increasing hindrance of lipoplex diffusion in mucus produced by the 3D-models, with the 14-d model showing the highest hindrance. Distribution of the individual lipoplex diffusion coefficients calculated from the MSDs are presented in Fig. 7B. Diffusion properties of lipoplexes in the mucus collected from the 2D-model were quite similar to those observed in culture

medium, supporting the idea of a lack of 3D structure of this mucus. In this mucus, 43% of the lipoplexes displayed diffusion coefficient values below the modal interval of their distribution. In the mucus collected from the 7-d and 14-d 3D-models, distribution analysis underlined that 67% and 84% of lipoplexes, respectively, displayed diffusion coefficients below this modal interval considered as a threshold. Therefore, 41% more lipoplexes were hindered in the 14-d ALI mucus compared to mucus collected from the 2D-model. Reinforcing these qualitative and descriptive data, the mean diffusion coefficients of the lipoplexes in the 7-d and 14-d ALI mucus were statistically decreased when compared to the mucus produced in the 2D-model (Fig. 7C). This decrease did perfectly correlate with MUC5AC levels in the different mucus (squared linear correlation coefficient of 0.97) (Fig. 7D).

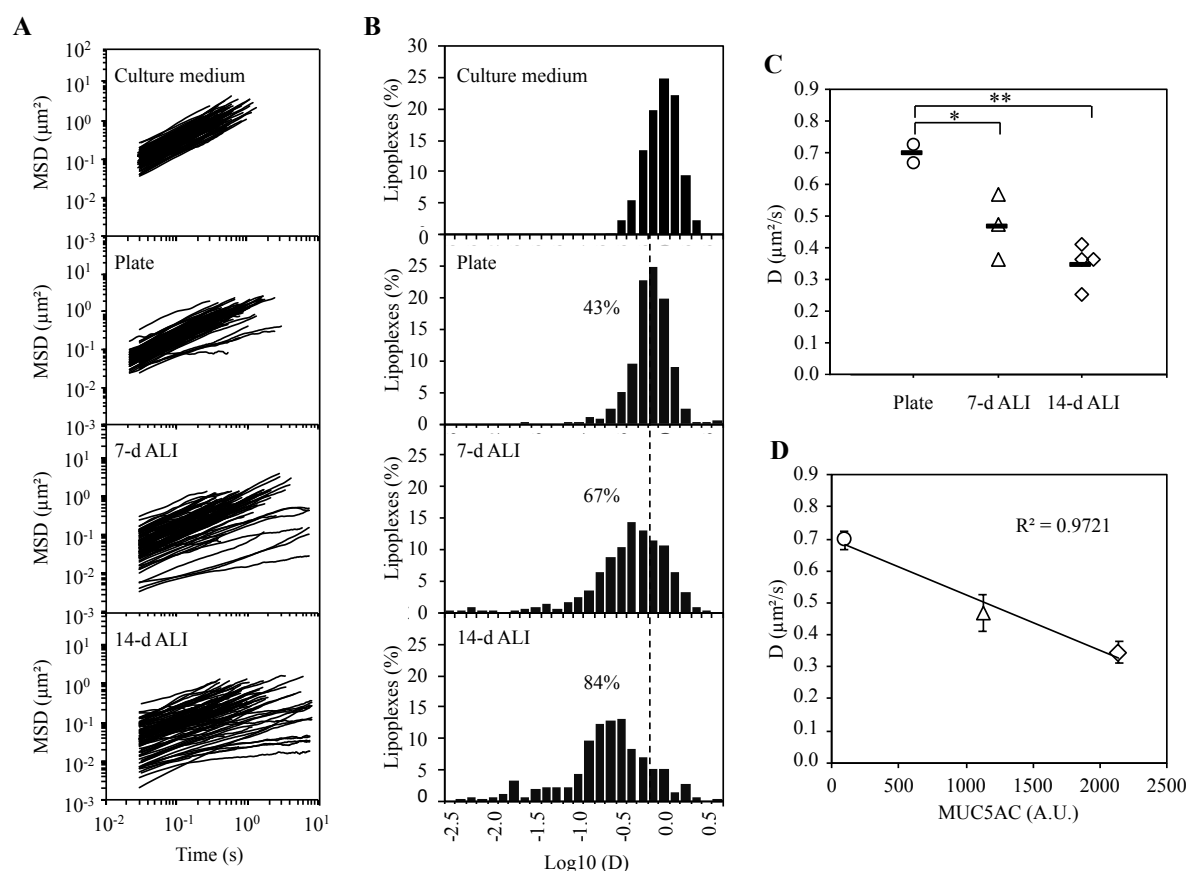


Fig. 7. Diffusion of 3/pDNA lipoplexes (N/P of 4) in mucus collected from Calu-3 2D- and 3D-models, as determined by MPT analysis. **(A)** Individual MSDs (100 trajectories) of lipoplexes in culture medium (n = 5), or in the mucus collected from Calu-3 cells grown in plates (n = 2), or on inserts for 7 (n = 3) or 14 d (n = 4). **(B)** Distribution of the logarithm of the diffusion coefficient of individual lipoplexes in culture medium (435 trajectories) or in mucus from Calu-3 cells grown in plates (334 trajectories), or on inserts for 7 (504 trajectories) or 14 d (309 trajectories). Percentages indicated on the graphs represent the amount of lipoplexes showing lower diffusion coefficients than the modal value observed in the mucus from Calu-3 cells grown in plates (dotted line). **(C)** Mean diffusion coefficients (bold line) of lipoplexes were calculated in each condition cited above. Data presented are mean values from 2 to 4 independent experiments (Calu-3 2D-model (\circ), 7-d ALI model (Δ), and 14-d ALI model (\diamond)). Statistical significance between the indicated groups was determined by one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test with $*p < 0.05$ and $**p < 0.001$. **(D)** Mean diffusion coefficients of the lipoplexes in mucus from Calu-3 cells grown in plates or on inserts as a function of MUC5AC content in mucus samples (as determined by ELISA).

Confinement radiuses were calculated from the MSDs of the **3**/pDNA lipoplexes after being fitted with the model of confined diffusion described above (Fig. 8). Distribution analysis indicated high polydispersity of confinement areas of lipoplexes in the mucus from the 2D-model (Fig. 8A). These results reinforced the hypothesis that this mucus lacks 3D structure. On the contrary, confinement radiuses of transfection particles in the mucus from Calu-3 cells cultured on inserts at the ALI for 14 d (14-d 3D-model) displayed a narrower distribution with a predominant size of confinement areas between 0.5 and 0.6 μm . Furthermore, the mean confinement radius calculated for this mucus was statistically decreased when compared to the mean confinement radius calculated for the two other mucus tested (Fig. 8B). In order to represent graphically these differences, we calculated an MSD fit for the trajectory of each lipoplex and an average MSD fit for each experimental condition, using 334 ($n = 2$ independent experiments), 504 ($n = 3$) and 309 trajectories ($n = 4$) for the mucus collected from Calu-3 cells grown in plate, and on insert at the ALI for 7 and 14 d, respectively (Fig. 8C). Reduced confinement areas of the lipoplexes in Calu-3 mucus were observed with increasing culture duration at the ALI. Thus, with lower diffusion of lipoplexes and smaller confinement areas, the mucus produced by Calu-3 cells grown on inserts at the ALI for 14 d was characterized by higher mucus density and a 3D structure with a tighter mesh. These overall results confirmed the difference of mucus structure when modulating mucus production by adapting cell culture conditions. The Calu-3 cells grown on inserts at the ALI for 14 d and its mucus may thus constitute a useful complete tool to study impairment of diffusion and transfection activity of gene delivery systems intended for airway administration.

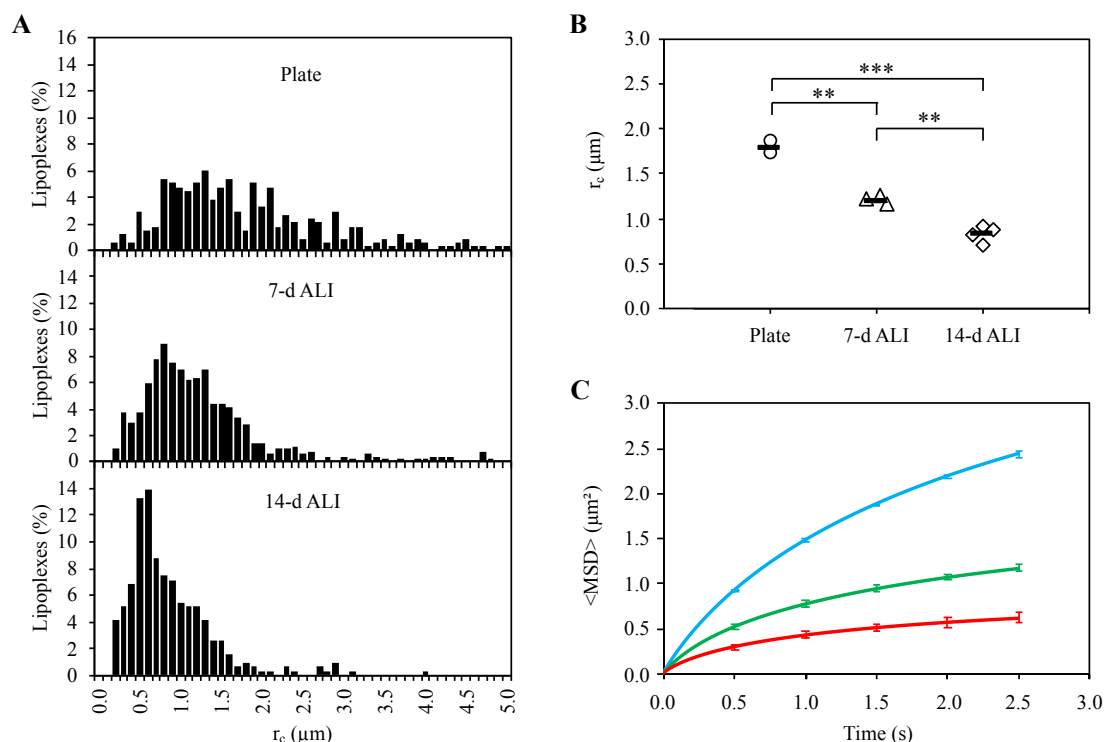


Fig. 8. Confinement areas of 3/pDNA lipoplexes in mucus collected from Calu-3 2D- and 3D-models, as determined by MPT analysis. **(A)** Distribution of the confinement radii calculated from the MSD of individual lipoplexes measured in mucus from Calu-3 cells grown in plate (334 trajectories) or on inserts at the ALI for 7 (504 trajectories) or 14 d (309 trajectories). **(B)** Mean confinement radii (bold line) were calculated in each condition cited above. Data presented are mean values from 2 to 4 independent experiments (Calu-3 2D-model (\circ), 7-d ALI model (Δ), and 14-d ALI model (\diamond)). Statistical significance between the indicated conditions was determined by one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test with $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$. **(C)** Averaged MSD fit of the lipoplexes in mucus from Calu-3 cells grown in plates (blue), or on inserts at the ALI for 7 (green) or 14 d (red). Data presented are mean values \pm SEM from 2 to 4 independent experiments.

4. Discussion

The therapeutic efficiency of nucleic acid delivery to the lungs following inhalation depends on the capacity of the transfection particles to overcome barriers, particularly the mucus layer covering the airways and forming an efficient extracellular fence. We have set up and characterized different epithelium cellular models with adjustable levels of mucus of various quality in order to more reliably evaluate the efficiency of nucleic acid carriers for delivering their therapeutic payload in the airways. Using these models, we evaluated a series of 6 biodegradable gene carriers derived from the major constituent of cell membranes, DOPC. The transfection particles made thereof did transfect pulmonary cells, albeit with variable efficiency depending on the cellular type, NCI-H292 or Calu-3 cells, and the amount and properties of mucus they had produced. We observed that mucus produced by Calu-3 cells grown on inserts at the ALI for 14 d best mimicked the situation found in the lung tissue, in terms of thickness and rheological properties, and resulted in the strongest impairment of the gene delivery activity of the transfection particles.

Mucus characteristics result from a cross-linked structure due to numerous disulfide bridges between mucins, a stiffness of this structure due to hydrophobic domains and charge repulsion, and a strong net negative charge of mucins due to the high sialic acid and sulfate content. Taken all together, these properties induce filtering processes based on the size and charge of transfection particles, drastically altering penetration of these particles into the mucus for reaching the airway epithelium (Lieleg et al., 2010). The structural analysis of airway mucus by cryo-scanning electron microscopy reported a highly heterogenous mesh-like structure with pore sizes in the range of 1-10 μm (Kirch et al., 2012; Vukosavljevic et al., 2017). However, a questioning on the porous network has progressively emerged and some authors have recently shown that it could be artificially generated from a non-porous structure during the sublimation step of a mucus sample while prepared for cryo-scanning electron microscopy analysis (Meziu et al., 2021). Furthermore, in this study, Meziu *et al.* analyzed the human airway mucus in its hydrated state using multiple labeling and CLSM, and described this mucus as a rather compact material, which does not exhibit a regular pattern of pores. Some studies have previously shown that negatively charged particles less than 200 nm in diameter can diffuse easily in the mucus, contrary to larger particles (500 nm) which were trapped (Murgia et al., 2016; Schuster et al., 2013). Nevertheless, a rapid transport of nanoparticles of 500 nm in diameter with a dense poly(ethyleneglycol) coating has been described in the cervicovaginal mucus, while the mesh spacing for this material was reported to range from 20 to 200 nm (Lai et al., 2007). This supports the possibility of their diffusion through low viscosity channels in mucus, which is consistent with the results of Meziu *et al.* (Lai et al., 2007; Meziu et al., 2021). In the present study, lipoplexes prepared with the cationic DOPC-based carriers at the N/P ratio of 4 exhibited a diameter ranging from 400 to 750 nm with polydisperse distribution and a ζ -potential of +35 to +45 mV. Therefore, the size and positive charge of the transfection particles produced with our carriers, and their polydispersity, make them good candidates to test the relevance of the mucus properties in our cellular models.

The role of mucus as a barrier in the airways has been extensively studied in the field of lung gene therapy, and various models have been set up to evaluate the activity of gene carriers. One strategy was to investigate separately the influence of mucus main components (linear DNA, bovine or porcine mucin, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, albumin...) on the stability of the transfection particles, or to add, one by one, mucus components to the culture medium in transfection experiments (Ibrahim et al., 2011; Sanders et al., 2001). Another strategy was to cover a cell culture with a mucus model, such as CF sputum, bronchial secretions or tracheal mucus from patients, to study its influence on reporter gene expression or internalization of transfection particles (Murgia et al., 2018; Rosenecker et al., 2003). Limitations of gene transfer efficiency has also been studied *ex vivo* in a sheep tracheal epithelium explant maintained at the ALI (Ferrari et al., 2001). At last, fully differentiated and polarized bronchial epithelium model obtained by culturing primary cells on semi-permeable membranes at the ALI for a prolonged period of time were proposed to constitute particularly suitable *in vitro* models of

human airways (Chu et al., 1999; Griesenbach et al., 2011b; Jiang et al., 1998). If several reports did describe interesting transfection efficiency with viral carriers in these models, non-viral vectors showed low transfection efficiency (Chu et al., 1999; Jiang et al., 1998; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2009). Nevertheless, replacement of the standard *Firefly* luciferase reporter gene by the *Gaussia* luciferase reporter gene enabled transfection experiments with non-viral vectors in these models (Griesenbach et al., 2011b). Even so, access to primary cells can be limited and the variability between donors has to be considered, while immortalized cell lines offer the advantages to be an unlimited and reproducible cell source when watching out carefully to the number of culture passaging. In the present study, we have chosen the two mucin-secreting cell lines, NCI-H292 and Calu-3 (Kreft et al., 2015; Takeyama et al., 1999), to set up a bench test for a reliable evaluation of the gene transfer capabilities of our DOPC-based gene carriers.

Previous transfection experiments had shown that NCI-H292 and Calu-3 cells could be transfected by biodegradable nucleic acid carriers derived from DOPC (Pierrat et al., 2016b). However, these cells only produce a low basal amount of mucus if not induced by specific compounds or culture conditions, and do not satisfactorily mimic the *in vivo* situation met by the transfection particles in the lung. Numerous factors have been shown to induce mucus production, and in particular secretion of the main airway mucin MUC5AC *in vitro*. These factors include cytokines (tumor necrosis factor α), interleukins (IL-1 β , IL-13, IL-17), cigarette smoke, growth factors (EGF), and allergens (Zeng and Harris, 2014), as well as cell culture on inserts at the ALI (Kreft et al., 2015). In the present study, NCI-H292 cells cultured in 2D-conditions displayed low MUC5AC production as assessed by ELISA, which is consistent with results reported by other groups using immunocytochemical analysis or periodic acid Schiff staining (Oguma et al., 2011; Takeyama et al., 1999). As well, EGF and HDM allergen extract were successfully used to increase MUC5AC production in NCI-H292 2D-cultures. The magnitude of the MUC5AC induction with EGF (8-fold) is in agreement with results reported in previous studies (Nishimoto et al., 2010; Perrais et al., 2002). As well, HDM allergen extract has previously been reported to activate the EGF-R in epithelial cells, supporting the 16-fold increase in MUC5AC production observed in our model (Heijink et al., 2007, 2010). In NCI-H292 2D-models, no decrease in transfection efficiency of our DOPC-derived carriers was observed when mucus was induced by EGF. Through activation of EGF-R, EGF triggers many biological responses including cell proliferation, which might have counterbalanced a possible limiting effect of NCI-H292 mucus on transfection (Zeng and Harris, 2014). Upon mucus induction with HDM allergen extract, a decrease in luciferase activity was observed for all evaluated lipoplexes, revealing an impairment in the pDNA delivery activity of the DOPC-based carriers by the mucus of NCI-H292 cells. The Calu-3 2D-model was characterized by a mucus production that was 137-fold greater than the one of untreated NCI-H292 cells. This high basal mucus production in Calu-3 cells, in agreement with previous reports (Kreft et al., 2015), impacted the pDNA delivery activity of our DOPC-based carriers to different extent. The less impacted lipoplexes are those

prepared from lipids **3** and **6**. To modulate mucus production by Calu-3 cells, we cultured the cell line on inserts at the ALI, as previously described by Kreft and collaborators who achieved the formation of a pseudostratified epithelium of non-dividing cells with abundant secretory vesicles capable of mucus secretion (Kreft et al., 2015). In keeping with this previous report, we obtained 3D-models exhibiting a significant increase in MUC5AC that was linked to the number of culture days at the ALI. In the model cultured at the ALI for 3 d, the lipoplexes prepared from lipids **1** and **2**, *i.e.*, those with the shorter additional carbon chains installed on the DOPC phosphate group, were the most impacted by the mucus. The lipoplexes built from the 4 other cationic lipids did in contrast well resist the mucus effects, offering almost not affected transfection rates. In the model cultured at the ALI for 14 d, the transgene expression rate measured 24 h after exposure was however fully extinguished whatever the lipid carrier. Therefore, in the Calu-3 3D-models, the increase in MUC5AC production as a function of ALI culture duration was closely related to a decreased transfection efficiency of the DOPC-based carriers. The transfection activity of lipofectamine measured in Calu-3 cells cultured on inserts at the LLI allowed us to ascertain that 14 d of culture on inserts was not in cause of the absence of detectable transfection activity of our gene carriers. We also verified that after 14 d of culture at the ALI, significant transgene expression could be obtained in Calu-3 cells cultured on inserts by 1-removing the mucus before culture incubation with the lipoplexes as used previously by some authors in an *ex vivo* model (Ferrari et al., 2001), and 2-measuring transfection activity at later time points (48 and 72 h), in agreement with results obtained with the same gene reporter in a Mucilair® system (Griesenbach et al., 2011b). CLSM images of Calu-3 cells cultured at the ALI for 14 d revealed a mucus layer of 20 µm, which was thus thicker than the one observed on the 3-d ALI cultures. Therefore, the thick layer of mucus produced by Calu-3 cells after 14 d of culture at the ALI drastically impaired the pDNA delivery activity of the lipoplexes resulting in absence of transfection signal at the 24-h time point. This impairment of pDNA delivery could result from the incapacity of lipoplexes to diffuse fast enough in the thick mucus layer.

Mucus is a complex material made of many components, and is characterized by a viscoelastic behavior. This behavior obtained with a model of mucus is of crucial importance when attempting to accurately mimic physical properties implicated in clearance and lubrication in the airways. In order to characterize the viscoelastic properties of mucus produced in the Calu-3 3D-models, rheological measurements were performed on the bulk undiluted material collected from the cultures. Viscoelastic data on human mucus secretions obtained from *in vitro* human tissue cultures grown at the ALI are very scarce. Protocols for sample preparation previously mentioned by Hill *et al.* require extensive washing of the biopolymer for collection, dialysis for removal of cellular debris, and concentration (Hill and Button, 2012; Hill et al., 2014). The mucus-based gel obtained at the end of this process may not accurately mimic the bulk material (Duncan et al., 2016). Since cells and cellular debris are involved in the structure and the physical properties of the mucus, it seems impossible to remove these cells from the bulk mucus without altering its physical properties (Lai et al., 2009a; Meziu et al., 2021). Therefore,

we did perform all our rheological analyses on untreated mucus samples. The mucus produced by 7-d ALI cultures displayed a viscoelasticity with dominant elastic properties supported by the δ value at $19.5 \pm 4.5^\circ$, which were maintained in the mucus collected from 14-d cultures ($\delta = 18.5 \pm 0.6^\circ$). Interestingly, these properties are in line with previously reported rheological behavior of *ex-vivo* samples of human airway mucus (Murgia et al., 2017; Schuster et al., 2013). Consistently, no transfection activity was detected in Calu-3 cells cultured for 7 d (data not shown) or 14 d at the ALI, whatever the gene carrier used.

As macro-rheological properties of the mucus produced by the 14-d Calu-3 3D-model showed a viscoelastic behavior similar to that of native human mucus, this crude material was used to investigate transfection particle diffusion in the bulk. Experiments were performed with lipid **3**-based lipoplexes by MPT. MSDs determined from acquisition of particle trajectories were fitted with a model of confined diffusion. Comparison of the diffusion coefficient distributions confirmed that the mucus produced by the Calu-3 2D-model lacks a mesh-like structure, and revealed an increased hindrance to the diffusion of the lipoplexes in the mucus produced by the Calu-3 3D-models. The mean diffusion coefficient of lipoplexes in the mucus from Calu-3 7-d and 14-d ALI cultures was statistically decreased compared to that in the mucus from Calu-3 2D-cultures, and this decrease was directly related to the amounts of MUC5AC produced by the different models. A similar relation has been previously reported with a decreasing diffusion of 1 μm carboxylate-modified polystyrene particles in mucus from human bronchial epithelial cells grown at the ALI as a function of increasing concentration of mucus solids (Hill et al., 2014). Nevertheless, our lipoplexes were able to diffuse inside the mucus, supporting the idea that the thickness of the mucus played a key role in transgene expression by delaying the entry of transfection particle into the cells.

With the fit modelling of confined diffusion, we were able to approximate dimensions of the zones within the limit of which lipoplexes were preferably diffusing. The confinement radii (r_c) calculated in the mucus from the Calu-3 2D-model displayed a large range of values, but got narrower in the Calu-3 3D-models, with a predominant size of 0.5-0.6 μm in the mucus produced by the 14-d 3D-model. Considering the heterogeneity and the complex structure of mucus, the r_c distribution seems more accurate than the average confinement zone radius for evaluating the mucus structure (Meziu et al., 2021). Nevertheless, the r_c mean value calculated from 14-d 3D-model was statistically lower than those obtained for the Calu-3 2D-models and 7-d 3D-model revealing a real difference in the structure of the materials. Overall, these results demonstrated that the Calu-3 2D- and 3D-models are characterized by a gradual hindrance of the lipoplex diffusion, in parallel with narrower confinement zones for their diffusion. This combination of factors is resumed with the MSD fit of the lipoplexes in the various mucus which reflects a denser and more complex architecture of the mucus produced by the 14-d 3D-model. Therefore, the mucus produced by the Calu-3 cell cultures on inserts at the ALI for 14 d presents useful properties for a more accurate characterization of the interactions between the airway

mucus and transfection particles. The impact of a thick mucus layer on the pDNA delivery activity of our gene carriers definitely suggests that this model will be highly useful for finely investigating the properties of gene carriers intended for administration through the airways.

In summary, in the present study, we developed DOPC-based cationic lipids as gene carriers and elaborated cellular models with a mucus layer displaying adjustable properties in terms of thickness and viscoelasticity to better mimic *in vivo* physiological conditions and predict *in vivo* gene delivery efficiency of our carriers. We thus demonstrated that Calu-3 2D- and 3D-models constitute useful tools for investigating the impact of mucus on gene delivery through the airways. Moreover, we showed that the mucus produced by Calu-3 3D-models can provide complementary insights by offering the possibility to assess multiple parameters necessary to fully characterize carrier interactions with the mucus, such as mucus viscoelasticity and transfection particle diffusion. Gene delivery activity of our carriers in the developed cellular models was increasingly altered as a function of mucus quantity and thickness. Thus, these models will be useful in the future to search for and evaluate new strategies to help our carriers to overcome the mucus barrier in the airways.

Author Contributions

F.P. and L.L. supervised the project. F.P., L.L., A.C., P.D., and T.S. designed the research. T.S., M.R., and A.C. acquired the data. T.S., P.D., L.L., A.C., and F.P. contributed to data analysis. A.C., L.L., F.P. and T.S. prepared the figures and/or wrote the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR-17-CE18-0034), the Foundation for Frontier Research in Chemistry (LabEx CSC, ANR-10-LBX-026-CSC), the ITI InnoVec (IdEx, ANR-10-IDEX-0002; SFRI, ANR-20-SFRI-0012), and Vaincre la Mucoviscidose (VLM, RF20200502702/1/1/161).

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.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online.

References

- Aissaoui, A., Chami, M., Hussein, M., Miller, A.D., 2011. Efficient topical delivery of plasmid DNA to lung *in vivo* mediated by putative triggered, PEGylated pDNA nanoparticles. *J Control Release* 154, 275-284. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.06.017.
- Alton, E., Armstrong, D.K., Ashby, D., Bayfield, K.J., Bilton, D., Bloomfield, E.V., Boyd, A.C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., Carvelli, P., Chan, M., Cheng, S.H., Collie, D.D.S., Cunningham, S., Davidson, H.E., Davies, G., Davies, J.C., Davies, L.A., Dewar, M.H., Doherty, A., Donovan, J., Dwyer, N.S., Elgmati, H.I., Featherstone, R.F., Gavino, J., Gea-Sorli, S., Geddes, D.M., Gibson, J.S.R., Gill, D.R., Greening, A.P., Griesenbach, U., Hansell, D.M., Harman, K., Higgins, T.E., Hodges, S.L., Hyde, S.C., Hyndman, L., Innes, J.A., Jacob, J., Jones, N., Keogh, B.F., Limberis, M.P., Lloyd-Evans, P., Maclean, A.W., Manvell, M.C., McCormick, D., McGovern, M., McLachlan, G., Meng, C., Montero, M.A., Milligan, H., Moyce, L.J., Murray, G.D., Nicholson, A.G., Osadolor, T., Parra-Leiton, J., Porteous, D.J., Pringle, I.A., Punch, E.K., Pytel, K.M., Quittner, A.L., Rivellini, G., Saunders, C.J., Scheule, R.K., Sheard, S., Simmonds, N.J., Smith, K., Smith, S.N., Soussi, N., Soussi, S., Spearing, E.J., Stevenson, B.J., Sumner-Jones, S.G., Turkkila, M., Ureta, R.P., Waller, M.D., Wasowicz, M.Y., Wilson, J.M., Wolstenholme-Hogg, P., Consortium, U.K.C.F.G.T., 2015. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 3, 684-691. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- Bandi, S.P., Bhatnagar, S., Venuganti, V.V.K., 2021. Advanced materials for drug delivery across mucosal barriers. *Acta Biomater* 119, 13-29. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.10.031.
- Bansil, R., Turner, B.S., 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 11, 164-170. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.11.001.
- Carlstedt, I., Sheehan, J.K., 1989. Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins. *Symp Soc Exp Biol* 43, 289-316.
- Chu, Q., Tousignant, J.D., Fang, S., Jiang, C., Chen, L.H., Cheng, S.H., Scheule, R.K., Eastman, S.J., 1999. Binding and uptake of cationic lipid:pDNA complexes by polarized airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* 10, 25-36. DOI: 10.1089/10430349950019165.
- Demouveau, B., Gouyer, V., Gottrand, F., Narita, T., Desseyn, J.L., 2018. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv Colloid Interface Sci* 252, 69-82. DOI: 10.1016/j.cis.2017.12.005.

- Di Gioia, S., Trapani, A., Castellani, S., Carbone, A., Belgiovine, G., Craparo, E.F., Puglisi, G., Cavallaro, G., Trapani, G., Conese, M., 2015. Nanocomplexes for gene therapy of respiratory diseases: Targeting and overcoming the mucus barrier. *Pulm Pharmacol Ther* 34, 8-24. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.07.003.
- Duncan, G.A., Jung, J., Hanes, J., Suk, J.S., 2016. The mucus barrier to inhaled gene therapy. *Mol Ther* 24, 2043-2053. DOI: 10.1038/mt.2016.182.
- Ferrari, S., Kitson, C., Farley, R., Steel, R., Marriott, C., Parkins, D.A., Scarpa, M., Wainwright, B., Evans, M.J., Colledge, W.H., Geddes, D.M., Alton, E.W., 2001. Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Ther* 8, 1380-1386. DOI: 10.1038/sj.gt.3301525.
- Gorman, C.M., Aikawa, M., Fox, B., Fox, E., Lapuz, C., Michaud, B., Nguyen, H., Roche, E., Sawa, T., WienerKronish, J.P., 1997. Efficient *in vivo* delivery of DNA to pulmonary cells using the novel lipid EDMPC. *Gene Ther* 4, 983-992. DOI: 10.1038/sj.gt.3300473.
- Griesenbach, U., Alton, E.W., Consortium, U.K.C.F.G.T., 2009. Gene transfer to the lung: lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 128-139. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.010.
- Griesenbach, U., Vicente, C.C., Roberts, M.J., Meng, C., Soussi, S., Xenariou, S., Tennant, P., Baker, A., Baker, E., Gordon, C., Vrettou, C., McCormick, D., Coles, R., Green, A.M., Lawton, A.E., Sumner-Jones, S.G., Cheng, S.H., Scheule, R.K., Hyde, S.C., Gill, D.R., Collie, D.D., McLachlan, G., Alton, E.W., 2011b. Secreted Gaussia luciferase as a sensitive reporter gene for *in vivo* and *ex vivo* studies of airway gene transfer. *Biomaterials* 32, 2614-2624. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.001.
- Heijink, I.H., Marcel Kies, P., van Oosterhout, A.J., Postma, D.S., Kauffman, H.F., Vellenga, E., 2007. Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 351-359. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0160OC.
- Heijink, I.H., Postma, D.S., Noordhoek, J.A., Broekema, M., Kapus, A., 2010. House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 69-79. DOI: 10.1165/rcmb.2008-0449OC.
- Hill, D.B., Button, B., 2012. Establishment of respiratory air-liquid interface cultures and their use in studying mucin production, secretion, and function. *Methods Mol Biol* 842, 245-258. DOI: 10.1007/978-1-61779-513-8_15.
- Hill, D.B., Vasquez, P.A., Mellnik, J., McKinley, S.A., Vose, A., Mu, F., Henderson, A.G., Donaldson, S.H., Alexis, N.E., Boucher, R.C., Forest, M.G., 2014. A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. *PLoS One* 9, e87681. DOI: 10.1371/journal.pone.0087681.

- Hovenberg, H.W., Davies, J.R., Herrmann, A., Linden, C.J., Carlstedt, I., 1996. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J* 13, 839-847. DOI: 10.1007/BF00702348.
- Ibrahim, B.M., Park, S., Han, B., Yeo, Y., 2011. A strategy to deliver genes to cystic fibrosis lungs: a battle with environment. *J Control Release* 155, 289-295. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.039.
- Innes, A.L., Carrington, S.D., Thornton, D.J., Kirkham, S., Rousseau, K., Dougherty, R.H., Raymond, W.W., Caughey, G.H., Muller, S.J., Fahy, J.V., 2009. *Ex vivo* sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 203-210. DOI: 10.1164/rccm.200807-1056OC.
- Jiang, C., O'Connor, S.P., Fang, S.L., Wang, K.X., Marshall, J., Williams, J.L., Wilburn, B., Echelard, Y., Cheng, S.H., 1998. Efficiency of cationic lipid-mediated transfection of polarized and differentiated airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 9, 1531-1542. DOI: 10.1089/hum.1998.9.11-1531.
- Kennedy, M.T., Pozharski, E.V., Rakhmanova, V.A., MacDonald, R.C., 2000. Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes. *Biophys J* 78, 1620-1633. DOI: 10.1016/s0006-3495(00)76714-2.
- Kim, N., Duncan, G.A., Hanes, J., Suk, J.S., 2016. Barriers to inhaled gene therapy of obstructive lung diseases: A review. *J Control Release* 240, 465-488. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.031.
- Kirch, J., Schneider, A., Abou, B., Hopf, A., Schaefer, U.F., Schneider, M., Schall, C., Wagner, C., Lehr, C.M., 2012. Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18355-18360. DOI: 10.1073/pnas.1214066109.
- Koynova, R., MacDonald, R.C., 2003. Cationic O-ethylphosphatidylcholines and their lipoplexes: phase behavior aspects, structural organization and morphology. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1613, 39-48. DOI: 10.1016/s0005-2736(03)00135-4.
- Koynova, R., Tenchov, B., Wang, L., MacDonald, R.C., 2009. Hydrophobic moiety of cationic lipids strongly modulates their transfection activity. *Mol Pharm* 6, 951-958. DOI: 10.1021/mp8002573.
- Koynova, R., Wang, L., MacDonald, R.C., 2006. An intracellular lamellar-nonlamellar phase transition rationalizes the superior performance of some cationic lipid transfection agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14373-14378. DOI: 10.1073/pnas.0603085103.
- Kreda, S.M., Okada, S.F., van Heusden, C.A., O'Neal, W., Gabriel, S., Abdullah, L., Davis, C.W., Boucher, R.C., Lazarowski, E.R., 2007. Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. *J Physiol* 584, 245-259. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.139840.
- Kreft, M.E., Jerman, U.D., Lasic, E., Hevir-Kene, N., Rizner, T.L., Peternel, L., Kristan, K., 2015. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized *in vitro* model to investigate bronchial epithelial function. *Eur J Pharm Sci* 69, 1-9. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.12.017.

- Kurbatova, P., Bessonov, N., Volpert, V., Tiddens, H.A., Cornu, C., Nony, P., Caudri, D., Group, C.R.W., 2015. Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *J Theor Biol* 372, 81-88. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.02.023.
- Lai, S.K., O'Hanlon, D.E., Harrold, S., Man, S.T., Wang, Y.Y., Cone, R., Hanes, J., 2007. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1482-1487. DOI: 10.1073/pnas.0608611104.
- Lai, S.K., Wang, Y.Y., Wirtz, D., Hanes, J., 2009a. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 86-100. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.012.
- Leal, J., Smyth, H.D.C., Ghosh, D., 2017. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm* 532, 555-572. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.
- Lieleg, O., Vladescu, I., Ribbeck, K., 2010. Characterization of particle translocation through mucin hydrogels. *Biophys J* 98, 1782-1789. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.01.012.
- Liu, X., Yan, Z., Luo, M., Engelhardt, J.F., 2006. Species-specific differences in mouse and human airway epithelial biology of recombinant adeno-associated virus transduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 56-64. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0189OC.
- MacDonald, R.C., Ashley, G.W., Shida, M.M., Rakhmanova, V.A., Tarahovsky, Y.S., Pantazatos, D.P., Kennedy, M.T., Pozharski, E.V., Baker, K.A., Jones, R.D., Rosenzweig, H.S., Choi, K.L., Qiu, R.Z., McIntosh, T.J., 1999. Physical and biological properties of cationic triesters of phosphatidylcholine. *Biophys J* 77, 2612-2629. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77095-5.
- MacDonald, R.C., Gorbonos, A., Momsen, M.M., Brockman, H.L., 2006. Surface properties of dioleoyl-sn-glycerol-3-ethylphosphocholine, a cationic phosphatidylcholine transfection agent, alone and in combination with lipids or DNA. *Langmuir* 22, 2770-2779. DOI: 10.1021/la0524566.
- Mastorakos, P., da Silva, A.L., Chisholm, J., Song, E., Choi, W.K., Boyle, M.P., Morales, M.M., Hanes, J., Suk, J.S., 2015. Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 8720-8725. DOI: 10.1073/pnas.1502281112.
- Meziu, E., Koch, M., Fleddermann, J., Schwarzkopf, K., Schneider, M., Kraegeloh, A., 2021. Visualization of the structure of native human pulmonary mucus. *Int J Pharm* 597, 120238. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120238.
- Murgia, X., Loretz, B., Hartwig, O., Hittinger, M., Lehr, C.M., 2018. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 82-97. DOI: 10.1016/j.addr.2017.10.009.
- Murgia, X., Pawelzyk, P., Schaefer, U.F., Wagner, C., Willenbacher, N., Lehr, C.M., 2016. Size-limited penetration of nanoparticles into porcine respiratory mucus after aerosol deposition. *Biomacromolecules* 17, 1536-1542. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00164.
- Murgia, X., Yasar, H., Carvalho-Wodarz, C., Loretz, B., Gordon, S., Schwarzkopf, K., Schaefer, U., Lehr, C.M., 2017. Modelling the bronchial barrier in pulmonary drug delivery: A human bronchial

- epithelial cell line supplemented with human tracheal mucus. *Eur J Pharm Biopharm* 118, 79-88. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.03.020.
- Nishimoto, Y., Hisatsune, A., Katsuki, H., Miyata, T., Yokomizo, K., Isohama, Y., 2010. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression *in vivo* and *in vitro*. *J Pharmacol Sci* 113, 76-83. DOI: 10.1254/jphs.09344fp.
- Oguma, T., Asano, K., Tomomatsu, K., Kodama, M., Fukunaga, K., Shiomi, T., Ohmori, N., Ueda, S., Takihara, T., Shiraishi, Y., Sayama, K., Kagawa, S., Natori, Y., Lilly, C.M., Satoh, K., Makimura, K., Ishizaka, A., 2011. Induction of mucin and MUC5AC expression by the protease activity of *Aspergillus fumigatus* in airway epithelial cells. *J Immunol* 187, 999-1005. DOI: 10.4049/jimmunol.1002257.
- Osman, G., Rodriguez, J., Chan, S.Y., Chisholm, J., Duncan, G., Kim, N., Tatler, A.L., Shakesheff, K.M., Hanes, J., Suk, J.S., Dixon, J.E., 2018. PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J Control Release* 285, 35-45. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.001.
- Perrais, M., Pigny, P., Copin, M.C., Aubert, J.P., Van Seuning, I., 2002. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* 277, 32258-32267. DOI: 10.1074/jbc.M204862200.
- Pierrat, P., Casset, A., Didier, P., Kereselidze, D., Lux, M., Pons, F., Lebeau, L., 2016b. Cationic DOPC-detergent conjugates for safe and efficient *in vitro* and *in vivo* nucleic acid delivery. *ChemBioChem* 17, 1771-1783. DOI: 10.1002/cbic.201600302.
- Pierrat, P., Casset, A., Kereselidze, D., Lux, M., Pons, F., Lebeau, L., 2016c. DOPC-detergent conjugates: Fusogenic carriers for improved *in vitro* and *in vivo* gene delivery. *Macromol Biosci* 16, 984-989. DOI: 10.1002/mabi.201600012.
- Pierrat, P., Creusat, G., Laverny, G., Pons, F., Zuber, G., Lebeau, L., 2012. A cationic phospholipid-detergent conjugate as a new efficient carrier for siRNA delivery. *Chem-Eur J* 18, 3835-3839. DOI: 10.1002/chem.201103645.
- Pierrat, P., Kereselidze, D., Lux, M., Lebeau, L., Pons, F., 2016a. Enhanced gene delivery to the lung using biodegradable polyunsaturated cationic phosphatidylcholine-detergent conjugates. *Int J Pharm* 511, 205-218. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.012.
- Pierrat, P., Kereselidze, D., Wehrung, P., Zuber, G., Pons, F., Lebeau, L., 2013a. Bioresponsive decoupled-charge amphiphiles for liposomal delivery of DNA and siRNA. *Pharm Res* 30, 1362-1379. DOI: 10.1007/s11095-013-0976-9.
- Pierrat, P., Laverny, G., Creusat, G., Wehrung, P., Strub, J.-M., VanDorsselaer, A., Pons, F., Zuber, G., Lebeau, L., 2013b. Phospholipid-detergent conjugates as novel tools for siRNA delivery. *Chem-Eur J* 19, 2344-2355. DOI: 10.1002/chem.201203071.

- Raik, S.V., Andranovits, S., Petrova, V.A., Xu, Y., Lam, J.K., Morris, G.A., Brodskaya, A.V., Casettari, L., Kritchenkov, A.S., Skorik, Y.A., 2018. Comparative study of diethylaminoethyl-chitosan and methylglycol-chitosan as potential non-viral vectors for gene therapy. *Polymers (Basel)* 10. DOI: 10.3390/polym10040442.
- Rakhmanova, V.A., McIntosh, T.J., MacDonald, R.C., 2000. Effects of dioleoylphosphatidylethanolamine on the activity and structure of O-alkyl phosphatidylcholine-DNA transfection complexes. *Cell Mol Biol Lett* 5, 51-65.
- Rosenecker, J., Naundorf, S., Gersting, S.W., Hauck, R.W., Gessner, A., Nicklaus, P., Muller, R.H., Rudolph, C., 2003. Interaction of bronchoalveolar lavage fluid with polyplexes and lipoplexes: analysing the role of proteins and glycoproteins. *J Gene Med* 5, 49-60. DOI: 10.1002/jgm.291.
- Rosenzweig, H.S., Rakhmanova, V.A., McIntosh, T.J., MacDonald, R.C., 2000. O-alkyl dioleoylphosphatidylcholinium compounds: The effect of varying alkyl chain length on their physical properties and *in vitro* DNA transfection activity. *Bioconjugate Chem* 11, 306-313. DOI: 10.1021/bc9901144.
- Sanders, N.N., Van Rompaey, E., De Smedt, S.C., Demeester, J., 2001. Structural alterations of gene complexes by cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 486-493. DOI: 10.1164/ajrccm.164.3.2011041.
- Saxton, M.J., Jacobson, K., 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 373-399. DOI: 10.1146/annurev.biophys.26.1.373.
- Sbalzarini, I.F., Koumoutsakos, P., 2005. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J Struct Biol* 151, 182-195. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.002.
- Schuster, B.S., Suk, J.S., Woodworth, G.F., Hanes, J., 2013. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials* 34, 3439-3446. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.064.
- Suk, J.S., Boylan, N.J., Trehan, K., Tang, B.C., Schneider, C.S., Lin, J.M., Boyle, M.P., Zeitlin, P.L., Lai, S.K., Cooper, M.J., Hanes, J., 2011b. N-acetylcysteine enhances cystic fibrosis sputum penetration and airway gene transfer by highly compacted DNA nanoparticles. *Mol Ther* 19, 1981-1989. DOI: 10.1038/mt.2011.160.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Jeong Shim, J., Dao-Pick, T., Ueki, I.F., Nadel, J.A., 2000. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 164, 1546-1552. DOI: 10.4049/jimmunol.164.3.1546.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Lee, H.M., Agusti, C., Lausier, J.A., Ueki, I.F., Grattan, K.M., Nadel, J.A., 1999. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3081-3086. DOI: 10.1073/pnas.96.6.3081.
- Tenchov, B.G., Wang, L., Koynova, R., MacDonald, R.C., 2008. Modulation of a membrane lipid lamellar-nonlamellar phase transition by cationic lipids: A measure for transfection efficiency. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1778, 2405-2412. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.07.022.

- Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A., 2008. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 70, 459-486. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.
- Thornton, D.J., Sheehan, J.K., 2004. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc* 1, 54-61. DOI: 10.1513/pats.2306016.
- Vukosavljevic, B., Murgia, X., Schwarzkopf, K., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., Windbergs, M., 2017. Tracing molecular and structural changes upon mucolysis with N-acetyl cysteine in human airway mucus. *Int J Pharm* 533, 373-376. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.022.
- Wagner, T., Kroll, A., Haramagatti, C.R., Lipinski, H.G., Wiemann, M., 2017. Classification and segmentation of nanoparticle diffusion trajectories in cellular micro environments. *PLoS One* 12, e0170165. DOI: 10.1371/journal.pone.0170165.
- Wang, L., Koynova, R., Parikh, H., MacDonald, R.C., 2006. Transfection activity of binary mixtures of cationic O-substituted phosphatidylcholine derivatives: The hydrophobic core strongly modulates physical properties and DNA delivery efficacy. *Biophys J* 91, 3692-3706. DOI: 10.1529/biophysj.106.092700.
- Zeng, F., Harris, R.C., 2014. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 28, 2-11. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.01.011.
- Zhang, L., Button, B., Gabriel, S.E., Burkett, S., Yan, Y., Skiadopoulos, M.H., Dang, Y.L., Vogel, L.N., McKay, T., Mengos, A., Boucher, R.C., Collins, P.L., Pickles, R.J., 2009. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol* 7, e1000155. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000155.

Mucus producing epithelium models for investigating the activity of gene delivery systems in the lung

Thomas Sonntag, Mickael Rapp, Pascal Didier, Luc Lebeau, Françoise Pons, Anne Casset*

Supplementary information

Lipid synthesis	167
DNA complexation study by agarose gel electrophoresis	168
Viability assessment	168
Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA)	169
Supplementary figures	169
References	172

Lipid synthesis

Materials. Unless otherwise stated, all chemical reagents were purchased from Alfa Aesar (Bischheim, France) and used without purification. DOPC was from Lipoid GmbH (Germany). Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated plates (0.25 mm Silica Gel 60, F254, Merck, Darmstadt, Germany). Products were purified by flash chromatography over silica gel (Silica Gel 60, 40-63 μm , Merck, Darmstadt, Germany). NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz Avance III instrument. ^1H -, ^{13}C -, and ^{31}P -NMR chemical shifts δ are reported in ppm relative to their standard reference (^1H : CHCl_3 at 7.27 ppm, CD_2HOD at 3.31 ppm; ^{13}C : CDCl_3 at 77.0 ppm, CD_3OD at 49.00 ppm; ^{31}P : H_3PO_4 at 0.00 ppm). IR spectra were recorded on a FT-IR Nicolet 380 spectrometer in the ATR mode and absorption values ν are in wave numbers (cm^{-1}). High resolution mass spectra (HR-MS) were recorded on an Agilent Technologies 6520 Accurate Mass QToF instrument, using electrospray ionization (ESI) mode. Mass data are reported in mass units (m/z).

The synthesis of compounds 4-6 has been described elsewhere (Pierrat et al., 2013a). Compounds 1-3 were prepared as described below.

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[(iso-propyloxycarbonyl)oxy]methyl} phosphocholine chloride (1). To a solution of DOPC (200 mg, 0.25 mmol) in anhydrous CHCl_3 (2 mL) was added chloromethyl *i*-propyl carbonate (270 μL , 8 eq.) in CHCl_3 . The resulting reaction mixture was refluxed for 18 h under an argon atmosphere, cooled down at rt and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10) to yield compound **1** (61 mg, 26% yield, mixture of two diastereomers) as a waxy solid. TLC R_f 0.15 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.71-5.62 (m, 2H), 5.38-5.34 (m, 4H), 5.29-5.24 (m, 1H), 4.95 (h, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 1H); 4.63-4.58 (m, 2H); 4.40-4.11 (m, 6H), 3.51 (s, 9H), 2.34 (q, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz 4H), 2.04-2.00 (m, 8H), 1.61-1.58 (m, 6H), 1.36-1.27 (m, 46H), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 9H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ 174.4, 174.0, 153.7, 130.58 (2C), 130.2 (2C), 87.1 and 86.6, 74.6, 70.1, 67.4, 66.1, 62.5 and 62.4, 62.3, 54.5 (3C), 34.7, 34.6, 32.5 (2C), 30.3-29.7 (16C), 27.8 (4C), 25.5 (2C), 23.2 (2C), 21.8, 14.3 (2C). ^{31}P -NMR (162 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ -3.61, -3.67. IR ν 3420, 2924, 2854, 1744, 1471, 1265, 1159, 1101, 1048, 1003, 954. HR-MS (ESI+, m/z): calc. for $\text{C}_{49}\text{H}_{93}\text{NO}_{11}\text{P}^+$ 902.6481, found 902.6469.

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[(n-butyloxycarbonyl)oxy]methyl} phosphocholine chloride (2). Compound **2** was obtained as a waxy solid (45 mg, 19% yield, mixture of two diastereomers) from DOPC (200 mg, 0.25 mmol) and chloromethyl *n*-butyl carbonate (300 μL , 8 eq.) following the same protocol as described for compound **1**. TLC R_f 0.20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.72-5.63 (m, 2H), 5.37-5.33 (m, 4H), 5.28-5.24 (m, 1H), 4.63-4.59 (m, 1H); 4.36-4.11 (m, 8H), 3.51 (s, 9H), 2.32 (q, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz 4H), 2.03-2.01 (m, 8H), 1.73-1.63 (m, 6H), 1.46-1.27 (m, 42H), 0.96 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 3H);), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ 174.3,

173.9, 154.3, 130.5 (2C), 130.2 (2C), 86.6, 70.0, 69.7, 67.3, 66.1, 62.5 and 62.4, 62.2; 54.4, 34.6, 34.532.5 (2C), 31.0, 31.0-29.6 (16C), 27.7 (4C), 25.4 (2C), 23.2 (2C), 19.4, 14.3 (2C), 13.8. ^{31}P -NMR (162 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ -3.67, -3.72. IR ν 3388, 2924, 2854, 1744, 1468, 1260, 1163, 1048, 988, 948. HR-MS (ESI+, m/z): calc. for $\text{C}_{50}\text{H}_{95}\text{NO}_{11}\text{P}^+$ 916.6637, found 916.6631.

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[(n-octyloxycarbonyl)oxy]methyl} phosphocholine chloride (3). Compound **3** was obtained as a waxy solid (98 mg, 38% yield, mixture of 2 diastereomers) from DOPC (200 mg, 0.25 mmol) and chloromethyl *n*-octyl carbonate (452 mg, 8 eq.) following the same protocol as described for compound **1**. TLC R_f 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.72-5.62 (m, 2H), 5.39-5.30 (m, 4H), 5.28-5.24 (m, 1H), 4.61 (m, 2H), 4.33-4.11 (m, 8H), 3.52 (s, 9H), 2.37-2.31 (m, 4H), 2.04-1.99 (m, 8H), 1.70-1.59 (m, 6H), 1.33-1.37 (m, 50H), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 9H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 172.9, 153.5, 130.0 (2C), 129.7 (2C), 85.9, 69.6, 66.6, 65.4, 62.2, 61.9, 54.7, 34.1, 34.0, 31.9 (2C), 31.7 (2C), 29.8-29.0 (16C), 28.5, 27.2 (4C), 25.5, 24.8 (2C), 22.7 (2C), 22.6, 14.0 (3C). ^{31}P -NMR (162 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ -3.42, -3.59. IR ν 3399, 2923, 2854, 1743, 1462, 1262, 1163, 1048, 998, 950. HR-MS (ESI+, m/z): calc. for $\text{C}_{54}\text{H}_{103}\text{NO}_{11}\text{P}^+$ 972.7263, found 972.7259.

DNA complexation study by agarose gel electrophoresis

Lipoplexes were prepared as described above at N/P ratios from 0.8 to 5. Loading buffer (BlueJuice LB, Invitrogen) was added to each sample and the mixtures were deposited into the wells of a 1% agarose gel. Same quantity of DNA (0.8 $\mu\text{g}/\text{well}$) in absence of lipid was used as a control. Migration was conducted in TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) at 80 V for 50 min. The gel was then incubated for 15 min in 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide and washed in a bath of ultrapure water. DNA, highlighted by ethidium bromide, was revealed at an excitation wavelength of 312 nm using a gel imager (Amersham, GE Healthcare).

Viability assessment

In parallel of the transfection experiments, mitochondrial activity was measured by the MTT assay to evaluate the cytotoxicity of the lipoplexes. Briefly, 1 mg/mL MTT (100 μL) in fresh culture medium was added onto cultures. After 1 h, MTT was removed and DMSO (100 μL) was added to lyse cells and dissolve the reduced form of MTT. Intensity of the reduction was then evaluated by reading sample absorbance at 570 nm with a correction at 690 nm using a plate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Cell viability was expressed as the percentage of the absorbance measured for the untreated cells.

Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA)

Mucins were assayed in mucus samples collected from 2D-models by ELLA using the wheat germ agglutinin (WGA) as described previously (Chen et al., 2011). Culture supernatant containing secreted mucins were deposited in a 96-well plate (Maxisorp Nunc immuno plate, Thermo Scientific) and incubated for 2 h at 37 °C. The coated plate was then washed 3 times with PBS-0.05% tween 20 (PBST) and blocked with a 1% BSA solution prepared in PBST for 1 h at 37 °C. Wells were washed 3 times and exposed to horse-radish peroxidase-conjugated WGA (Sigma-Aldrich, 1 µg/mL in PBST) for 1 h at 37 °C. After another step of washings with PBST, the peroxidase substrate, TMB was added to each well for peroxidase activity measurement. The peroxidase reaction was stopped with 0.5 N H₂SO₄ and absorbance of the samples was measured at 450 nm with a plate reader (Varioskan Lux, Thermo Scientific). Results were expressed as arbitrary units. They correspond to the mean ± SEM of at least 3 independent experiments.

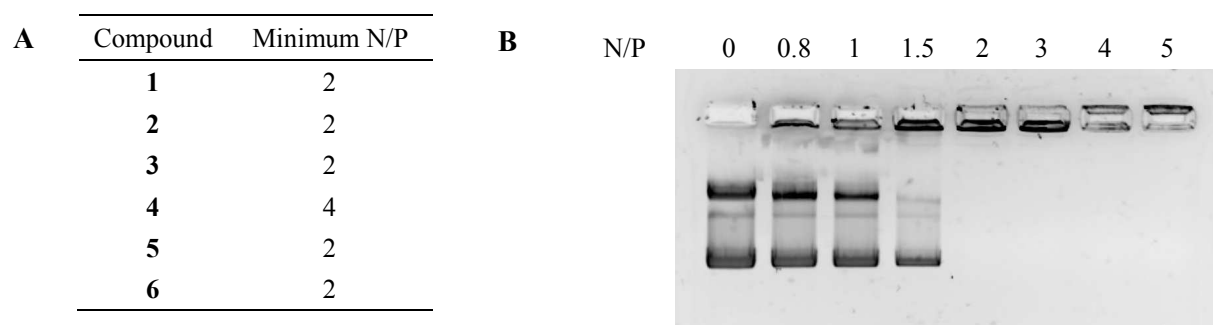


Fig. S1. DNA complexation ability of the cationic lipids **1-6**. **(A)** For each lipid, minimum N/P ratio required for complete pDNA complexation, as determined by agarose gel electrophoresis in at least 2 independent experiments. **(B)** Typical example of a gel retardation assay, as obtained for the pDNA complexes prepared with lipid **4**.

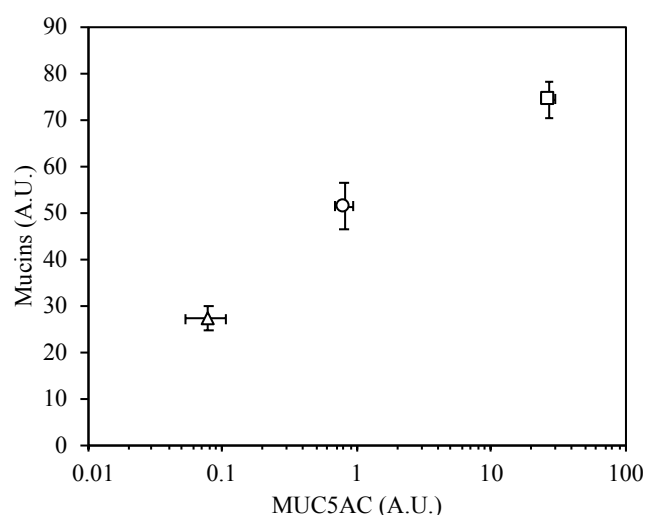


Fig. S2. Mucins content in mucus samples collected from selected NCI-H292 or Calu-3 2D-models as a function of MUC5AC protein levels. NCI-H292 cells were grown in plates with (○) or without (Δ) EGF treatment for 24 h and Calu-3 cells grown in plates for 24 h without further treatment (□). Data are the mean \pm SEM of 2-5 independent experiments.

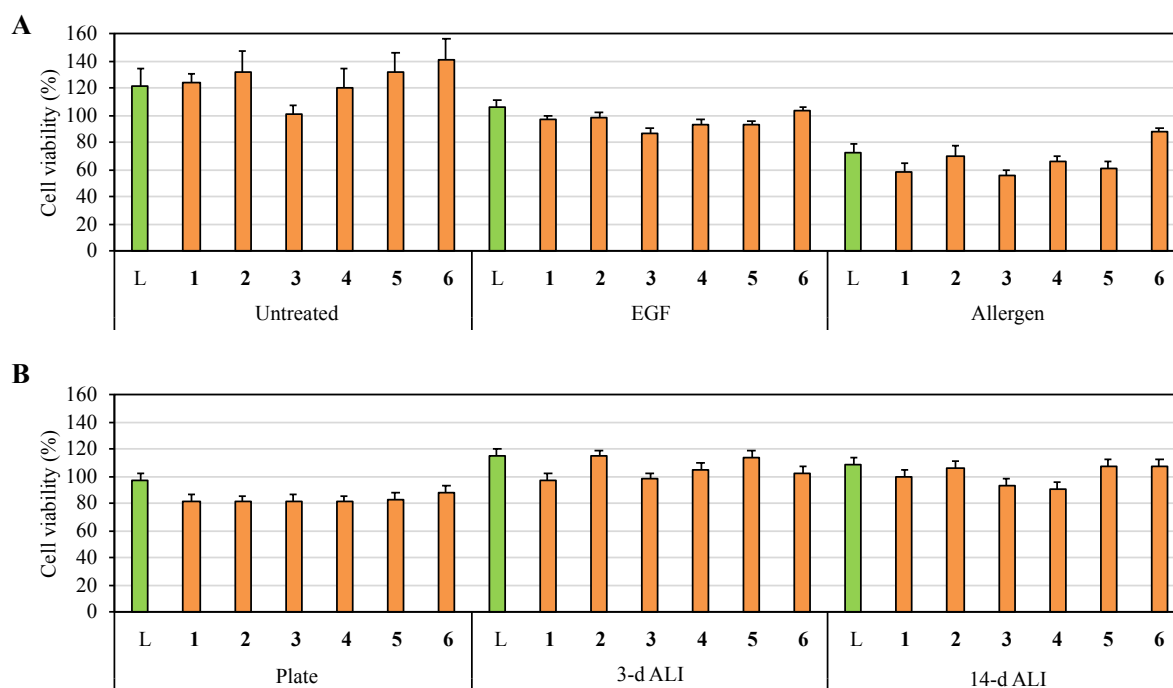


Fig. S3. Cell viability measured in the NCI-H292 and Calu-3 2D- and 3D-models upon transfection experiments. (A) NCI-H292 cells were cultured in plates, treated or not with EGF or allergen, and exposed to 1-6/pDNA lipoplexes (N/P of 4) or to L2k/DNA formulations (L). (B) Calu-3 cells were cultured in plates or on inserts at the ALI for 3 or 7 d, and exposed to 1-6/pDNA lipoplexes (N/P of 4) or to L2k/pDNA formulations (L). Cell viability was assessed by mitochondrial activity measurements using the MTT assay. Data were expressed as percent of mitochondrial activity measured in untransfected cells. Data correspond to the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

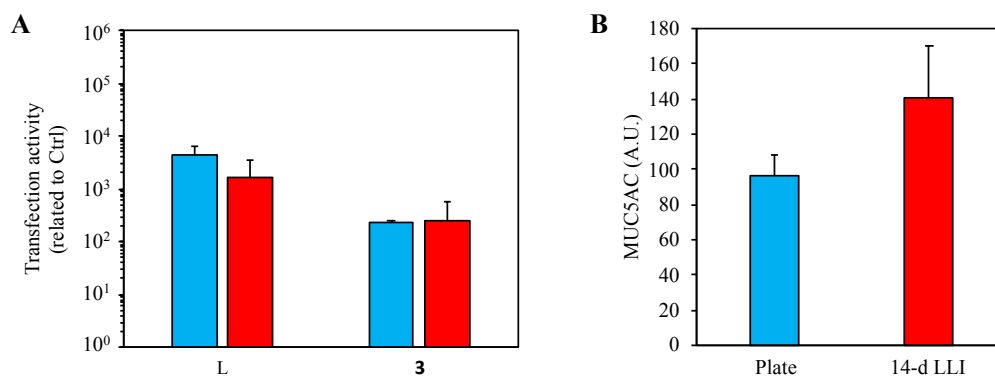


Fig. S4. (A) Transfection activity of 3/pDNA complexes (N/P of 4) in the Calu-3 2D-model (blue) or in Calu-3 cultures on inserts at the LLI for 14 d (red). L2k (L) was used for comparison. Luciferase activity in transfected cells was normalized to the luminescence measured in untransfected cells (2.2×10^5 RLU/well and 3.7×10^5 RLU/insert, resp.). Data correspond to the mean \pm SEM of 2 (Calu-3 cultures on inserts at the LLI) or 3 (2D-model) independent experiments. (B) MUC5AC levels in the mucus samples collected from the aforementioned models (n = 3, mean \pm SEM).

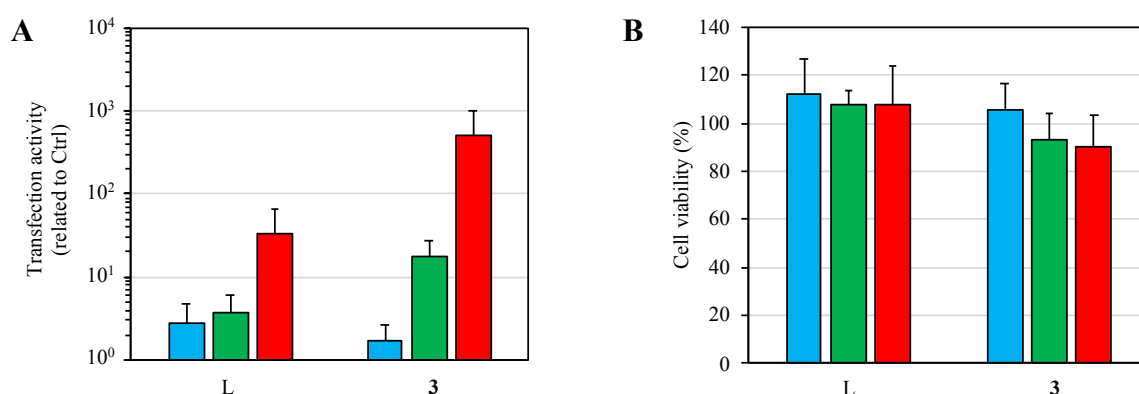


Fig. S5. Transfection activity of 3/pDNA complexes (N/P of 4) in the 14-d Calu-3 3D-model. Cultures were exposed to the L2k/pDNA formulation (L) or 3/pDNA complexes (3) and luciferase expression (A) and cell viability (B) were measured 24 (blue), 48 (green) or 72 h (red) later. (A) Luciferase activity was normalized to the luminescence measured in untransfected cells (*i.e.* 3.5×10^4 , 4.2×10^4 and 5.2×10^4 at 24, 48 and 72 h, resp.). (B) Viability data were expressed as percent of untransfected cells.

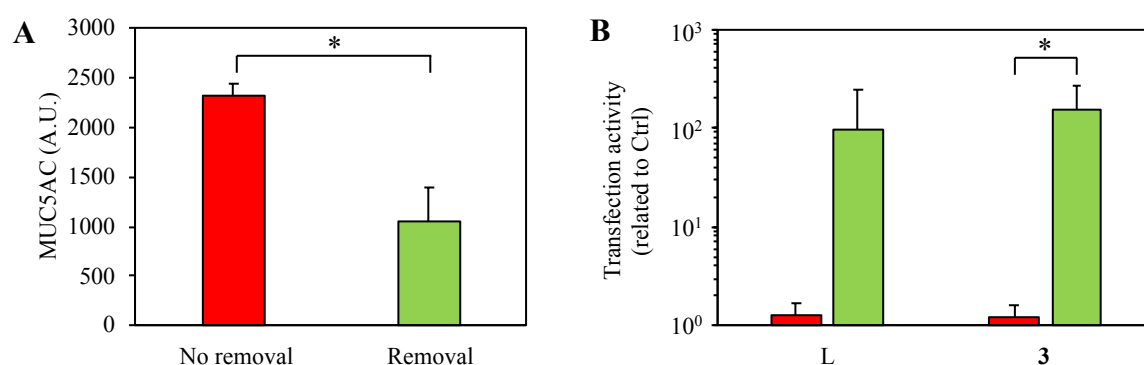


Fig. S6. Impact of mucus removal on transfection activity of lipoplexes in the 14-d Calu-3 3D-model. Calu-3 cells were cultured at the ALI for 14 days. At day 15, mucus layer at the surface of the cultures was maintained (red) or removed (green), and cells were exposed to the L2k/pDNA formulation (L) or 3/pDNA complexes (3) for 24 h before MUC5AC and luciferase assays. **(A)** MUC5AC protein was measured in untransfected cells at the end of the transfection assay. Statistical difference between the two groups was determined by the Student's test ($*p < 0.05$). **(B)** Luciferase activity in cells transfected with L2k/pDNA (L) or 3/pDNA (3, N/P 4), with mucus being maintained (red) or removed (green) prior to cell contact with the transfection particles. Luciferase activity was normalized to the basal luminescence measured in untransfected cells (1.1 and 0.7×10^5 RLU/insert in cells with and without mucus removal, resp.). Data are mean values \pm SEM from 4 independent experiments performed in triplicate. Statistical significance was determined by two-way ANOVA. $*p < 0.05$ vs. no mucus removal.

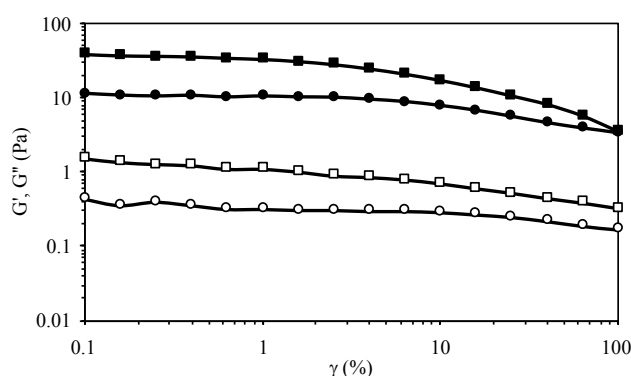


Fig. S7. Bulk rheology of mucus from Calu-3 3D-models. Mucus was collected from Calu-3 cells grown at the ALI for 7 (open symbols) or 14 (solid symbols) d. Strain-dependent elastic (G' , \square) and viscous (G'' , \circ) moduli from 0.1 to 100% strain at a frequency of 6.28 rad/s (1 Hz).

References

- Chen, E.Y., Garnica, M., Wang, Y.C., Chen, C.S., Chin, W.C., 2011. Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles. PLoS One 6, e16198.
- Pierrat, P., Kereselidze, D., Wehrung, P., Zuber, G., Pons, F., Lebeau, L., 2013a. Bioresponsive decoupled-charge amphiphiles for liposomal delivery of DNA and siRNA. Pharm Res 30, 1362-1379.

III. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques monosoufrés

Le mucus pulmonaire, avec ses propriétés de barrière interactive, filtrante et dynamique, piège les corps étrangers et les particules et permet leur élimination. Dans cette étude, la première stratégie envisagée pour vaincre la barrière que représente le mucus dans les voies respiratoires reposait sur la conception de lipides cationiques monosoufrés biolabiles, capables de libérer, localement, suite à leur hydrolyse progressive, des groupements thiols pouvant cliver les ponts disulfures impliqués dans le maintien de l'architecture du mucus. Ainsi, les objectifs de cette partie de la thèse ont été : 1-de déterminer la stabilité, dans le mucus, des formulations préparées à partir de ces lipides, 2-d'étudier leur effet mucolytique, et 3-d'évaluer leur efficacité de transfection. Ce travail a été réalisé sur les lipides TiC3, TC4, TC8 et TC12 (seuls lipides monosoufrés capables de complexer l'ADN au rapport N/P de 4), et leurs analogues oxygénés (iC3, C4, C8 et C12) utilisés en contrôles. Il a été initié sur les formulations préparées à partir de film de lipide, et poursuivi sur les formulations préparées par injection.

III.1. Évaluation des formulations obtenues à partir d'un film de lipide

Comme vu dans la partie I. des résultats, les lipides monosoufrés TiC3, TC4 et TC8 forment au rapport N/P de 4, par la méthode de préparation à partir d'un film, des lipoplexes de 341 à 520 nm de diamètre et de charge positive (potentiel zêta variant de +36 à +48 mV). Le lipide TC12 fait exception parmi les lipides monosoufrés, puisque sa charge au rapport N/P de 4 est en moyenne proche de la neutralité. Les lipoplexes formés dans les mêmes conditions à partir de lipides oxygénés sont caractérisés par un diamètre de 394 à 751 nm (pour les lipides iC3 et C12, respectivement), et une charge de +36 à +44 mV.

III.1.1. Stabilité des formulations dans le mucus

Si la libération de résidus portant une fonction thiol suite à l'hydrolyse des lipides monosoufrés doit se produire lorsque le lipoplexe est dans le mucus, une libération prématurée et trop importante de ce résidu pourrait induire une déstabilisation des lipoplexes et provoquer une libération prématurée de l'acide nucléique qui n'est pas souhaitable car elle se traduirait par une perte d'efficacité de transfection. La cinétique d'hydrolyse doit donc être assez rapide pour que les résidus thiols libérés puissent exercer leur activité mucolytique au niveau de la couche de mucus, et assez lente pour ne pas libérer l'acide nucléique prématurément. Aussi, dans un premier temps, la stabilité des lipoplexes formés à partir de lipides monosoufrés a été étudiée et comparée à celle des lipoplexes formés à partir de lipides oxygénés.

Pour cela, les lipoplexes préparés au rapport N/P de 4 (ou l'ADN plasmidique seul, en contrôle) ont été incubés, pendant 1 h sous agitation lente à température ambiante, dans une solution de glucose 5%, dans un surnageant de culture de cellules NCI-H292 exposées pendant 24 h à un inducteur de mucus

(allergènes), ou dans le mucus prélevé sur un tapis de cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. La stabilité des lipoplexes a été évaluée par la technique du retard de migration de l'ADN sur gel d'agarose (figure 29). La condition comportant l'ADN plasmidique seul sert de contrôle afin de visualiser l'ADN libéré en cas d'instabilité des lipoplexes dans les différents milieux. Après une incubation de 1 h dans le glucose 5%, aucun ADN libre n'était visible pour les lipoplexes formés à partir des lipides monosoufrés TiC3, TC4 ou TC8, mais aussi ceux préparés à partir des lipides oxygénés iC3, C4, C8 ou C12, montrant que les complexes formés sont stables dans le glucose 5%. En revanche, les lipoplexes préparés à partir de TC12 présentaient de l'ADN libre, ce qui est en accord avec la complexation incomplète de l'ADN par le lipide TC12 au rapport N/P de 4 (cf. partie I.3.1). Dans le surnageant de culture des cellules NCI-H292 exposées aux allergènes, aucun ADN libre n'était visible pour les lipoplexes formés à partir des lipides TiC3, TC4 ou TC8, suggérant que ces complexes sont stables dans ce modèle. Dans le cas du lipide TC12, 3 bandes étaient présentes après l'incubation dans ce surnageant, indiquant que les lipoplexes pourraient être partiellement dissociés. Après incubation des lipoplexes dans le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, un étalement ou *smear* d'acide nucléique est présent dans la première zone du gel pour chacun des puits. La présence de ce *smear* dans un échantillon de mucus sans ajout d'ADN plasmidique ou de lipoplexe permet de conclure que des acides nucléiques endogènes sont présents en grande quantité dans le mucus, rendant l'analyse de stabilité des lipoplexes difficilement interprétable. Néanmoins, lorsque l'ADN plasmidique seul est ajouté au mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, l'ADN libre interagit avec les constituants du mucus pour faire apparaître un *smear* particulièrement dense. Après incubation des lipoplexes à base des lipides monosoufrés TC8, TC4, et TiC3 et de leurs équivalents oxygénés, aucun *smear* de densité comparable n'est discernable, et les étalements observés semblent plutôt semblables à celui obtenu avec le mucus non additionné d'ADN, suggérant que ces lipoplexes sont également stables dans cet échantillon mucus. Enfin, la large bande présente pour toutes les conditions au milieu du gel semble être liée à la présence de FBS dans le milieu de culture.

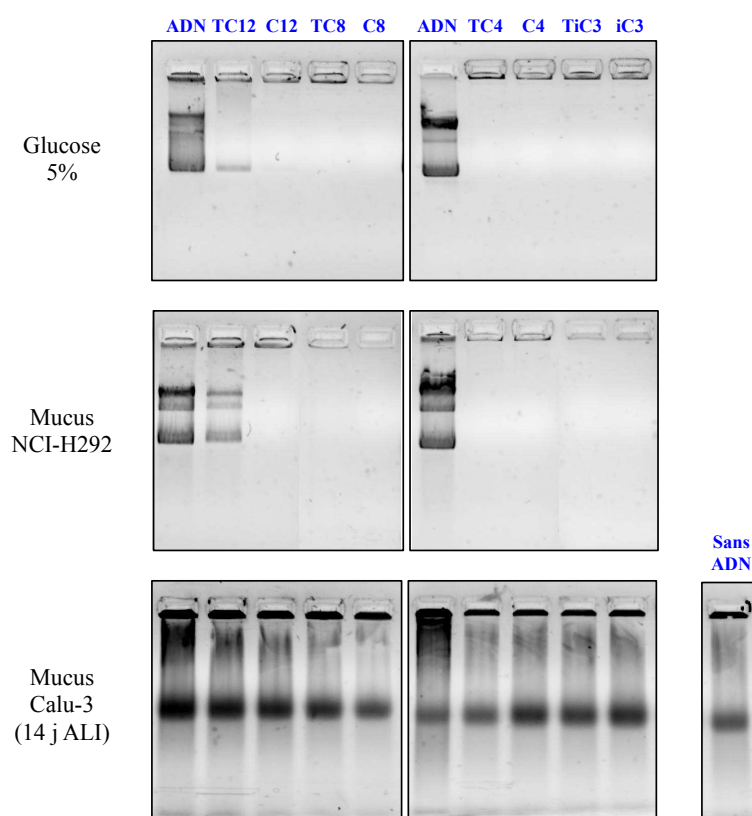


Figure 29. Stabilité des lipoplexes dans le mucus cellulaire, révélée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les lipoplexes préparés à partir d'un film au rapport N/P de 4 (ou l'ADN plasmidique seul) ont été incubés pendant 1 h sous rotation lente dans une solution de glucose 5%, dans le surnageant cellulaire des cellules NCI-H292 cultivées en plaque et exposées pendant 24 h à un inducteur (allergènes), ou dans le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. La condition « sans ADN » consiste en du mucus de ces cellules Calu-3 sans ajout d'ADN.

En raison de la difficulté à interpréter les résultats de stabilité dans le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, nous avons complété l'évaluation de la stabilité des lipoplexes dans le mucus, uniquement avec des formulations préparées à base des lipides C8 ou TC8 au rapport N/P de 4 et en utilisant un surnageant de culture de cellules Calu-3 cultivées en plaque en absence de FBS, qui présente une quantité de mucus élevée (33 fois supérieure à celle des cellules NCI-H292 exposées à l'EGF) mais très inférieure à celle des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, permettant ainsi d'éviter le *smear* d'acides nucléiques endogènes sur le gel (figure 30). Ces conditions nous ont permis d'évaluer la stabilité des lipoplexes à des temps plus longs (4 et 24 h). Ainsi, aucune décomplexation des lipoplexes à base des lipides C8 ou TC8 n'a été observée jusqu'à un temps de contact de 24 h (figure 31).



Figure 30. Production relative de MUC5AC par les cellules NCI-H292 cultivées en plaque, traitées ou non à l'EGF pendant 24 h, et dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, mesurée dans les surnageants cellulaires. Les deux lignées ont été privées en sérum dès leur confluence. U.A. = unité arbitraire.

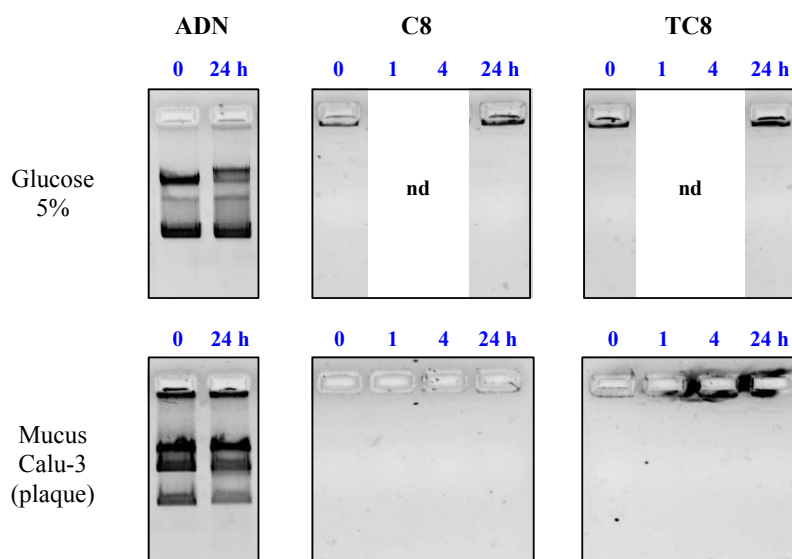


Figure 31. Stabilité des lipoplexes obtenus à partir d'un film à base de lipide C8 ou TC8 dans le mucus cellulaire, révélée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les lipoplexes préparés à partir d'un film au rapport N/P de 4 (ou l'ADN plasmidique seul) ont été incubés pendant 0, 1, 4 ou 24 h sous rotation lente dans une solution de glucose 5% ou dans le surnageant de cellules Calu-3 cultivées en plaque en absence de FBS. nd = non déterminé.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats semblent montrer une stabilité satisfaisante des lipoplexes formés à partir d'un film de lipide monosoufré (à l'exception du lipide TC12) ou oxygéné au rapport N/P de 4 dans nos modèles cellulaires producteurs de mucus.

III.1.2. Effet mucolytique des formulations

L'effet mucolytique des formulations a été évalué en mesurant, d'une part, les propriétés rhéologiques du mucus en présence des lipoplexes, et d'autre part, la diffusion des lipoplexes dans le mucus. Le modèle de mucus utilisé était le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI

pendant 14 jours. En effet, comme cela a été mentionné dans la partie précédente de notre travail, ce mucus présente des propriétés rhéologiques comparables à celles décrites pour le mucus pulmonaire humain. Le lipide C8 ayant montré l'activité de transfection la plus élevée quel que soit le modèle cellulaire, l'évaluation a porté sur le couple de lipides C8/TC8 (au rapport N/P de 4). Pour le choix de la concentration de lipide en rhéologie, nous nous sommes basés sur les conditions de transfection dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, en considérant que la totalité des lipoplexes ajoutés à la culture de cellules arrive jusqu'au mucus et pénètre dans la couche de mucus. La concentration en lipide à utiliser a ainsi été estimée à 0,6 mM. Les lipides monosoufrés développés dans ce travail ont un mécanisme d'action identique à celui des agents mucolytiques utilisés en thérapeutique, comme la NAC, ou ceux utilisés en études expérimentales, comme le DTT. Ce mécanisme d'action fait intervenir la rupture des ponts disulfures impliqués dans l'architecture des mucines (figure 24). Aussi, la NAC et le DTT ont servi de référence dans certaines des expériences décrites ci-dessous.

- Effet des formulations sur les propriétés rhéologiques du mucus

Dans un premier temps, afin d'identifier les modifications rhéologiques entraînées par une activité mucolytique dans notre modèle de mucus, nous avons traité ce mucus par le DTT, à la concentration finale de 1 mM pendant 1 h, en se basant sur les effets réducteurs du DTT sur la mucine MUC5AC décrits dans la littérature (Ramsey et al., 2016), et mesuré les modules G' et G'' (figure 32). Ce traitement au DTT a entraîné une diminution des modules G' et G'' d'un facteur de 2,5 (à 1 Hz) par rapport aux modules G' et G'' du mucus non traité. Ainsi, une action mucolytique se traduisant par une réduction des propriétés viscoélastiques peut être mise en évidence dans notre modèle de mucus.

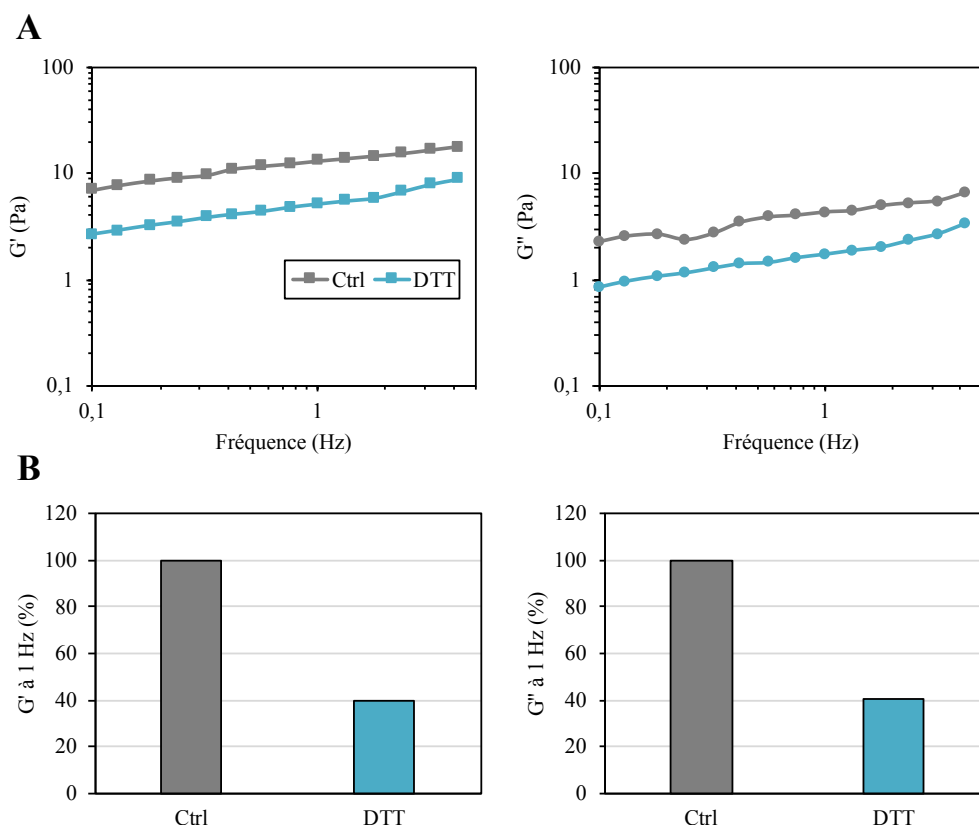


Figure 32. Modifications rhéologiques du mucus induites par le DTT. Le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours a été incubé à température ambiante pendant 1 h en rotation lente en présence de DTT (1 mM). Le contrôle (Ctrl, gris) correspond au mucus non traité. **(A)** Les modules élastique (G' , ■) et visqueux (G'' , ●) ont été mesurés sur une échelle de fréquence de 0,1 à 17,8 Hz. **(B)** Les résultats des modules G' et G'' mesurés à 1 Hz ont été exprimés en pourcentage des valeurs obtenues avec le mucus non traité.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet des lipoplexes formés à partir d'un film de lipide C8 ou de lipide TC8 sur les modules G' et G'' . Après 1 h de contact des lipoplexes avec le mucus, les modules G' et G'' étaient augmentés comparés à ceux du mucus non traité (respectivement, à 1 Hz, 4,0 et 3,4 fois pour les lipoplexes à base de lipide C8, et 3,9 et 3,2 fois pour les lipoplexes à base de lipide TC8) (figure 33). Contrairement au DTT, les lipoplexes à base de lipide C8 et ceux à base de lipide TC8 ont donc provoqué une augmentation de la viscoélasticité du mucus. De plus, il n'y avait pas de différence entre leurs modules G' et G'' , ne permettant pas de conclure quant à une activité mucolytique des lipoplexes à base de lipide TC8.

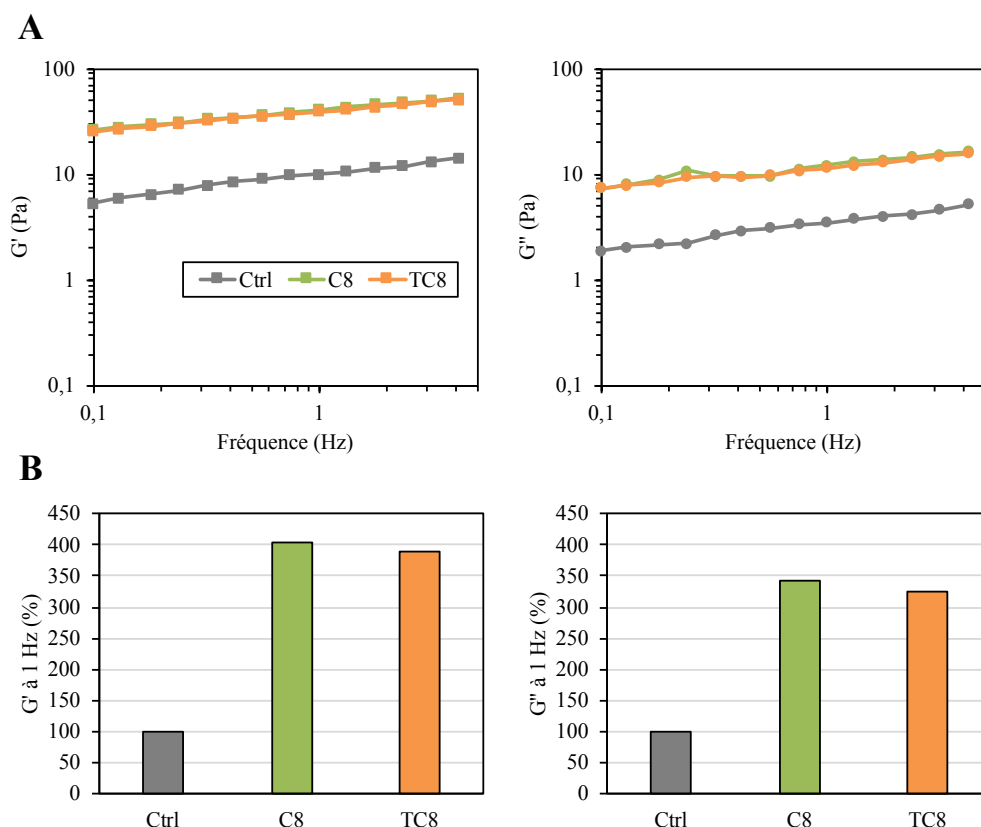


Figure 33. Modifications rhéologiques du mucus induites par les lipoplexes formés à partir d'un film de lipide C8 ou de lipide TC8. Le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours a été incubé à température ambiante pendant 1 h en rotation lente en présence des lipoplexes à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange). Le contrôle (Ctrl, gris) correspond au mucus non traité. **(A)** Les modules élastique (G' , ■) et visqueux (G'' , ●) ont été mesurés sur une échelle de fréquence de 0,1 à 17,8 Hz. **(B)** Les résultats des modules G' et G'' mesurés à 1 Hz ont été exprimés en pourcentage des valeurs obtenues avec le mucus non traité.

Afin de confirmer ce résultat, les résidus libérés par l'hydrolyse du lipide C8 (octan-1-ol, $C_8H_{17}OH$) ou TC8 (octan-1-thiol, $C_8H_{17}SH$) ont été mis en contact du mucus pendant 1 h à la concentration finale de 0,6 mM, mimant une hydrolyse totale des lipides. Ces composés ont entraîné, contrairement aux lipoplexes, une légère diminution des modules G' et G'' (figure 34). Toutefois, il se pourrait que cet effet provienne de l'absence de lipide et/ou d'ADN dans ces expériences, puisque l'octan-1-ol (non mucolytique) a eu un effet comparable à celui de l'octan-1-thiol (supposé mucolytique).

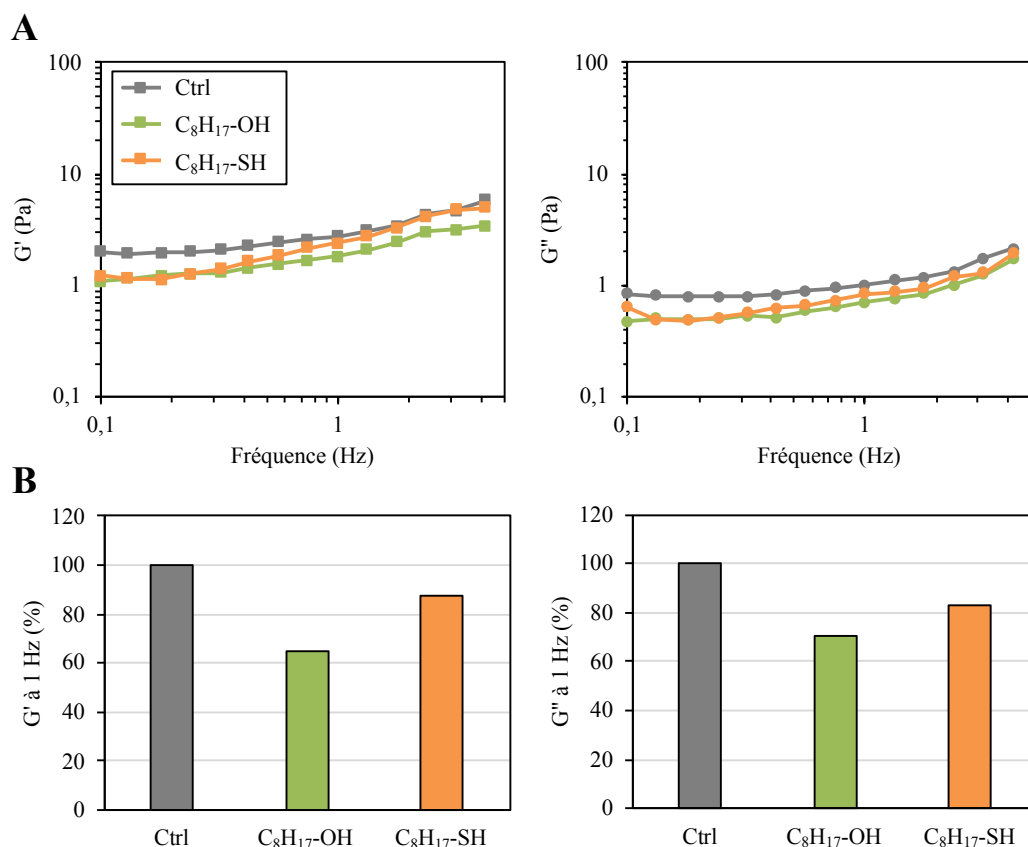


Figure 34. Modifications rhéologiques du mucus induites par l'octan-1-ol (résidu issu de l'hydrolyse du lipide C8), ou l'octan-1-thiol (résidu issu de l'hydrolyse du lipide TC8). Le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours a été incubé à température ambiante pendant 1 h en rotation lente en présence de 0,6 mM d'octan-1-ol ($C_8H_{17}-OH$, vert) ou d'octan-1-thiol ($C_8H_{17}-SH$, orange). Le contrôle (Ctrl, gris) correspond au mucus non traité. Les modules élastique (G' , ■) et visqueux (G'' , ●) ont été mesurés sur une échelle de fréquence de 0,1 à 17,8 Hz. **(B)** Les résultats des modules G' et G'' mesurés à 1 Hz ont été exprimés en pourcentage des valeurs obtenus avec le mucus non traité.

En conclusion, aucune activité mucolytique du lipide TC8 ou de son résidu, l'octan-1-thiol, n'a pu être mise en évidence par l'analyse macrorhéologique du mucus, à des concentrations en lipide ou en résidu d'hydrolyse représentatives des conditions utilisées dans nos expériences de transfection.

- Diffusion des formulations dans le mucus

Dans cette problématique, la technique du MPT (figure 20B) est particulièrement intéressante, car elle permet d'étudier la diffusion des particules à l'échelle microscopique. Pour rappel, avec cette technique, la trajectoire de chaque particule suivie par vidéomicroscopie à haute résolution est convertie en une valeur, le MSD, qui peut être modélisée selon différents modèles mathématiques pour caractériser la diffusion des particules, et notamment calculer un coefficient de diffusion. Dans notre travail, nous avons cherché à savoir si la libération de résidus mucolytiques (R-SH) par les lipoplexes facilite la diffusion de ces derniers, en permettant la rupture des ponts disulfures proches, ce qui engendrerait un élargissement des zones de diffusion des particules dans le mucus (figure 23). Nous avons donc cherché

une modélisation permettant de mettre en évidence ces effets. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Professeur Pascal Didier, qui nous a amenés à utiliser, parmi les modélisations mathématiques du MSD décrites dans la littérature, celle décrivant les diffusions confinées (Saxton and Jacobson, 1997; Wagner et al., 2017). Cette modélisation permet de déterminer, à partir de l'évolution du MSD en fonction du temps, le rayon de la zone dans laquelle est confinée la particule suivie (r_c), et le coefficient de diffusion (D) de cette dernière. Notre hypothèse était que cette modélisation pourrait permettre de révéler, dans notre modèle de mucus, une augmentation de r_c (reflétant une ouverture du maillage des mucines) et/ou une augmentation du D des lipoplexes (reflétant leur diffusion facilitée) sous l'effet mucolytique de ces derniers.

Dans un premier temps, nous avons utilisé cette modélisation pour étudier la diffusion de particules de polystyrène, commerciales, pour lesquelles des données sont disponibles dans la littérature. Nous avons ainsi choisi de travailler avec des billes de polystyrène carboxylées de 500 nm de diamètre, taille qui s'approche du diamètre des lipoplexes obtenus dans les formulations à partir d'un film, et de 200 nm, taille qui devrait faciliter la diffusion des billes à travers le mucus cellulaire. La taille et la charge de ces particules ont été vérifiées par DLS (tableau 15).

Particule	<i>Z-average</i> (nm)	PdI	Potentiel zêta (mV)
Polystyrène 200 nm	265 ± 32	0,057	-48 ± 1
Polystyrène 500 nm	538 ± 7	0,131	-37 ± 7

Tableau 15. Taille, polydispersité et charge des billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm. Les mesures ont été effectuées sur 2 préparations indépendantes, par DLS. Les résultats du *Z-average* et du potentiel zêta sont exprimés sous la forme de moyenne ± SD.

La diffusion de ces particules a été étudiée dans le mucus et dans le milieu de culture complet (contrôle en absence de mucus) (figure 35). Les coefficients de diffusion théoriques des particules dans l'eau à 37 °C ont aussi été calculés à l'aide de la loi de Stokes-Einstein. L'eau a été choisie comme milieu de référence, car ses valeurs de viscosité en fonction de la température sont largement accessibles et devraient être proches de celles du milieu de culture. En moyenne comme en médiane et pour les billes de 200 comme celles de 500 nm, les D mesurés dans le milieu de culture étaient très proches de ceux prédits par l'équation de Stokes-Einstein dans l'eau (en moyenne, respectivement, 3,30 contre 3,28 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 200 nm, et 1,28 contre 1,31 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les billes de 500 nm) (figure 35A). Cette observation a permis de valider la détermination du D par le modèle mathématique lorsque les particules se déplacent sous l'effet du mouvement Brownien en absence de mucus. Dans le mucus, les coefficients de diffusion des deux particules étaient plus faibles. De manière intéressante, les particules de 200 nm étaient plus rapides dans le mucus que celles de 500 nm (coefficients de diffusion moyens

de 2,9 et 0,6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement, $p < 0,0001$). Pour prendre en compte le fait que les particules de 500 nm sont initialement plus lentes que celles de 200 nm, parce qu'elles sont de plus grande taille, les vitesses de diffusion dans le mucus ont été normalisées avec la vitesse de diffusion calculée pour le milieu de culture. La différence entre les deux particules après normalisation restait significative (coefficients de diffusion moyen divisés par 1,1 et 2,1, respectivement, et test de Mann-Whitney avec $p < 0,0001$). Ces observations sont tout à fait cohérentes avec la difficulté des particules plus volumineuses à diffuser dans le mucus. La modélisation indiquait enfin que les billes de 200 nm étaient globalement confinées dans des pores plus étroits que les billes de 500 nm (r_c moyens estimés à 1,22 et 1,44 μm , respectivement), en accord avec le fait que les pores les plus petits sont uniquement accessibles aux particules de 200 nm (figure 35B).

Nous avons également traité le mucus par le DTT, à la concentration finale de 1 mM pendant 1 h, en suivant le même protocole que lors des analyses rhéologiques, afin d'identifier les modifications entraînées par une activité mucolytique sur le D et le r_c des billes de 200 nm. La diffusion des particules de 200 nm, estimée à partir de 156 trajectoires, était significativement diminuée dans le mucus traité par le DTT, par rapport au mucus non traité (coefficients de diffusion moyen de 2,38 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ contre 2,94 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement, $p < 0,05$). Le r_c moyen, quant à lui, n'était pas différent de celui observé en absence de traitement mucolytique (r_c moyen estimé à 1,15 μm). Cet effet de diminution des vitesses de diffusion des particules par un traitement du mucus avec un mucolytique pourrait être lié à la libération de fragments de mucine à l'origine d'une augmentation de la microviscosité du mucus dans les zones de confinement.

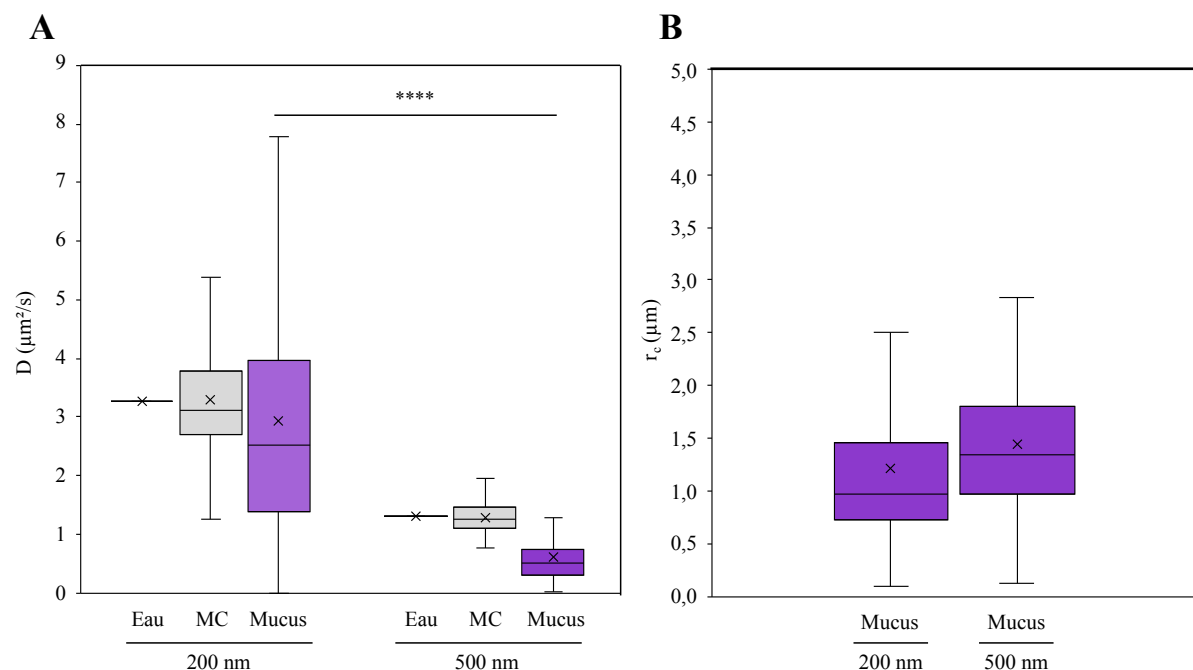


Figure 35. Diffusion des billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm de diamètre dans l'eau (D calculé de manière théorique avec l'équation de Stokes-Einstein), dans le milieu de culture complet (MC), et dans le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. **(A)** Coefficients de diffusion, D . **(B)** Rayon des zones de confinement, r_c . Représentations en boîte à moustaches. La moyenne est représentée par une croix, la médiane par une barre horizontale. Les données proviennent de 97 (200 nm MC), 175 (200 nm mucus), 81 (500 nm MC) et 67 (500 nm mucus) trajectoires obtenues sur une expérience. Analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn, avec une significativité de **** ($p < 0,0001$).

Dans un deuxième temps, la diffusion de lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide TC8 a été comparée à celle de lipoplexes à base de lipide C8 (au rapport N/P de 4), en utilisant le milieu de culture comme milieu contrôle. Les lipoplexes formés à partir de lipide C8 et ceux formés à partir de lipide TC8 présentaient des D moyens relativement comparables dans le milieu de culture (0,90 et 0,83 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement) (figure 36A). Dans le mucus, les deux types de lipoplexes étaient ralentis, avec des D moyens 2,5 et 2,9 fois plus faibles que dans le milieu de culture pour les lipoplexes à base de lipide C8 et ceux à base de lipide TC8, respectivement. Le mucus a donc engendré un ralentissement légèrement plus important des lipoplexes que des billes de polystyrène de 500 nm (les D de ces dernières étant seulement 2,1 fois plus faibles dans le mucus que dans le milieu de culture). Ceci est en accord avec le fait que la charge positive des lipoplexes favorise leurs interactions électrostatiques avec les mucines, contrairement aux particules de polystyrène chargées négativement. Comme les D moyens, les médianes des D allaient dans le sens d'un ralentissement moins prononcé pour les lipoplexes à base de lipide C8 que pour les lipoplexes à base de lipide TC8 (0,21 et 0,13 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement). Les distributions des D étaient relativement similaires entre les deux types de lipoplexes (figure 36B). Une différence apparaissait toutefois. En effet, la population des lipoplexes les plus ralentis ($D < 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) était plus nombreuse dans le cas des lipoplexes à base de lipide TC8 que dans celui des lipoplexes à base de lipide C8 (43 contre 27%, respectivement). Enfin, les r_c étaient relativement proches, avec un r_c

moyen de 0,80 μm pour les lipoplexes à base de lipide TC8 et de 0,87 μm pour ceux à base de lipide C8 (figure 37).

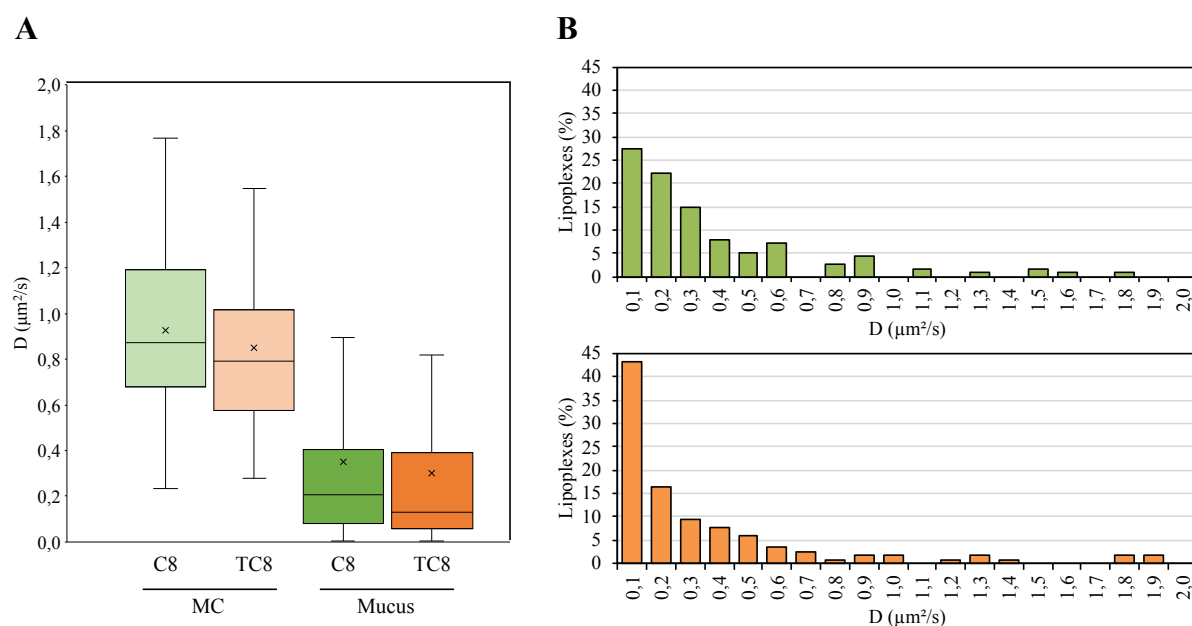


Figure 36. Diffusion des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange) dans le milieu de culture (MC, clair) ou dans le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours (foncé). **(A)** Représentation en boîte à moustaches des coefficients de diffusion, D . La moyenne est représentée par une croix, la médiane par une barre horizontale. **(B)** Distribution des coefficients de diffusion. Les données proviennent de 157 (C8 MC), 145 (TC8 MC), 113 (C8 mucus) et 116 (TC8 mucus) trajectoires obtenues sur 2 expériences indépendantes.

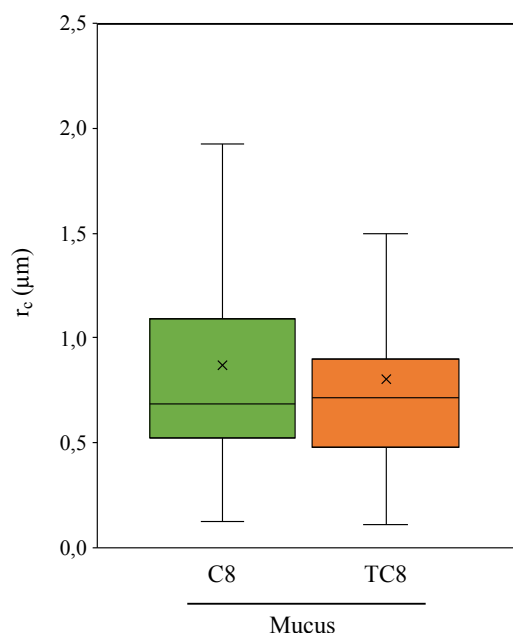


Figure 37. Rayon des zones de confinement (r_c) des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange) dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Représentation en boîte à moustaches. La moyenne est représentée par une croix, la médiane par une barre horizontale. Ces résultats proviennent du même jeu de données que ceux de la figure 36.

Ces résultats de MPT montrent donc que les lipoplexes à base du lipide monosoufré TC8 diffusent globalement moins efficacement dans notre modèle de mucus que leurs équivalents préparés à partir du lipide oxygéné C8, ce qui suggère que le lipide monosoufré TC8 n'a pas d'activité mucolytique. Toutefois, l'absence d'effet du DTT dans nos expériences de MPT semble indiquer que les caractéristiques physiques de nos lipoplexes ne permettent peut-être pas de mettre en évidence d'action mucolytique dans notre modèle de mucus.

Pour conclure, nos données de rhéologie et de MPT ne nous ont pas permis de mettre en évidence une activité mucolytique des formulations à partir d'un film de lipide monosoufré TC8.

III.1.3. Efficacité de transfection des formulations

Nous avons évalué l'activité de transfection de l'ensemble des lipides cationiques monosoufrés capables de former des lipoplexes à partir d'un film (TiC3, TC4, TC8 ou TC12), dans l'hypothèse que les propriétés supposées mucolytiques de ces lipides se traduisent par une activité de transfection augmentée. Ces études ont été conduites malgré les données de rhéologie et de MPT décrites ci-dessus, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les expériences de transfection sont moins lourdes à mettre en œuvre que les expériences de rhéologie ou de MPT, qui nécessitent de produire suffisamment de mucus à partir de cultures cellulaires sur inserts (14 inserts et 17 jours sont nécessaires pour obtenir environ 650 μ L de mucus qui permettent de tester 3 conditions dans une expérience de rhéologie ou de MPT) ou qui demandent des temps d'analyse très importants (une expérience de MPT avec 5 conditions demande 10 jours d'analyse en moyenne). Par ailleurs, les expériences de transfection, réalisées en microplaques avec un système rapporteur, permettent de comparer jusqu'à 12 (expériences sur inserts) ou 64 (expérience en microplaque) conditions en triplicats, en parallèle, contre 3 conditions pour une expérience de rhéologie ou de MPT. Enfin, la technique d'évaluation de l'activité de transfection était déjà en place au laboratoire à mon arrivée en thèse, contrairement aux techniques de rhéologie et de MPT. Ainsi, la majorité des expériences décrites ci-dessous ont été réalisées avant ou en parallèle des expériences de rhéologie et de MPT.

Nous avons comparé l'activité de transfection des quatre lipides cationiques monosoufrés à celle de leurs analogues oxygénés dans les six modèles cellulaires développés (figure 38). Quel que soit le lipide, les lipoplexes formés étaient capables de transférer tous les modèles cellulaires, excepté le modèle obtenu en cultivant les cellules Calu-3 en ALI pendant 14 jours. Le lipide TC8 était celui qui montrait globalement la meilleure efficacité, conduisant dans tous les modèles, à part dans le modèle NCI-H292 induit par l'EGF, à des activités de transfection 2 à 14 fois plus élevées que les autres lipides monosoufrés. L'activité de transfection des lipoplexes à base de lipides monosoufrés était néanmoins clairement amoindrie par la présence de mucus, jusqu'à être totalement inhibée dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Cette diminution ne provenait pas d'une toxicité des lipoplexes, la

perte de viabilité maximale répertoriée dans ces expériences étant de 22% avec les lipoplexes à base de lipide C8 dans le modèle Calu-3 en plaque (figure 39), et la nécrose induite restant inférieure à 20% dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI (non mesurée dans les autres conditions). Quoiqu'il en soit, les lipoplexes à base de lipide monosoufré n'ont, dans aucun des modèles, affiché une efficacité de transfection supérieure à celle de leurs analogues oxygénés (figure 38).

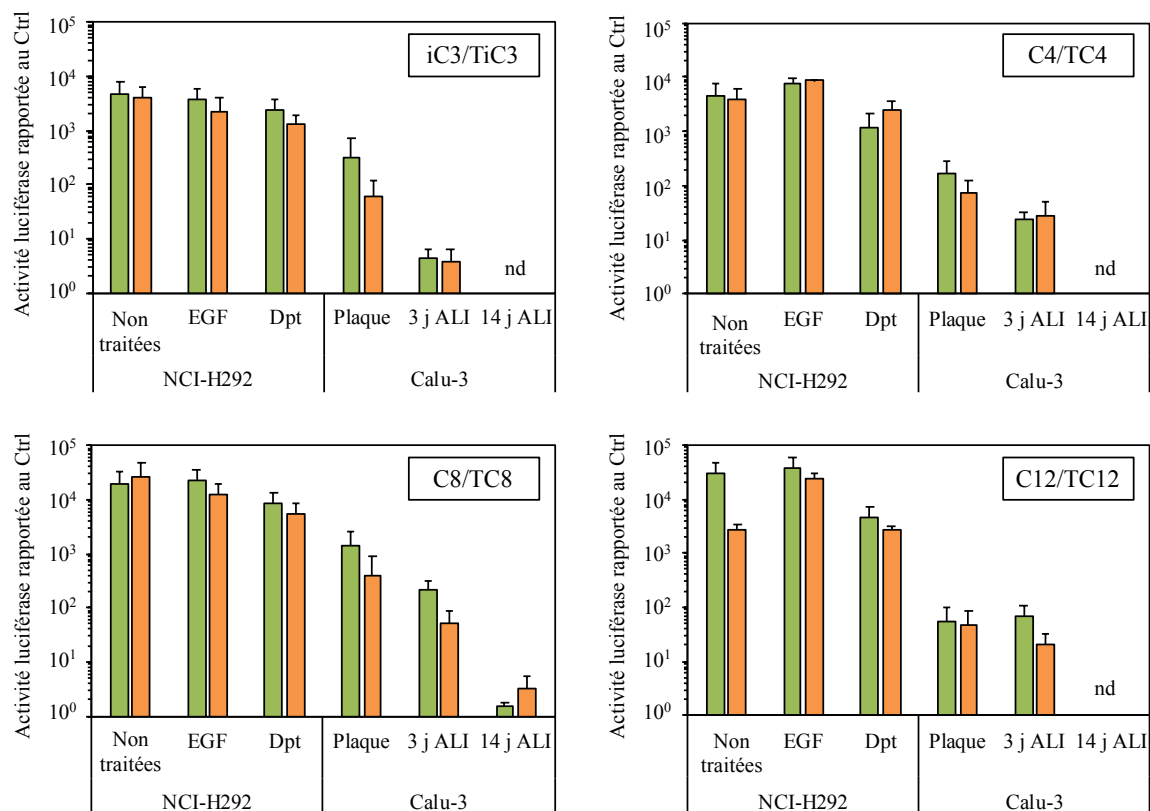


Figure 38. Efficacité de transfection des lipoplexes formés à partir d'un film de lipides monosoufrés (orange) ou de leurs analogues oxygénés (vert) dans les six modèles cellulaires. Pour rappel, la production et/ou l'épaisseur de mucus augmente dans les différents modèles, de la plus faible à gauche (cellules NCI-H292 non traitées en plaque) vers la plus élevée à droite (cellules Calu-3 en inserts et en ALI pendant 14 jours). L'activité de transfection mesurée à 24 h a été rapportée, dans chaque condition, à celle des cellules non exposées (Ctrl), et les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'au moins 3 expériences indépendantes. nd = non déterminé ; Dpt = allergènes de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

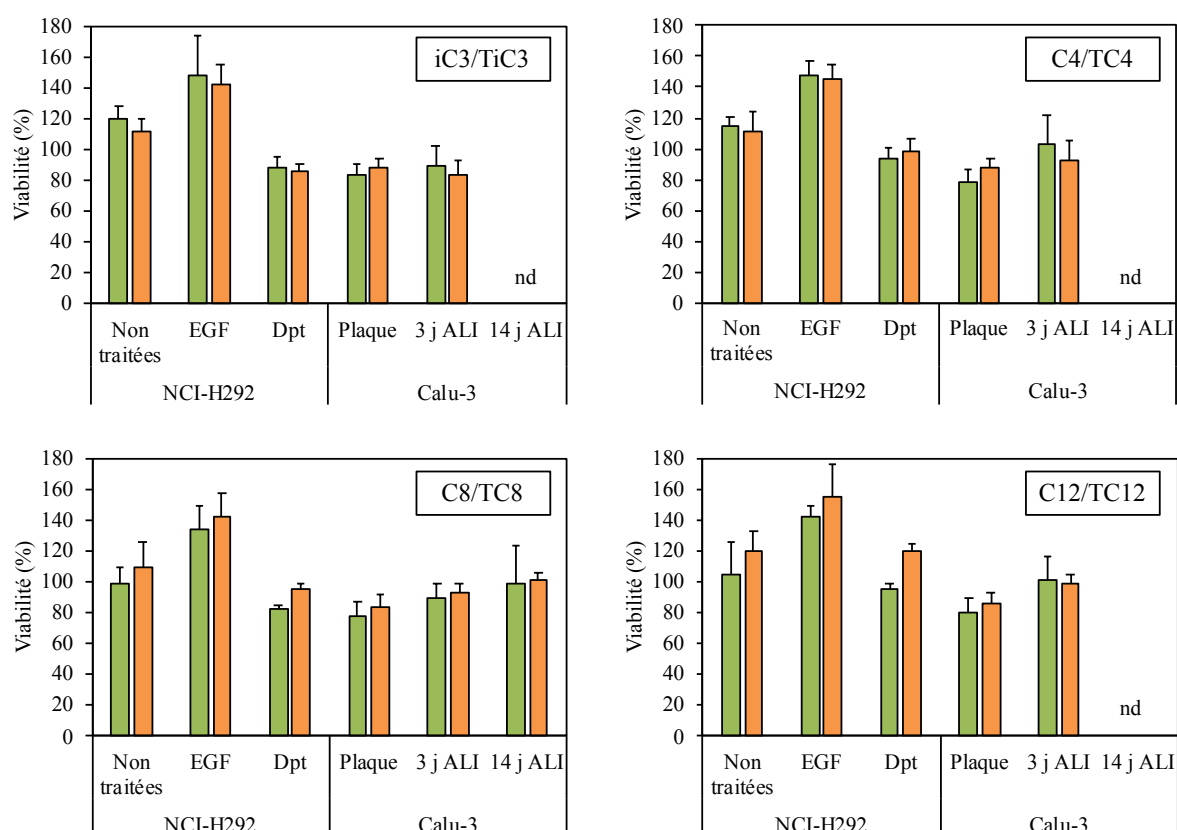


Figure 39. Viabilité des cellules dans les expériences de transfection de la figure 38. Dans chaque condition, l'absorbance mesurée a été rapportée à celle mesurée dans les cellules non exposées (Ctrl) pour obtenir un pourcentage de viabilité à 24 h. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'au moins 3 expériences indépendantes. nd = non déterminé ; Dpt = allergène de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Les lipoplexes préparés à partir des lipides oxygénés ayant souvent une efficacité de transfection légèrement plus élevée que celle des lipoplexes préparés à partir des lipides monosoufrés, nous avons émis l'hypothèse que la structure de ces derniers était peut-être défavorable dans certaines étapes de la transfection indépendantes du mucus (passage de la membrane cellulaire, échappement endosomal, libération intracellulaire de l'ADN...). Nous avons donc tenté d'intégrer dans les lipoplexes formés à partir des lipides monosoufrés, soit des lipides oxygénés, soit de la DOPE (un lipide *helper* souvent utilisé pour améliorer l'échappement endosomal des particules de transfection). Ces stratégies d'optimisation des formulations ont été évaluées dans le modèle Calu-3 en plaque (figure 40), présentant une production de mucus intermédiaire (concentration en MUC5AC 73 fois plus élevée que dans le modèle NCI-H292 exposé aux allergènes, et 23 fois moins élevée que dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours). Aucune de ces stratégies d'optimisation n'a conduit à une amélioration assez intéressante, selon nous, de l'activité de transfection, quels que soient les lipoplexes, y compris pour les lipoplexes à base du lipide C8 et à base du lipide TC8 qui restaient les plus performants.

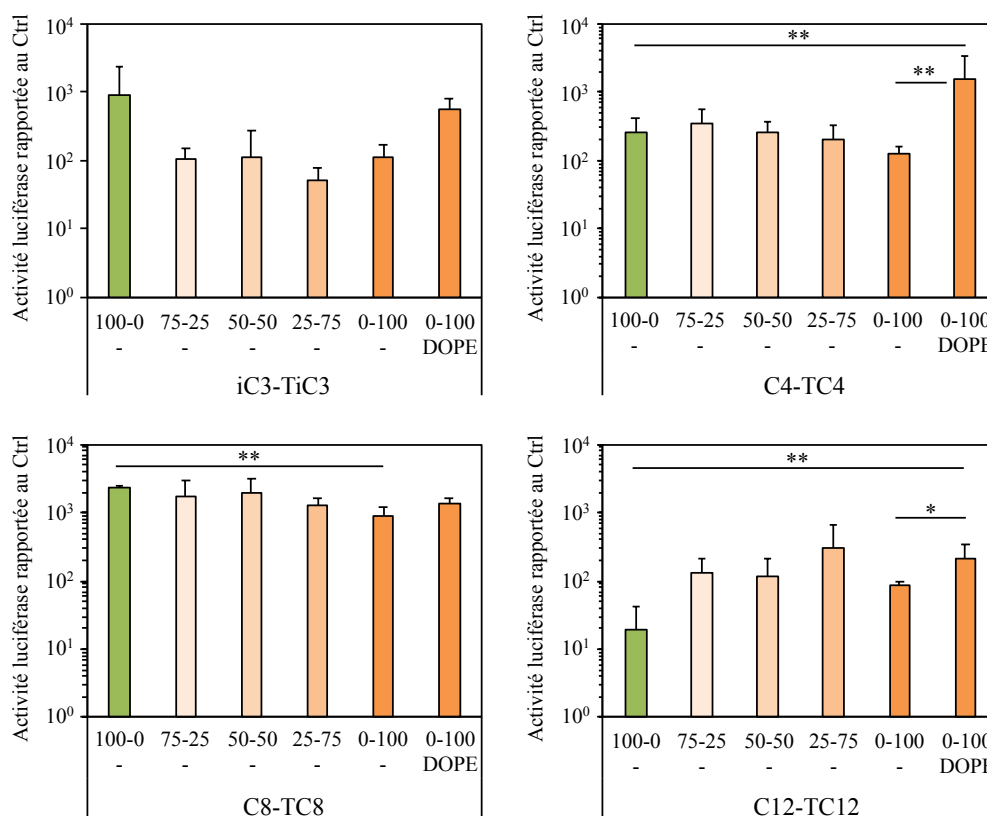


Figure 40. Efficacité de transfection de lipoplexes contenant différentes proportions (en %) de lipides oxygénés (premier chiffre) ou monosoufrés (deuxième chiffre), sans (-) ou avec 1 équivalent de DOPE, dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque. Le couple de lipides considéré est indiqué en-dessous de chaque graphique. L'activité de transfection, mesurée à 24 h, a été rapportée à celle des cellules non exposées (Ctrl), et les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 2 expériences indépendantes. Analyse statistique par un test ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak, avec une significativité de * ($p < 0,05$) et ** ($p < 0,01$).

En résumé, les évaluations, telles qu'elles ont été menées sur les formulations préparées à partir d'un film de lipides monosoufrés, ne nous ont permis ni de montrer une activité mucolytique de ces lipoplexes, ni de mettre en évidence une augmentation d'activité de transfection par rapport à leurs analogues oxygénés.

III.2. Évaluation des formulations obtenues par injection

Les propriétés de barrière du mucus résultent de sa structure en maille et de sa charge nette globale négative, qui lui permettent de filtrer des particules étrangères en fonction de leur taille et de leur charge, respectivement. Les lipoplexes obtenus au rapport N/P de 4 à partir d'un film de lipides ont une taille autour de 450 nm (lipides monosoufrés) ou 550 nm (lipides oxygénés), et une charge nettement positive ($> +36$ mV, sauf avec le lipide TC12). Ces lipoplexes sont donc particulièrement sensibles aux deux mécanismes de filtration du mucus. La charge positive est une propriété centrale pour l'activité de transfection des lipoplexes, car elle facilite l'interaction de ces complexes avec les membranes

cellulaires et donc leur internalisation. Cette propriété doit être conservée. En revanche, afin de faciliter la diffusion de nos lipoplexes à travers le mucus (et donc d'augmenter leur activité de transfection), nous avons cherché à obtenir des complexes plus petits en les formulant avec la méthode par injection. Comme nous l'avons vu dans la partie I., cette méthode nous a permis d'obtenir, au rapport N/P de 4, des lipoplexes présentant un diamètre proche de 200 nm tout en conservant une charge positive (proche de +30 mV). Nous avons donc évalué ces lipoplexes dans une démarche équivalente à celle menée sur les lipoplexes préparés à partir d'un film.

III.2.1. Stabilité des formulations dans le mucus

L'évaluation de la stabilité des formulations dans le mucus a été effectuée sur les lipoplexes à base de lipide C8 préparés au rapport N/P de 4, en utilisant, comme modèle de mucus, le mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en plaque sans FBS. Les lipoplexes ont été incubés dans ce mucus, pendant 24 h à température ambiante, et leur stabilité a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 41). Aucun ADN n'a été observé dans le gel, suggérant une stabilité satisfaisante des lipoplexes.

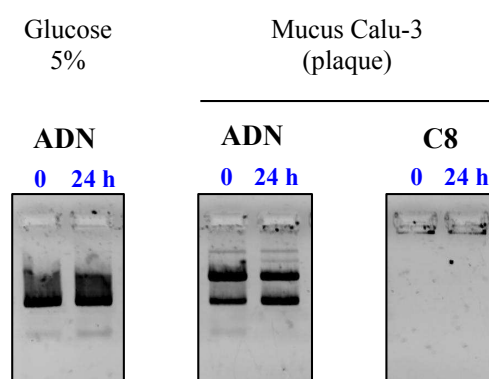


Figure 41. Stabilité des lipoplexes à base de lipide C8 dans le mucus cellulaire, révélée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les lipoplexes préparés par injection au rapport N/P de 4 (ou l'ADN plasmidique seul) ont été incubés pendant 0 ou 24 h sous rotation lente dans une solution de glucose 5% ou dans le surnageant de cellules Calu-3 cultivées en plaque en absence de FBS.

III.2.2. Effet mucolytique des formulations

L'effet mucolytique des lipoplexes à base de lipide TC8 préparés par injection n'a pu être évalué que par rhéologie, par manque de temps. Les lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8 (à la concentration finale de 0,6 mM en lipides), ont été incubés pendant 1 h dans le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, puis les modules G' et G'' ont été mesurés (figure 42). Ces deux types de lipoplexes ont entraîné une augmentation de la viscoélasticité du mucus, comme les lipoplexes correspondant préparés à partir d'un film, mais de moindre amplitude. Par ailleurs, les

lipoplexes à base de lipide TC8 ont entraîné une augmentation de la viscoélasticité du mucus légèrement plus élevée que les lipoplexes à base de lipide C8.

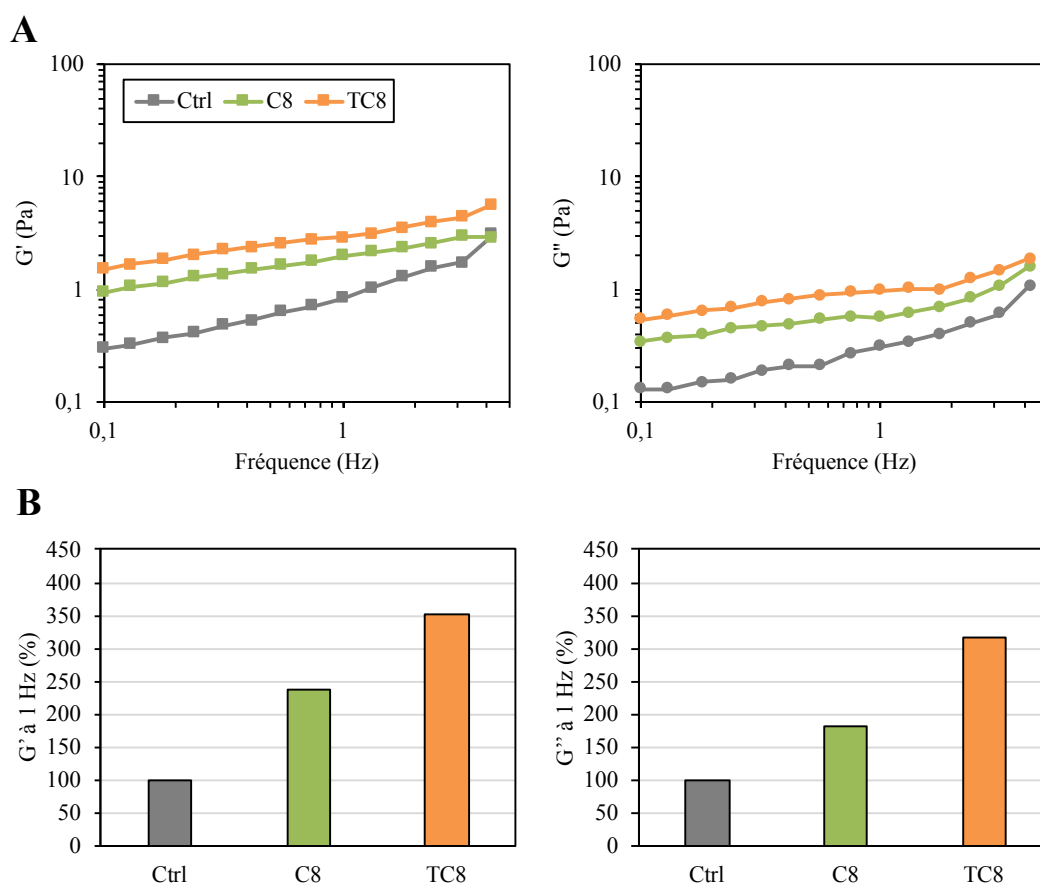


Figure 42. Effet des lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8 sur les propriétés rhéologiques du mucus. Le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours a été incubé pendant 1 h en rotation lente avec les lipoplexes à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange) préparés par la méthode par injection à une concentration finale de 0,6 mM, ou avec un volume équivalent de solution de glucose 5% (Ctrl, gris). Les modules élastique (G' , ■) et visqueux (G'' , ●) ont ensuite été mesurés sur une échelle de fréquence de 0,1 à 17,8 Hz. **(B)** Les résultats des modules G' et G'' mesurés à 1 Hz ont été rapportés à ceux obtenus avec le mucus non traité.

En conclusion, ces données suggèrent l'absence d'activité mucolytique des lipoplexes à base de lipide TC8 même formulés par injection, c'est-à-dire sous la forme de lipoplexes de petite taille.

III.2.3. Efficacité de transfection des formulations

Nous avons évalué l'efficacité de transfection des lipoplexes préparés par injection en nous concentrant, comme précédemment, sur le couple de lipides C8/TC8, et en privilégiant les modèles cellulaires Calu-3 cultivé en plaque et Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours (figure 43).

Dans un premier temps, l'activité de transfection a été mesurée à 24 h, comme dans le cas des formulations préparées à partir d'un film. Une activité de transfection a été mise en évidence dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque pour les lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8, et cette activité était comparable pour les deux types de lipoplexes. En revanche, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, aucun des lipoplexes n'a montré d'efficacité. Ces données, similaires à celles obtenues avec les formulations préparées à partir d'un film, suggèrent que le mucus présent dans ce modèle représente également une barrière pour ces lipoplexes plus petits, et que les lipoplexes à base de lipide TC8 n'ont pas d'activité mucolytique.

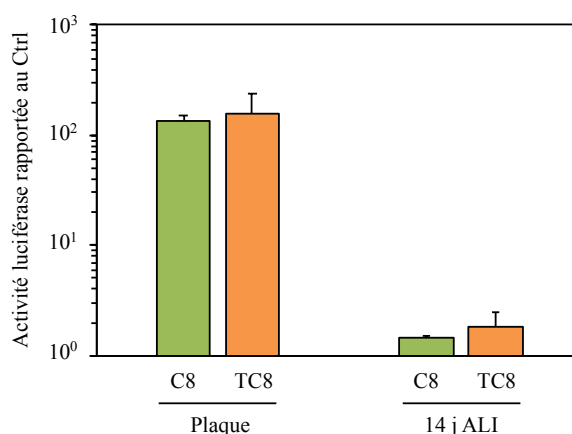


Figure 43. Efficacité de transfection, à 24 h, des lipoplexes préparés par injection à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange), dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque (Plaque) ou en ALI pendant 14 jours (14 j ALI). L'activité de transfection a été rapportée, dans chaque condition, à celle des cellules non exposées (Ctrl). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'un triplicat réalisé au sein d'une expérience.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mesurer l'activité de transfection de nos lipoplexes à un temps plus long. En effet, parmi nos modèles cellulaires, le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours est celui qui est recouvert d'une couche de mucus à l'épaisseur et aux propriétés viscoélastiques qui reproduisent le mieux les caractéristiques du mucus pulmonaire humain. Or, dans ce modèle, l'état de quiescence des cellules ne permet peut-être pas de visualiser une activité de transfection quand elle est mesurée à un temps court. Ainsi, nous avons exposé ce modèle aux lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8, préparés à partir d'un film ou par injection, et évalué l'efficacité de transfection à 72 h (figure 44). À noter que dans ces expériences, les lipoplexes ont été retirés à 24 h et remplacés par du milieu de culture frais. Dans ces conditions, une activité de transfection a pu être mesurée pour les deux formulations, confirmant notre hypothèse. Toutefois, quelle que soit la méthode de préparation des lipoplexes, et donc leur taille, les lipoplexes à base de lipide TC8 ne présentaient pas une meilleure activité de transfection que ceux préparés à partir de lipide C8.

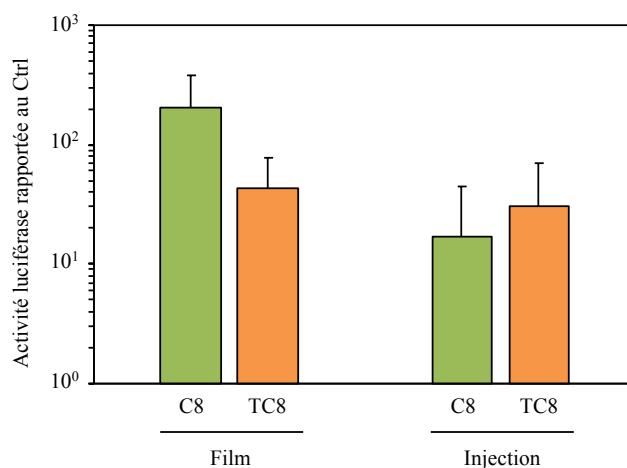


Figure 44. Efficacité de transfection, à 72 h, des lipoplexes à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange), préparés à partir d'un film ou par injection, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Les lipoplexes ont été retirés 24 h après le début de l'exposition et remplacés par du milieu de culture frais. L'activité de transfection a été rapportée, dans chaque condition, à celle des cellules non exposées (Ctrl). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'au moins 2 expériences indépendantes.

Ainsi, nos données de transfection sur des lipoplexes préparés par injection suggéraient là encore une absence d'activité mucolytique de nos vecteurs cationiques monosoufrés.

III.2.4. Internalisation des formulations

Si l'ensemble de ces résultats ne vont pas en faveur de l'utilisation des lipides monosoufrés pour l'obtention de formulations mucolytiques, les expériences de transfection ne donnent pas d'information détaillée concernant toutes les étapes intermédiaires entre la progression des lipoplexes dans le mucus et l'expression du transgène. À ce stade de notre travail et afin de progresser dans la compréhension de notre problématique, nous avons donc décidé d'étudier l'internalisation de nos lipoplexes. En effet, l'internalisation fait le lien entre la capacité des lipoplexes à traverser le mucus et l'expression du transgène. Dans notre travail, l'étude de l'internalisation des lipoplexes a été menée sur les lipoplexes à base de lipide C8 ou de lipide TC8 préparés à partir d'un film ou par injection, dans deux modèles cellulaires : les cellules Calu-3 cultivées en plaque et les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. L'internalisation a été étudiée par cytométrie en flux, en incorporant un plasmide d'ADN marqué au Cy5 dans les formulations. Dans les expériences de transfection sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours décrites à la figure 44, les lipoplexes ont été retirés 24 h après leur ajout aux cellules. Nous avons donc évalué l'internalisation des lipoplexes à ce temps.

L'analyse des données s'est révélée très délicate. Sur un cytogramme FSC-A/SSC-A, les événements présentaient une importante diversité morphologique (taille, granulosité), et près de 90% d'entre eux correspondaient à des cellules mortes ou à des débris cellulaires. Le traitement nécessaire au détachement total des cellules des inserts en vue de leur analyse en cytométrie (20 minutes avec de

la trypsine 5X) est probablement à l'origine d'une partie de la mort cellulaire. De même, le tapis cellulaire n'est soumis à aucun lavage pendant les 14 jours de culture en ALI, ce qui peut entraîner une accumulation de débris cellulaires. Nous avons également constaté que les cellules Calu-3 ont une forte tendance à agréger. En effet, près de la moitié des 10% d'événements qui ne correspondaient pas à des débris cellulaires, apparaissaient comme des multiplets de cellules sur un cytogramme SSC-H/SSC-W. En excluant les débris cellulaires, les cellules mortes, et les multiplets de cellules, comme cela est effectué conventionnellement, l'analyse finale concernait moins de 5% des événements identifiés par le cytomètre. Enfin, même après cette sélection, l'autofluorescence des cellules non exposées, dans le canal Cy5 (canal de réception du signal de l'ADN marqué), était extrêmement importante et hétérogène, allant de 0 à plus de 10^4 unités de fluorescence. En définitive, dans les cellules exposées, les quantités de matériel internalisé étaient trop faibles pour que cette fluorescence se démarque clairement de celle des cellules non exposées, et en particulier des plus autofluorescentes d'entre elles, faisant que les pourcentages d'internalisation étaient globalement estimés comme étant inférieurs à 2%. Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence (MFI), présentées sur la figure 45, étaient donc les données qui permettaient la comparaison la plus appropriée des différentes conditions expérimentales testées. Ces résultats indiquaient une internalisation globalement plus élevée des lipoplexes préparés à partir d'un film, comparés aux lipoplexes préparés par injection, et une internalisation plus élevée des lipoplexes à base de lipide C8 comparés aux lipoplexes à base de lipide TC8, peu importe la méthode de préparation.

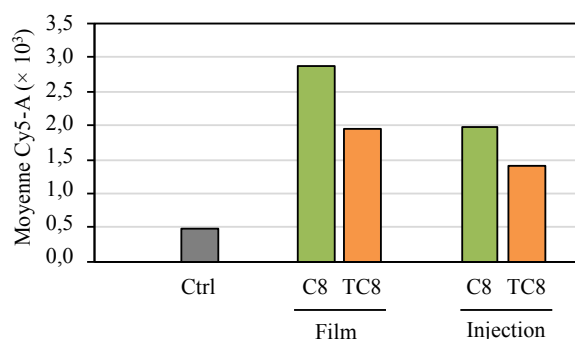


Figure 45. Présence d'ADN intracellulaire marqué au Cy5 dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, après 24 h d'exposition à des lipoplexes à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange) obtenus à partir d'un film ou par injection et incorporant de l'ADN marqué au Cy5. La moyenne du signal Cy5-A est représentée en fonction des conditions d'exposition. Ctrl = cellules non exposées.

Pour nous placer dans des conditions dans lesquelles les caractéristiques des cellules seraient moins problématiques, nous avons décidé de reproduire cette comparaison dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, à un temps d'exposition plus court (4 h). Le détachement des cellules en vue de leur analyse était plus facile (12 minutes de traitement par la trypsine 5X) que dans les cellules cultivées en ALI. De même, les cellules mortes et les débris étaient beaucoup moins nombreux, correspondant ici à moins de 10% des événements (figure 46A). En revanche, les cellules restaient encore fortement agrégées, puisque plus de 60% des événements apparaissaient comme des multiplets de cellules sur un

cytogramme SSC-H/SSC-W (figure 46B). Encore une fois et comme conventionnellement, nous avons choisi d'écarter les multiplets de cellules lors des analyses d'internalisation, ce choix se révélant par la suite avoir peu d'impact sur la tendance générale des résultats. Sur la figure 46C, on peut observer que les intensités de fluorescence dans les cellules exposées étaient très étendues, dénotant des quantités de matériel internalisé fortement hétérogènes. Pour mieux appréhender les résultats, ceux-ci ont été exprimés en pourcentage de cellules ayant internalisé le plasmide (figure 46D) et en MFI (figure 46E). Dans l'ensemble, les pourcentages d'internalisation étaient très élevés, oscillant entre 45% (TC8 film) et 78% (C8 injection), contre < 0,2% pour les cellules non exposées. Quelle que soit la méthode de préparation des lipoplexes, ils étaient légèrement plus faibles pour les lipoplexes à base de lipide TC8 que pour ceux préparés à partir de l'analogue oxygéné C8 (film : 45% vs 55%, injection : 64% vs 78%, respectivement) (figure 46D). La même conclusion transparaissait de l'analyse des MFI (figure 46E). Dans cette analyse, les différences les plus marquées apparaissaient toutefois entre les deux modes de préparation des formulations. En effet, sur la figure 46C, on remarque un profil totalement différent selon que les cellules étaient exposées aux lipoplexes préparés à partir d'un film ou par injection. En effet, la fluorescence des cellules qui ont été exposées aux lipoplexes préparés par injection se démarque plus de l'autofluorescence des cellules non exposées que la fluorescence des cellules qui ont été exposées aux lipoplexes préparés à partir d'un film. En contrepartie, une partie des cellules exposées aux lipoplexes préparés à partir d'un film semble avoir internalisé des quantités importantes de plasmide, permettant de dépasser une intensité de fluorescence (Cy5-A) de 2×10^5 , non atteinte avec les lipoplexes préparés par injection. Ces différences se reflètent sur les pourcentages d'internalisation et sur les MFI, respectivement plus élevés et plus basses pour les cellules exposées aux lipoplexes préparés par injection que pour celles exposées aux lipoplexes préparés à partir d'un film. Les données obtenues à 4 h dans le modèle Calu-3 en plaque ressemblent donc à celles obtenues à 24 h sur les cellules cultivées en ALI pendant 14 jours, et permettent de formuler des conclusions, à savoir d'une part, que la quantité de matériel internalisé est globalement plus élevée pour les lipoplexes préparés à partir d'un film que pour les lipoplexes préparés par injection, et d'autre part, qu'elle est plus élevée pour les lipoplexes à base de lipide C8 comparés aux lipoplexes à base de lipide TC8, quelle que soit la méthode de préparation des formulations. Ces résultats sont donc en défaveur d'un effet mucolytique des lipides monosoufrés qui se traduirait par une augmentation de leur diffusion dans le mucus.

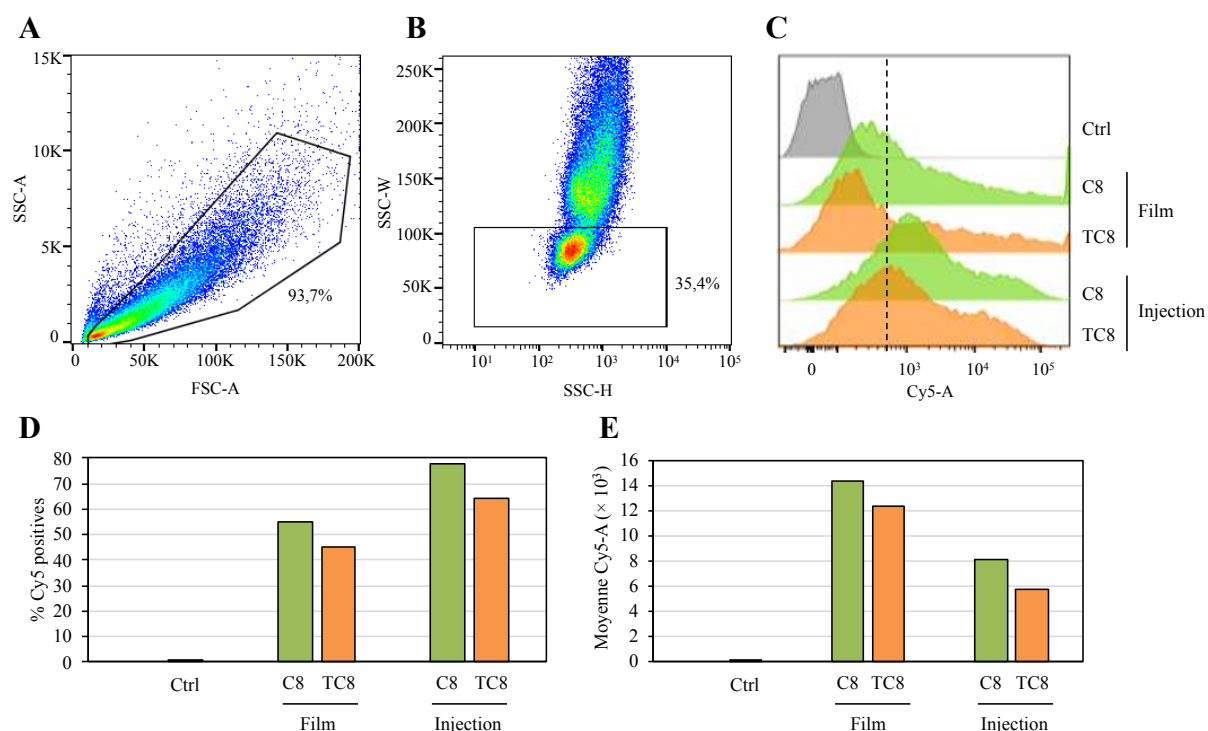


Figure 46. Internalisation de l'ADN marqué au Cy5 dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, après 4 h d'exposition aux lipoplexes à base de lipide C8 (vert) ou de lipide TC8 (orange) obtenus à partir d'un film ou par injection. **(A)** Morphologie des cellules selon l'aire de leur signal FSC (FSC-A, représentant leur taille) et de leur signal SSC (SSC-A, représentant leur granulosité). Le pourcentage indiqué correspond aux événements encadrés, conservés pour l'analyse. **(B)** Les événements conservés en **(A)** sont représentés sur un cytotogramme selon la largeur (SSC-W) et la hauteur (SSC-H) de leur signal SSC. Le pourcentage indiqué correspond aux événements encadrés (excluant les multiplets de cellules) conservés pour la suite de l'analyse. Les cytotogrammes observés en **(A)** et **(B)** ont été obtenus sur les cellules non exposées. **(C)** Distribution des événements en fonction de l'aire du signal Cy5 (Cy5-A, représentée sur une échelle bi-exponentielle). Chaque courbe correspond à une condition d'exposition, indiquée sur la droite. La ligne pointillée sépare les événements positifs pour le signal Cy5 des événements négatifs. **(D)** Pourcentages d'événements positifs pour le signal Cy5 (pourcentage d'internalisation) en fonction des conditions d'exposition. **(E)** Moyenne du signal Cy5-A en fonction des conditions d'exposition. Ctrl = cellules non exposées.

Cette partie du travail de thèse a porté sur l'évaluation de l'activité mucolytique et de l'activité de transfection de lipoplexes à base de lipides cationiques monosoufrés préparés selon deux méthodes, en se focalisant particulièrement sur le couple de lipides C8/TC8. Dans l'ensemble, aucun des résultats présentés n'indique que les lipides cationiques monosoufrés synthétisés pour ce travail induisent une déstructuration du mucus aux concentrations testées. En accord avec ces résultats, les lipoplexes à base de lipides monosoufrés présentent des coefficients de diffusion dans le mucus, des taux d'internalisation cellulaire et des efficacités de transfection équivalents voire inférieurs à ceux des lipoplexes à base de leurs analogues oxygénés. Les caractéristiques des lipoplexes préparés à partir d'un film (taille moyenne supérieure à 350 nm, charge nettement positive), ont orienté ce travail vers la méthode de préparation par injection, qui permettait la formation de lipoplexes moins volumineux (taille moyenne inférieure à 200 nm). Si l'étude sur les lipoplexes préparés par injection doit encore être approfondie, notamment en MPT, elle a, jusqu'à présent, suggéré que malgré cette différence de taille, l'absence de déstructuration

du mucus observée avec les lipoplexes préparés à partir d'un film était reproduite avec les lipoplexes préparés par injection. La méthode de préparation des lipoplexes par injection a soulevé une autre interrogation. En effet, les lipoplexes préparés à partir d'un film montraient une meilleure efficacité de transfection et une meilleure internalisation que ceux préparés par injection dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, mais aussi dans ces mêmes cellules cultivées en ALI pendant 14 jours, recouvertes dans ce cas d'une épaisse couche de mucus. Aussi, au vu de l'ensemble de ces résultats sur les lipides monosoufrés, nous pouvons formuler l'hypothèse que la quantité d'agent mucolytique libérée lors de l'hydrolyse des lipides monosoufrés est trop faible pour générer une activité mucolytique. Ainsi, l'utilisation de lipides *helper* polysoufrés a été proposée comme deuxième stratégie pour former des lipoplexes à activité mucolytique.

IV. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques et de lipides *helper* polysoufrés

Dans cette partie de notre travail, nous avons à nouveau axé nos recherches principalement sur le lipide cationique C8 et des formulations au rapport N/P de 4. Les formulations incorporant le lipide S3 ou le lipide S7 ont été préparées en suivant la méthode par injection permettant d'obtenir de petits lipoplexes. Une gamme de quantités d'entités thiols libérées a pu être testée en ajoutant aux formulations 1 ou 3 équivalents molaires (par rapport au lipide cationique) de lipide polysoufré (S3 ou S7). Lors de la caractérisation des formulations (tableau 14), nous avons mis en évidence que l'incorporation de l'un ou l'autre des lipides polysoufrés à un équivalent dans les formulations à base de lipide C8 n'avait pas d'incidence sur leurs caractéristiques : les lipoplexes avaient un diamètre entre 150 et 170 nm et une polydispersité importante ($> 0,2$). Avec 3 équivalents, toutefois, les diamètres étaient légèrement réduits (< 150 nm) et la polydispersité fortement atténuée ($< 0,2$). Quel que soit l'équivalent en lipide polysoufré, le N/P_c et le potentiel zêta n'avaient subi aucun changement (N/P_c de 2 et potentiel zêta de +30 mV environ). Ces caractéristiques, proches entre les formulations, nous ont permis d'envisager l'étude de nos lipides polysoufrés.

Comme précédemment, l'évaluation des formulations a consisté à étudier : 1-leur stabilité dans le mucus, 2-leur effet mucolytique, et 3-leur efficacité de transfection. Toutefois, toutes les concentrations en lipides polysoufrés n'ont pas pu être systématiquement testées, notamment dans les expériences les plus lourdes à mettre en œuvre. La majorité des données ont été obtenues sur des formulations contenant 3 équivalents de lipide S3, mais nous avons choisi de présenter l'ensemble de nos données.

IV.1. Stabilité des formulations dans le mucus

L'impact de l'incorporation des lipides polysoufrés sur la stabilité des formulations a été évalué après 24 h de contact des lipoplexes avec le mucus de cellules Calu-3 cultivées en plaque sans FBS. Nous avons fait varier la quantité de motifs thiols dans les formulations en incorporant 1 ou 3 équivalents de lipide S3 ou S7 (figure 47). Aucun ADN libre n'a été observé dans le gel d'électrophorèse après cette incubation, suggérant que ni la présence des lipides polysoufrés, ni l'augmentation de la quantité de motifs thiols ne provoquaient de libération prématurée de l'ADN dans le mucus.

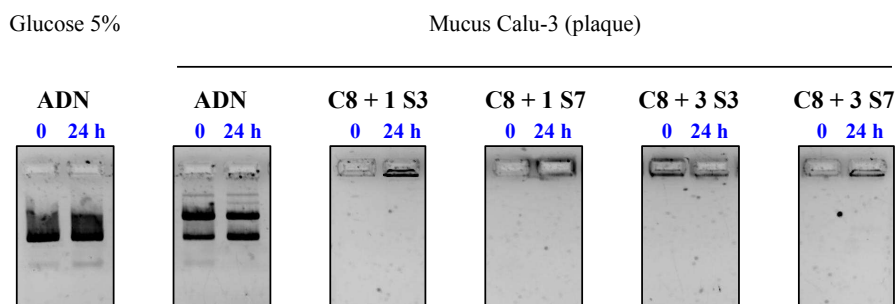


Figure 47. Stabilité, dans le mucus cellulaire, des lipoplexes à base du lipide C8 incorporant le lipide polysoufré S3 ou S7, révélée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les lipoplexes, préparés par injection au rapport N/P de 4 en présence de 1 ou 3 équivalent(s) de lipide S3 ou S7 (ou l'ADN plasmidique seul), ont été incubés pendant 0 ou 24 h sous rotation lente dans une solution de glucose 5% ou dans le mucus de cellules Calu-3 cultivées en plaque en absence de FBS.

En conclusion, les formulations incorporant les lipides polysoufrés ne montraient pas de problème d'instabilité empêchant la poursuite de notre étude.

IV.2 Effet mucolytique des formulations

L'effet mucolytique des formulations incorporant le lipide polysoufré S3 ou S7 a été évalué, directement et indirectement, par plusieurs approches : 1-rhéologie du mucus, 2-diffusion des lipoplexes dans le mucus, 3-pénétration des lipoplexes dans la couche de mucus, et 4-internalisation cellulaire des lipoplexes.

- Effet des formulations sur les propriétés rhéologiques du mucus

Tout comme lors de l'évaluation des lipides monosoufrés, la concentration de lipide cationique dans les formulations a été fixée à 0,6 mM (pour rappel : concentration atteinte dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours si l'on considère que tous les lipoplexes ajoutés aux cultures pénètrent dans la couche de mucus). Dans le cas des lipides monosoufrés, cette concentration en lipide cationique apportait 0,6 mM de motifs thiols (1 thiol par lipide). Les lipides S3 et S7 libèrent, respectivement, en moyenne, 3 et 7 entités thiols, ce qui a permis d'atteindre des concentrations en entités thiols 3 à 7 fois plus élevées qu'avec les lipides monosoufrés, soit potentiellement 1,8 et 4,2 mM. Néanmoins, la préparation de formulations incorporant 3 équivalents de lipide S3 ou S7 dans les conditions des analyses rhéologiques n'a pas pu être réalisée techniquement du fait de concentrations en lipides totaux (cationiques + polysoufrés) trop élevées. Ainsi, l'étude réalisée n'a porté que sur des préparations incorporant 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7. Ces préparations ont été incubées pendant 1 h dans du mucus de cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, avant une mesure des modules G' et G'' . L'expérience a été reproduite 3 fois, sur 3 échantillons de mucus différents.

De manière intéressante, les modules G' et G'' étaient systématiquement diminués lorsque le mucus était traité par les lipoplexes à base de lipide C8 incorporant les lipides polysoufrés comparés aux lipoplexes n'incorporant que le lipide C8 (figure 48A). Cette diminution de la viscoélasticité était comparable à l'effet du DTT (1 mM) présenté dans la figure 32. L'effet observé était significatif pour les lipoplexes à base de lipide polysoufré S7 ($p < 0,05$) indiquant que cette différence semblait être associée aux quantités d'entités thiols pouvant interagir avec les ponts disulfures des mucines. En effet, les lipoplexes incorporant le lipide polysoufré S3 ont induit une diminution moins prononcée que ceux incorporant le lipide S7 (diminution de G' de 39 et 56%, diminution de G'' de 51 et 71%, respectivement, à 1 Hz) (figure 48B).

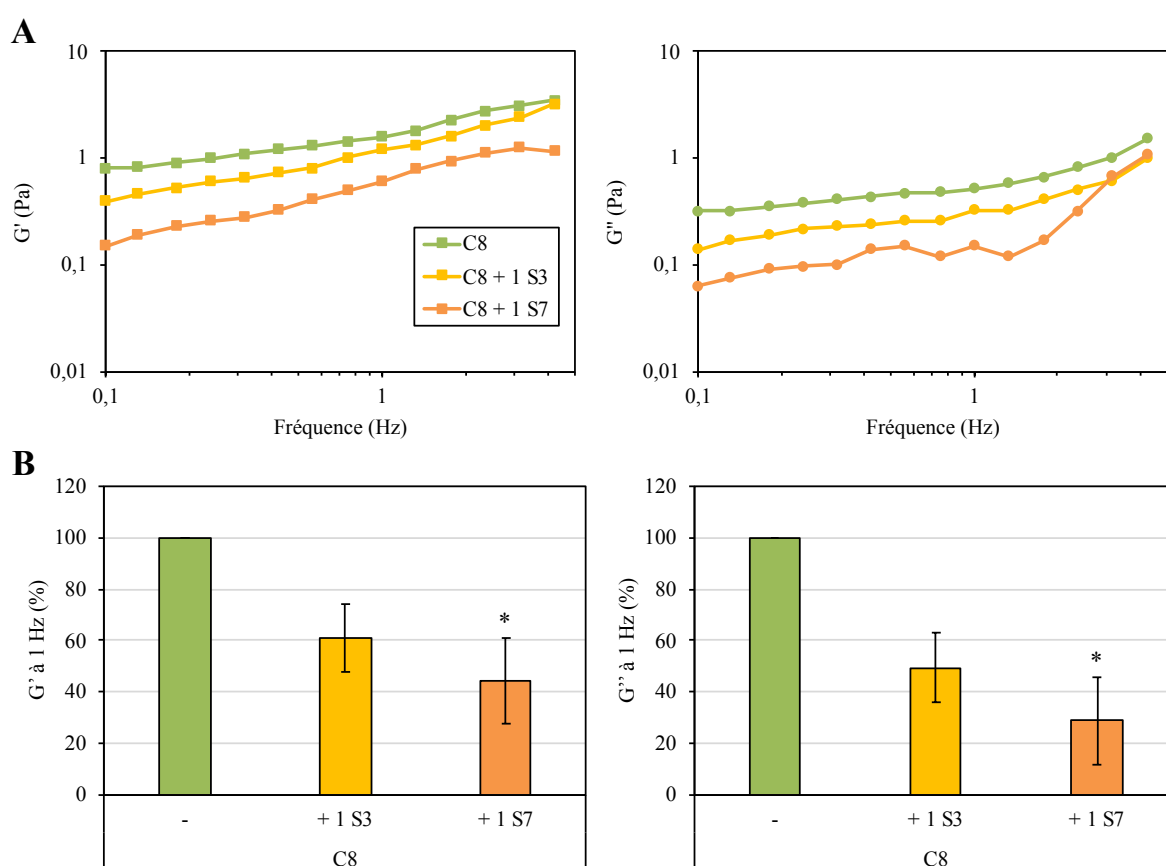


Figure 48. Modifications rhéologiques du mucus induites par les lipoplexes obtenus par injection à partir du lipide C8 en présence ou en absence de 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7. Le mucus prélevé sur des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours a été incubé à température ambiante pendant 1 h en rotation lente en présence des lipoplexes à base de lipide C8 seul (vert), de lipide C8 avec 1 équivalent de lipide S3 (jaune) ou de lipide C8 avec 1 équivalent de lipide S7 (orange). **(A)** Les modules élastique (G' , ■) et visqueux (G'' , ●) ont été mesurés sur une échelle de fréquence de 0,1 à 17,8 Hz. Résultats obtenus sur une expérience représentative parmi les 3 réalisées sur des échantillons de mucus différents. **(B)** Les résultats des modules G' et G'' mesurés à 1 Hz ont été exprimés par rapport à ceux obtenus avec le traitement C8 seul. Les données présentées sur la figure correspondent à la moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. Analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn, avec une significativité de * ($p < 0,05$).

En résumé, ces modifications rhéologiques mettent en évidence une activité mucolytique des formulations incorporant les lipides polysoufrés, et cette activité semble dépendante de la concentration en motifs thiols.

- Diffusion des formulations dans le mucus

Les études de macrorhéologie ont montré le pouvoir mucolytique des formulations incorporant les lipides polysoufrés. Nous avons donc cherché à évaluer si cette activité avait une répercussion sur la diffusion des lipoplexes dans le mucus. La diffusion des lipoplexes à base de lipide C8, avec ou sans lipide polysoufré S3 ou S7, a été étudiée dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours par MPT (figures 49 et 50). Nous avons réalisé l'expérience avec une formulation contenant 1 équivalent de lipide S7 (1 S7, soit 154 μM en motifs thiols) qui avait donné les meilleurs résultats en rhéologie, et une formulation contenant 3 équivalents de lipide S3 (3 S3, soit 198 μM en motifs thiols), afin de tester les deux lipides polysoufrés tout en se plaçant dans des conditions les plus proches possibles en termes de concentration en entités thiols. Dans une condition supplémentaire, des lipoplexes à base de lipide C8, sans lipide polysoufré, ont été testés en présence de NAC, un agent mucolytique de référence très utilisé dans la littérature. Une concentration de NAC de 20 mM, considérée comme comparable aux concentrations utilisées en thérapeutique, a été choisie. Dans chaque expérience, des acquisitions ont été réalisées dans le milieu de culture complet.

Dans le milieu de culture, les valeurs moyennes des coefficients de diffusion des lipoplexes étaient relativement homogènes, avec une diffusion légèrement plus rapide pour les lipoplexes incorporant les lipides polysoufrés (figure 49), ce qui est en accord avec le diamètre moyen légèrement plus bas de ces lipoplexes (un coefficient de diffusion moyen de 1,69 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ et un diamètre moyen de 169,2 nm pour les formulations à base de lipide C8, puis, respectivement, de 1,85 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ et 165,1 nm pour les formulations à base de lipide C8 avec 1 équivalent de lipide S7, et de 2,01 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ et 141,2 nm pour les formulations à base de lipide C8 avec 3 équivalents de lipide S3). Dans le mucus, les lipoplexes à base de lipide C8 étaient ralentis, avec un coefficient de diffusion moyen de 0,40 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, soit 4,2 fois plus faible que dans le milieu de culture (figure 49). Dans le mucus traité avec la NAC, les coefficients de diffusion étaient un peu plus homogènes et en moyenne légèrement plus élevés (0,46 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). De manière intéressante, les lipoplexes contenant 1 équivalent de lipide S7 ou 3 équivalents de lipide S3 avaient une diffusion dans le mucus nettement plus rapide en moyenne (0,75 et 0,68 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement, $p < 0,0001$) (figure 49A). De plus, dans les formulations incorporant le lipide S3 ou S7, une partie des lipoplexes représentant environ 11 à 15% des formulations (en prenant arbitrairement la limite de 1,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion) montrait une vitesse de diffusion élevée (figure 49B), tandis que seulement 2% des particules dépassaient cette vitesse dans les formulations à base du lipide C8, aussi bien en présence qu'en absence de NAC. Ainsi, l'activité mucolytique de la NAC, à une concentration représentative de celles utilisées en thérapeutique, s'est traduite par une moins

bonne diffusion des lipoplexes que celle résultant de l'incorporation des lipides polysoufrés dans nos formulations.

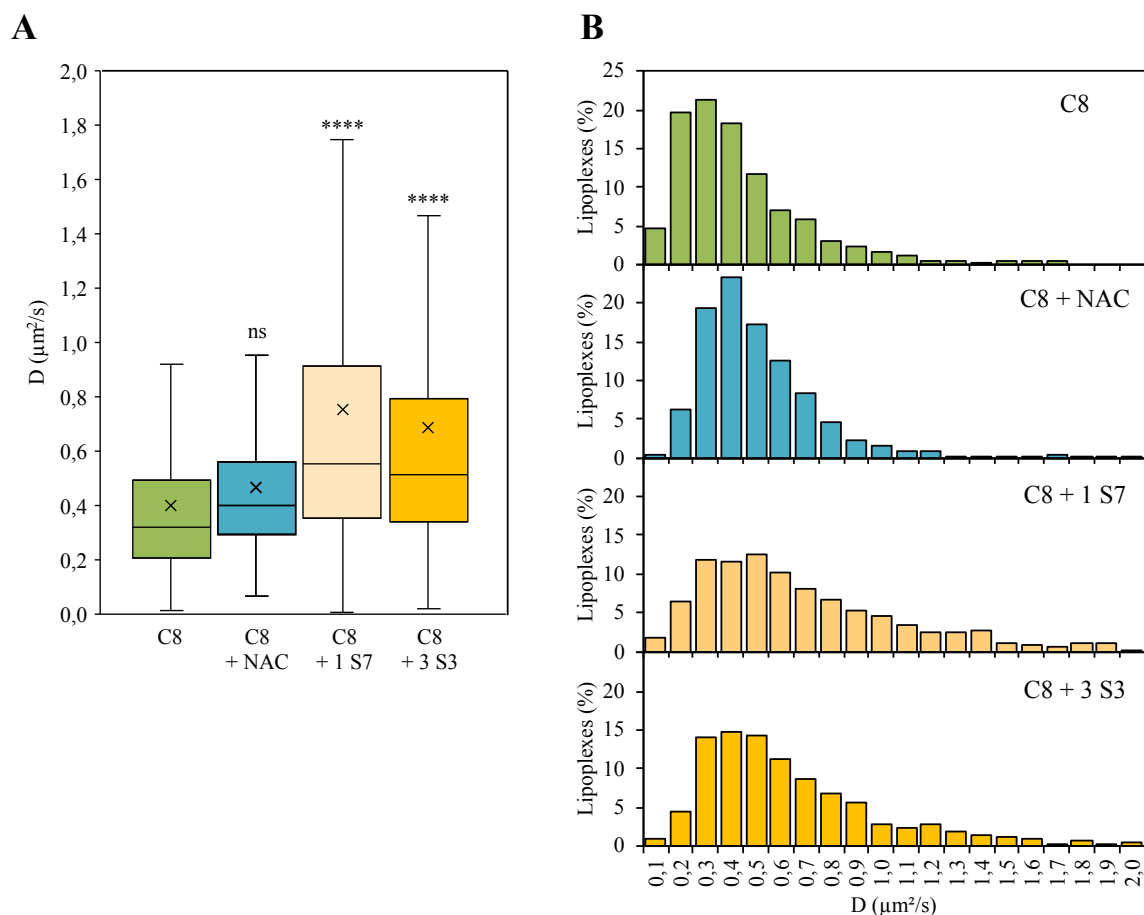


Figure 49. Diffusion des lipoplexes à base de lipide C8 incorporant, ou non, 1 équivalent de lipide S7 ou 3 équivalents de lipide S3 dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Les concentrations finales en motifs thiols dans le mucus sont de $340 \mu\text{M}$ dans le cas des formulations incorporant 1 équivalent de lipide S7 (C8 + 1 S7) et de $437 \mu\text{M}$ pour les formulations contenant 3 équivalents de lipide S3 (C8 + 3 S3). La concentration finale de *N*-acétylcystéine (NAC) dans le mucus est de 20 mM . **(A)** Représentation en boîte à moustaches des coefficients de diffusion, D . La moyenne est représentée par une croix, la médiane par une barre horizontale. **(B)** Distribution des coefficients de diffusion. Les données proviennent de 757 (C8), 1768 (C8 + NAC), 1256 (C8 + 1 S7) et 1468 (C8 + 3 S3) trajectoires obtenues sur 2 ou 3 expériences indépendantes. Analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn, avec une significativité de **** ($p < 0,0001$). ns = non significatif.

Pour tenter d'estimer l'élargissement des pores associé à l'activité mucolytique des différents traitements, le rayon des zones de confinement des lipoplexes a également été calculé. Les lipoplexes à base de lipide C8 étaient confinés dans des zones ayant un rayon moyen de $0,77 \mu\text{m}$, avec une médiane à $0,60 \mu\text{m}$ (figure 50). Alors que l'activité mucolytique avait accéléré les vitesses de diffusion des particules (augmentation du D), en particulier avec les lipides polysoufrés, les profils des r_c restaient pratiquement inchangés comme le confirment les médianes très proches (r_c de $0,64$ et $0,62 \mu\text{m}$ pour les formulations C8 + 1 S7 et C8 + 3 S3, respectivement). En revanche, bien que la valeur médiane du r_c

des lipoplexes à base de lipide C8 en présence de NAC ($0,67 \mu\text{m}$) a été estimée très proche de celle des mêmes lipoplexes en absence de NAC ($0,60 \mu\text{m}$), l'ensemble de la distribution des r_c dans ces deux conditions avec ou sans NAC est statistiquement différente ($p < 0,001$), révélant une ouverture systématique des espaces en présence de NAC qui semble se répercuter sur la distribution des r_c .

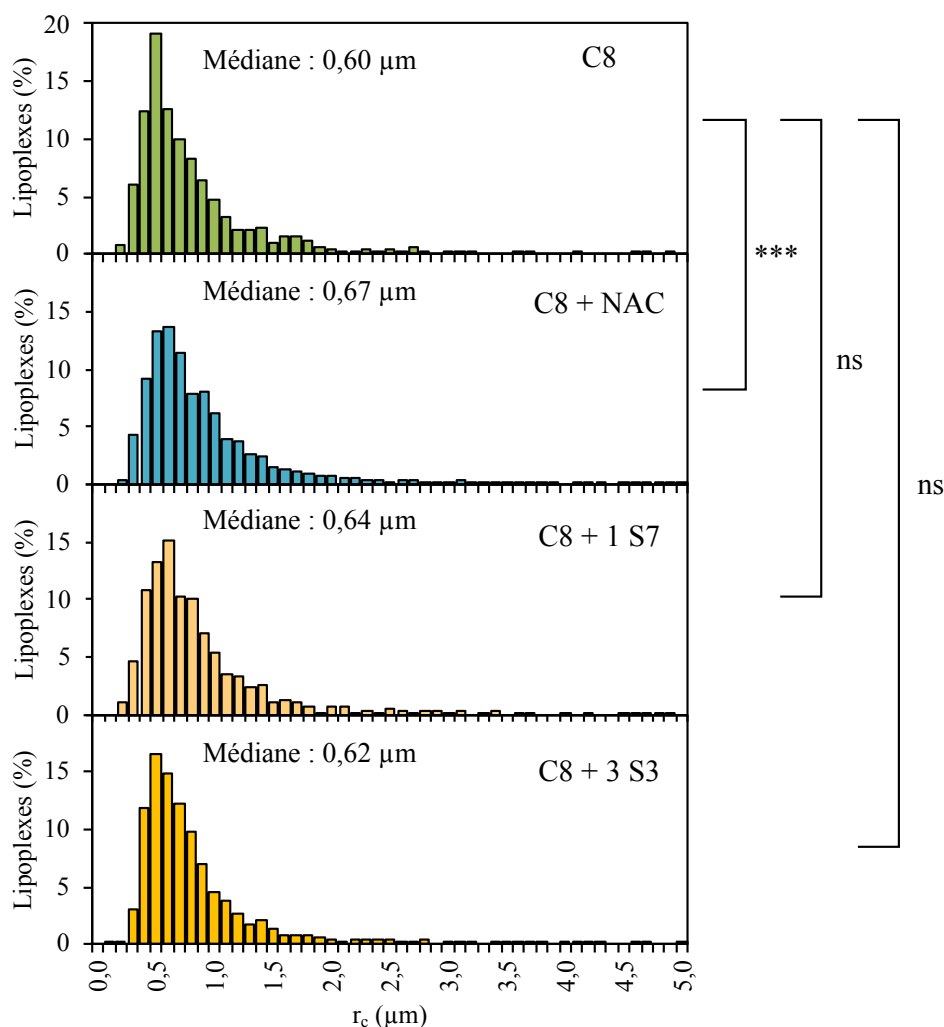


Figure 50. Rayon des zones de confinement (r_c) des lipoplexes, mesuré dans les mêmes conditions que dans la figure 49. Représentation sous la forme d'histogrammes de distribution. La médiane est indiquée dans la partie supérieure de chaque graphique. Analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn, avec une significativité de *** ($p < 0,001$). ns = non significatif.

En conclusion, l'activité mucolytique des formulations incorporant le lipide polysoufré S3 ou S7, mise en évidence par rhéologie, s'est traduite par une augmentation de la vitesse de diffusion de ces formulations dans le mucus.

- Pénétration des formulations dans le mucus

Les résultats de MPT ont révélé que les lipoplexes à base de lipides polysoufrés étaient capables de diffuser plus rapidement dans le mucus que ceux n'en incorporant pas. Toutefois, cette accélération ne

traduit pas nécessairement une meilleure pénétration dans le mucus, car le MPT n'analyse la diffusion des particules qu'à l'échelle microscopique, et la notion de direction du mouvement n'entre pas en jeu dans le calcul des coefficients de diffusion. Ainsi, on pourrait argumenter qu'une particule peut théoriquement se déplacer très rapidement dans le mucus sans jamais parvenir à sortir d'une zone dans laquelle elle est confinée. Nous avons donc cherché à visualiser la pénétration de nos formulations dans la couche de mucus recouvrant des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Ces expériences ont été réalisées sur des lipoplexes à base de lipide C8, contenant ou non 3 équivalents de lipide polysoufré S3 et marqués à la rhodamine-PE. Pour visualiser la pénétration des formulations dans la couche de mucus, nous avons utilisé la microscopie confocale, qui permet de scanner un échantillon de mucus en profondeur et de déterminer, après un intervalle de temps, jusqu'à quelle profondeur des particules marquées, déposées à la surface du mucus, ont progressé. Pour visualiser les mucines, une WGA marquée avec le fluorophore Alexa-488 a été utilisée pour ne pas interférer avec la fluorescence de la rhodamine. Pour permettre une meilleure visualisation des lipoplexes, les valeurs de fluorescence en-dessous d'un certain seuil dans le canal de la rhodamine, provenant majoritairement de l'autofluorescence des cellules, ont été exclues.

Les résultats de ces expériences sont présentés en figure 51. Dans la condition contrôle, sans dépôt de lipoplexes sur les cultures, aucun signal n'est observé dans le canal de la rhodamine (figure 51 : Ctrl). Trente minutes après leur dépôt sur les cultures, les lipoplexes à base de lipide C8 seul ont traversé les premiers micromètres de la couche de mucus (figure 51 : C8). De manière intéressante, les lipoplexes à base de lipide C8 incorporant 3 équivalents de lipide S3 sont beaucoup plus nombreux à avoir progressé dans la couche de mucus et à être parvenus à diffuser profondément dans celle-ci. En effet, certains d'entre eux se trouvent déjà à 20 μm de profondeur (figure 51 : C8 + 3 S3).

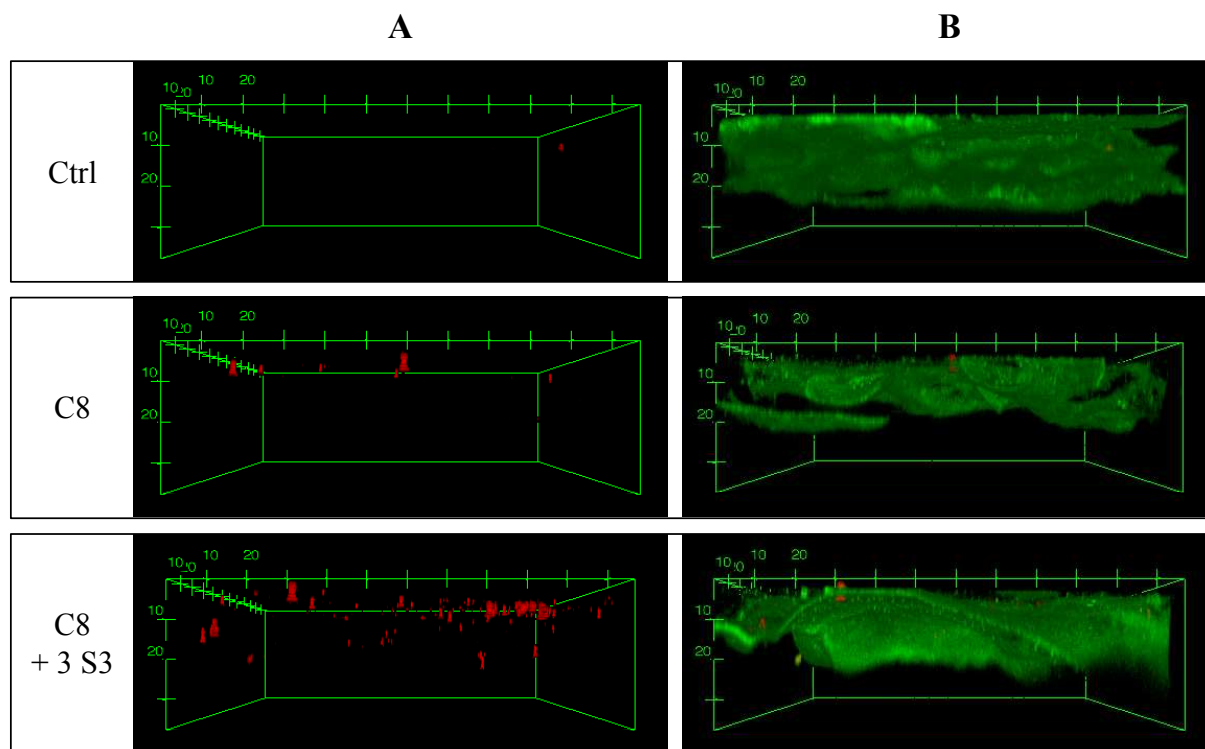


Figure 51. Pénétration dans le mucus des lipoplexes à base du lipide C8, incorporant ou non 3 équivalents de lipide S3 (3 S3). Les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours ont été mises en présence des lipoplexes marqués à la rhodamine-PE, puis, après lavage au PBS, elles ont été incubées avec la WGA conjuguée à l'Alexa-488. Les projections orthogonales (x, z) ont été reconstruites à partir des piles d'images acquises en microscopie confocale sur 40 μm de profondeur, en attribuant la couleur verte au signal recueilli après excitation à 488 nm (Alexa-488) et rouge à celui obtenu après excitation à 561 nm (rhodamine). **(A)** Seul le signal rouge est représenté. **(B)** Les signaux des deux canaux sont représentés. Le système de coordonnées est représenté en vert, et les valeurs sont en μm .

Ainsi, l'augmentation de la vitesse de diffusion des lipoplexes incorporant le lipide polysoufré dans le mucus (mise en évidence par MPT) s'est traduite par une augmentation de la pénétration de ces formulations dans le mucus.

- Internalisation des lipoplexes

Après la traversée de la couche de mucus, les lipoplexes transportant l'acide nucléique se retrouvent face à la membrane plasmique. Nous avons donc voulu vérifier si les différences de vitesse de diffusion et de pénétration des lipoplexes dans le mucus, en présence et en absence de lipide polysoufré, impactaient leur internalisation. Pour cela, des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours ont été exposées à des lipoplexes à base de lipide C8, incorporant ou non 3 équivalents de lipide polysoufré S3 et préparés avec un plasmide marqué au Cy5, et la présence intracellulaire du plasmide marqué a été évaluée par cytométrie en flux. Cette évaluation a été réalisée à 4 h et à 24 h après le début de l'exposition.

Les résultats (figure 52) ont montré une quantité de matériel internalisé plus importante à 24 h qu'à 4 h, ce qui semble indiquer qu'une internalisation des lipoplexes se fait au-delà de 4 h d'exposition. Aux deux temps, l'internalisation était comparable avec les lipoplexes à base de lipide C8 et de 3 équivalents de lipide S3 et avec ceux contenant seulement du lipide C8 ($1,1 \times 10^3$ vs $1,4 \times 10^3$ pour C8 vs C8 + 3 S3 à 4 h, et $1,9 \times 10^3$ vs $2,0 \times 10^3$ pour C8 vs C8 + 3 S3 à 24 h).

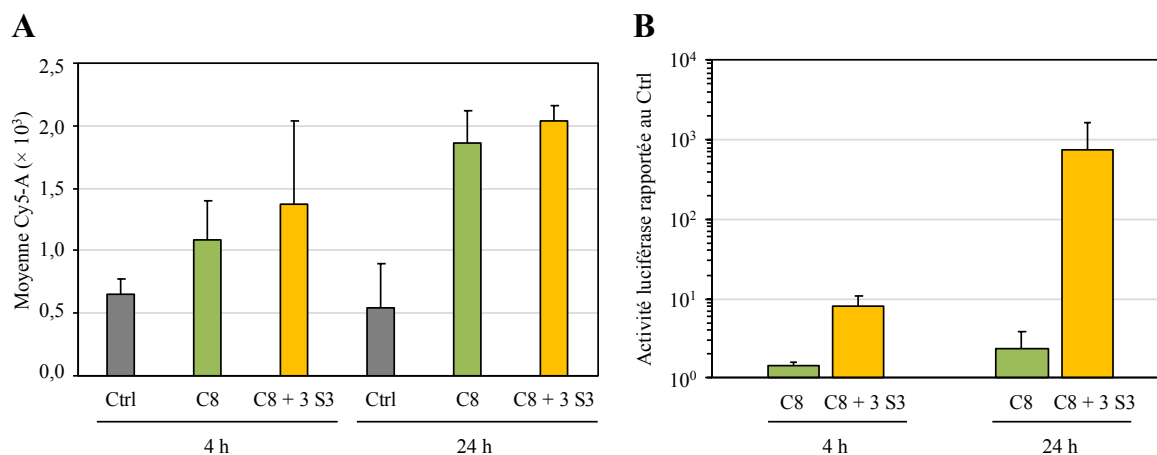


Figure 52. Internalisation et activité de transfection des lipoplexes à base de lipide C8 incorporant ou non 3 équivalents de lipide S3 (3 S3), dans les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, après 4 h ou 24 h de contact des lipoplexes avec les cellules. **(A)** Les résultats de l'internalisation correspondent à l'intensité moyenne du signal Cy5-A et sont exprimés sous forme de la moyenne \pm SD de 2 expériences indépendantes. **(B)** Efficacité de transfection des formulations mesurée à 72 h avec retrait des lipoplexes après 4 ou 24 h d'exposition. L'activité de transfection a été rapportée, dans chaque condition, à celle des cellules non exposées (Ctrl), et les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'un triplicat issu d'une expérience.

Dans cette expérience, l'activité de transfection des formulations a été mesurée en parallèle de l'internalisation, en retirant les lipoplexes après 4 ou 24 h d'exposition et en mesurant la transfection à 72 h. L'activité de transfection des formulations des lipoplexes à base de lipide C8 avec ou sans 3 équivalents de lipide S3 était supérieure lorsque les lipoplexes étaient laissés en contact avec les cellules pendant 24 h, ce qui confirme qu'une internalisation importante de lipoplexes se fait au-delà de 4 h d'exposition (figure 52B). De plus, les lipoplexes à base de lipide C8 et de lipide S3 montraient une meilleure efficacité de transfection que ceux à base de lipide C8 uniquement, que ce soit après 4 ou 24 h d'exposition.

Ainsi, l'activité mucolytique du lipide polysoufré S3, bien que non associée à une augmentation de l'internalisation cellulaire, entraînait une augmentation de l'activité de transfection des formulations à base de lipide C8.

IV.3. Efficacité de transfection des formulations

Nous avons complété les données de transfection sur les formulations incorporant le lipide C8 et 3 équivalents de lipide polysoufré S3, obtenues ci-dessus, en : 1-validant le choix du rapport N/P de 4, 2-évaluant l'impact de la quantité de motifs thiols apportées par les lipides polysoufrés sur l'activité de transfection du lipide C8, et 3-étudiant l'apport des lipides polysoufrés aux autres lipides cationiques. Dans certaines de ces expériences, le lipide polysoufré S7 a été testé en parallèle du lipide S3.

- Validation du rapport N/P de 4

Nous avons vérifié que le rapport N/P de 4 était adapté à l'évaluation de l'activité de transfection des lipoplexes incorporant les lipides polysoufrés. Pour cela, nous avons comparé l'activité de formulations préparées au rapport N/P de 1, 2, 3 ou 4, dans le modèle Calu-3 cultivé en plaque (figure 53). Ces travaux ont été réalisés sur une formulation à base de lipide C8 incorporant ou non 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7. Les résultats ont montré que l'activité de transfection des formulations à base de lipide C8 augmentait de façon similaire avec le rapport N/P, en absence et en présence de lipide polysoufré S3 ou S7.

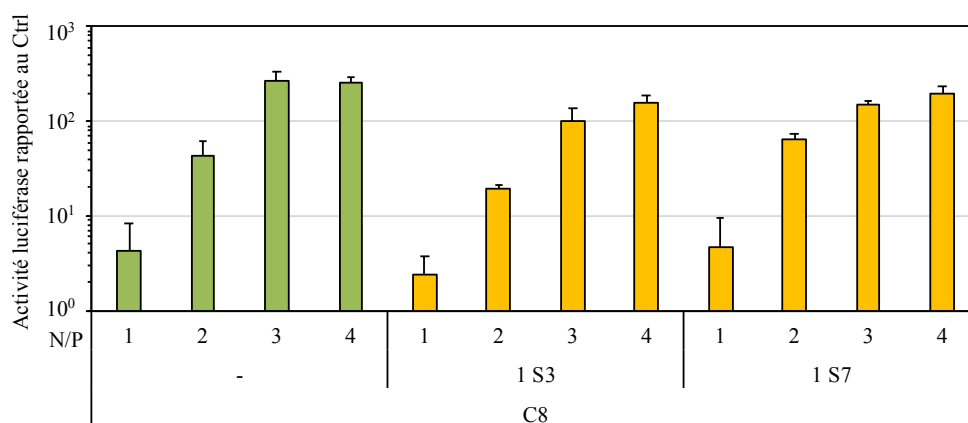


Figure 53. Activité de transfection des formulations à base de lipide C8, contenant ou non 1 équivalent de lipide polysoufré S3 ou S7, en fonction du rapport N/P. L'activité de transfection a été mesurée à 24 h dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, et rapportée à celle des cellules non exposées (Ctrl). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'un triplicat issu d'une expérience.

Ainsi, le rapport N/P de 4 restait un rapport optimal pour évaluer l'activité de transfection des formulations contenant les lipides polysoufrés, ceci quel que soit le lipide polysoufré.

- Effet de la quantité d'entités thiols dans les formulations

Une gamme de quantités d'entités thiols a été testée en ajoutant 1 ou 3 équivalents de lipide polysoufré S3 ou S7 aux formulations à base de lipide C8. Au rapport N/P de 4, ces nombres d'équivalent correspondaient, en conditions de transfection, à des concentrations finales en motifs thiol de 66 (1 S3),

154 (1 S7), 198 (3 S3) et 463 μM (3 S7). L'activité de transfection des formulations a été évaluée sur le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours (figure 54). L'effet de la NAC, ajoutée au milieu de culture à une concentration de 463 μM (soit une concentration en motif thiol équivalente à celle obtenue avec 3 équivalents de lipide S7) en même temps que des lipoplexes à base de lipide C8 seul, a été étudié en parallèle.

Aucune perte de viabilité n'a été observée avec les formulations testées (figure 54A), ni de mort cellulaire par nécrose. La NAC, mieux tolérée par les cellules que le DTT, n'a pas non plus entraîné de perte de viabilité. À la concentration équivalente à celle obtenue avec 3 équivalents de lipide S7, la NAC n'a pas entraîné d'augmentation de l'activité de transfection des lipoplexes à base de lipide C8. Il faut rappeler que la NAC agit sur l'ensemble du mucus, et non localement comme les lipides mucolytiques incorporés dans les particules de transfection. En revanche, l'activité de transfection des lipoplexes à base du lipide C8 augmentait avec le nombre d'entités thiols apportées par les lipides polysoufrés dans les formulations. Ainsi, la formulation incorporant le lipide C8 et 3 équivalents de lipide S3, correspondant à une concentration en entités thiols de 198 μM , a montré une activité luciférase significativement plus élevée (plus de 25 fois plus élevée qu'en absence de lipide polysoufré, $p < 0,0001$). De manière intéressante, la formulation comprenant le lipide C8 et 3 équivalents de lipide S7, correspondant à une concentration en entités thiols de 463 μM , a présenté une activité de transfection inférieure à celle de la formulation comprenant le lipide C8 et 3 équivalents de lipide S3 (seulement 5 fois plus élevée qu'en absence de lipide polysoufré), suggérant que trop d'entités thiols pourrait entraîner un effet inverse de celui recherché.

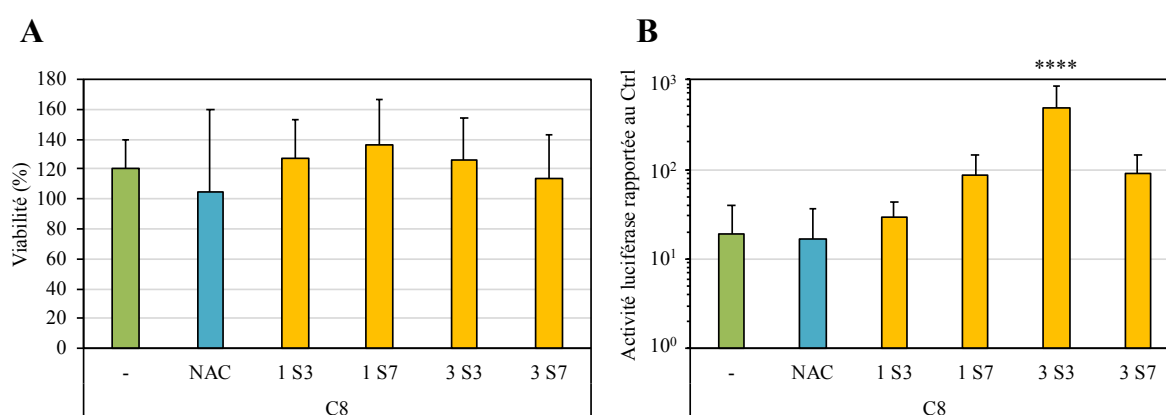


Figure 54. Impact du nombre d'entités thiols dans les formulations sur l'efficacité de transfection des lipoplexes à base du lipide C8. (A) La viabilité cellulaire et (B) l'activité de transfection des lipoplexes au rapport N/P de 4 et contenant ou non 1 ou 3 équivalent(s) de lipide polysoufré S3 ou S7 ont été mesurées 72 h après l'exposition aux lipoplexes, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Les lipoplexes ont été retirés 24 h après exposition en remplaçant le milieu d'exposition par du milieu de culture frais. L'absorbance (A) et l'activité luciférase (B) ont été rapportées à celle des cellules non exposées (Ctrl), et les résultats correspondent à la moyenne \pm SD d'au moins 2 expériences indépendantes. Analyse statistique par test ANOVA à un facteur suivi du test de comparaison multiple de Dunnett, avec une significativité de **** ($p < 0,0001$).

Ainsi, ces expériences ont confirmé les données décrites dans la figure 52, à savoir que l'activité mucolytique des lipides polysoufrés est associée à une augmentation de l'activité de transfection des formulations à base de lipide C8. Elles ont également montré que l'effet des lipides polysoufrés dépend de la quantité de motifs thiols apportée, et que cette quantité doit être optimale pour pouvoir observer un effet bénéfique à l'activité de transfection des lipoplexes à base de lipides cationiques.

- Apport des lipides polysoufrés dans les formulations obtenues à partir des autres lipides oxygénés
Pour déterminer si l'apport bénéfique des lipides polysoufrés, observé avec le lipide C8, était transposable aux autres lipides cationiques oxygénés, nous avons évalué l'efficacité de transfection des formulations formées à partir de lipide iC3, C4, C8, C12 ou C12' et de 3 équivalents de lipide S3, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours (figure 55).

Nos résultats ont montré que l'activité de transfection des lipoplexes préparés en présence de 3 équivalents de lipide S3 était systématiquement supérieure à celle des lipoplexes préparés uniquement à partir du lipide oxygéné, et ceci pour tous les lipides. L'apport des lipides polysoufrés variait toutefois en fonction du lipide cationique, puisque l'activité luciférase était multipliée au minimum par 7 dans le cas du lipide C4, et au maximum par 37 pour le lipide C8. Ainsi, une fois de plus, le lipide C8 s'avérait le plus intéressant de la série des lipides cationiques. De plus, donnée tout à fait intéressante, les lipides polysoufrés permettaient d'obtenir une activité avec le lipide iC3, resté inefficace dans le modèle Calu-3 en ALI pendant 14 jours (résultats non montrés), même quand l'activité de transfection était mesurée à 72 h.

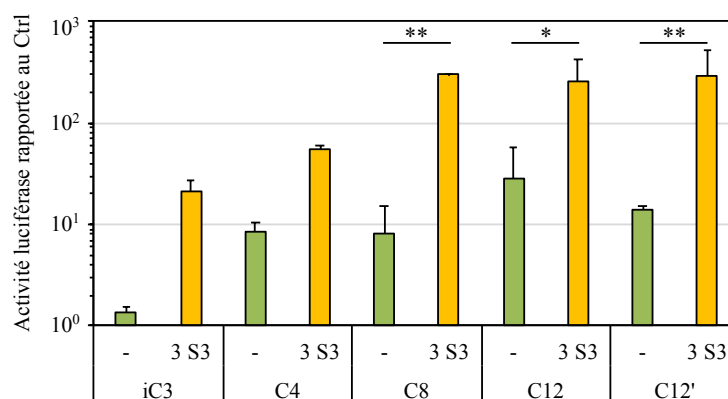


Figure 55. Efficacité de transfection des lipoplexes préparés à partir des lipides oxygénés, au rapport N/P de 4, sans ou avec 3 équivalents de lipide S3, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Les lipoplexes ont été mis en contact avec les cultures pendant 24 h, puis retirés en les remplaçant par du milieu de culture frais. L'activité de transfection a été mesurée à 72 h, et elle a été rapportée à celle des cellules non exposées (Ctrl). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 2 expériences indépendantes. Analyse statistique par test ANOVA à un facteur suivi du test de comparaison multiple de Sidak, avec une significativité de * ($p < 0,05$) et ** ($p < 0,01$).

En conclusion, nous avons montré que le lipide polysoufré S3 a un effet bénéfique sur l'efficacité de transfection de l'ensemble des lipides cationiques oxygénés.

Cette dernière partie des résultats a porté sur l'évaluation de notre deuxième stratégie pour préparer des lipoplexes à activité mucolytique, à savoir l'utilisation de lipides *helper* polysoufrés. Nos résultats ont mis en évidence que l'incorporation de ces lipides aux formulations permet aux lipoplexes de déstructurer le mucus et de diffuser plus rapidement dans celui-ci à l'échelle micro- comme à l'échelle macroscopique. L'efficacité de transfection des lipoplexes formés avec les lipides polysoufrés s'en trouve augmentée. Ces résultats ont été principalement obtenus avec le lipide C8 et le lipide polysoufré S3, mais nos données de transfection ont montré que le lipide polysoufré S3 augmentait aussi l'activité de transfection des autres lipides cationiques. De plus, les données de MPT et de transfection ont suggéré 1-l'importance de l'action locale des lipoplexes par rapport à celle, générale, des agents mucolytiques tels que le DTT ou la NAC, et 2-l'importance de la concentration en entités thiols, qui pourrait avoir l'effet inverse de celui recherché en cas de concentration trop élevée. Quoi qu'il en soit, les lipides *helper* polysoufrés apparaissent comme un bien meilleur moyen d'armer les lipoplexes contre le mucus que les lipides cationiques monosoufrés.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer le potentiel de vecteurs lipidiques innovants pour la thérapie génique par voie pulmonaire. Le côté novateur et original du projet était de conférer des propriétés mucolytiques intrinsèques aux lipoplexes, afin de faciliter leur passage à travers le mucus pulmonaire. En effet, en accord avec les propriétés physicochimiques du mucus présentées en première partie du manuscrit, nombreuses sont les études dans lesquelles les auteurs montrent que le mucus constitue une barrière pouvant être responsable d'une diminution de l'efficacité des vecteurs utilisés en transfection (Ferrari et al., 2001; Hibbitts et al., 2011; Ibrahim et al., 2011; Rosenecker et al., 2003).

Nos données seront discutées dans les parties qui suivent. Cette discussion portera sur : 1-le choix et la caractérisation des modèles d'étude, et 2-l'évaluation des formulations à base de lipides cationiques monosoufrés ou de lipides *helper* polysoufrés.

I. Choix et caractérisation des modèles d'étude

Nous allons aborder, ici, successivement, les modèles cellulaires et de mucus qui ont été mis en place, et la caractérisation de ces modèles à l'aide de formulations à base de lipides oxygénés, de billes de polystyrène et/ou d'agents mucolytiques, qui nous a permis d'évaluer leur pertinence.

I.1. Choix des modèles cellulaires

Les modèles cellulaires mis en place devaient nous permettre d'évaluer le potentiel des lipoplexes mucolytiques. Ces modèles devaient opposer une contrainte suffisamment importante à des lipoplexes non mucolytiques, représentés dans notre travail par les lipoplexes à base de lipides oxygénés, pour pouvoir mettre en évidence le bénéfice apporté par une activité mucolytique dans les lipoplexes à base de lipides souffrés. Le fait de posséder des modèles caractérisés par une large gamme de production de mucus était pour cela essentiel, car nous ne savions pas avec quelle ampleur l'activité mucolytique de nos lipoplexes pouvait améliorer leur efficacité de transfection en présence de mucus, ni même si cette amélioration serait visualisable quelle que soit la quantité de mucus présente.

Aussi, nous avons fait le choix d'utiliser deux lignées épithéliales pulmonaires humaines connues pour produire du mucus, et de moduler leur production de mucus par différents traitements ou modes (conditions) de culture, afin d'obtenir des modèles caractérisés par différentes production de mucus. Nous avons ainsi utilisé les cellules NCI-H292 et Calu-3, qui sont des lignées immortalisées dérivées, respectivement, d'un carcinome mucoépidermoïde pulmonaire humain et d'un adénocarcinome bronchique humain. Ces deux lignées sont connues pour produire du mucus lorsqu'elles sont cultivées en condition immergée à confluence (Kreft et al., 2015; Perrais et al., 2002). La notion de confluence est importante dans notre travail, car elle marque une distinction avec les protocoles standards de transfection *in vitro*, et en particulier ceux utilisés habituellement dans notre

laboratoire, dans lesquels les particules de transfection sont testées sur des cellules cultivées à faible densité pour maintenir les processus de division cellulaire favorables à la transfection (Pierrat et al., 2013a, 2016a).

Dans la littérature, la lignée NCI-H292 a été largement utilisée pour étudier la régulation des gènes *muc*. Les mucines MUC2 et MUC5AC ont été mises en évidence dans le mucus produit par ces cellules (Perrais et al., 2002), et une expression des ARNm des mucines MUC1, MUC2, MUC4 et MUC5B a également été détectée (Berger et al., 1999; Perrais et al., 2002). De plus, de nombreux agents, dont des extraits de fumée de cigarette, sont connus pour induire la production de mucus (et en particulier de la mucine MUC5AC) par cette lignée (Kanai et al., 2015; Shao et al., 2004). Dans notre cas, en l'absence de traitement, les cellules NCI-H292 produisaient relativement peu de mucine MUC5AC, conformément aux données de la littérature (Oguma et al., 2011), mais cette production a pu être multipliée par 8 à l'aide d'un traitement à l'EGF, et par 16 par une exposition à des allergènes (extrait d'acariens). L'amplitude de l'induction par l'EGF est en accord avec ce qui a été décrit précédemment dans les cellules NCI-H292 (Nishimoto et al., 2010; Perrais et al., 2002). Des études ont également montré que les extraits allergéniques d'acariens peuvent activer les voies de signalisation liées à l'EGF dans cette lignée en se liant à l'EGF-R (Heijink et al., 2007, 2010).

Les cellules Calu-3, quant à elles, sont considérées comme étant les plus représentatives de l'épithélium bronchique natif. Elles produisent du mucus en quantités significatives lorsqu'elles sont cultivées à confluence en condition immergée, MUC5AC étant de loin la mucine la plus décrite dans ces cellules, même si les ARNm des mucines MUC1, MUC4 et MUC5B y ont également été détectés (Berger et al., 1999; George et al., 2015a). Comme pour la lignée NCI-H292, certains traitements peuvent être utilisés pour augmenter la production de MUC5AC par les cellules Calu-3, notamment l'acroléine, un irritant majeur présent dans la fumée de cigarettes (Mura et al., 2011), ou une privation totale en sérum (Sanchez-Guzman et al., 2021). Néanmoins, cette lignée est majoritairement utilisée dans des cultures sur inserts en ALI. En effet, dans ces conditions, les cellules Calu-3 se différencient avec le temps de culture, formant après plusieurs jours à plusieurs semaines un épithélium colonnaire pseudostratifié et polarisé, caractérisé par un phénotype mixte de cellules ciliées et de cellules sécrétrices (Grainger et al., 2006; Jeong et al., 2019; Kreft et al., 2015; Shen et al., 1994; Stentebjerg-Andersen et al., 2011; Vllasaliu et al., 2011). Par ailleurs, leur production de mucus change radicalement, puisqu'elles se chargent de granules sécrétoires pour produire des quantités de mucus nettement augmentées, mucus dans lequel les mucines MUC5AC, MUC5B, MUC1 et MUC16 ont récemment été identifiées (Lee et al., 2021; Sanchez-Guzman et al., 2021). En accord avec ces données de la littérature, nous avons observé que la concentration en MUC5AC est 137 fois augmentée dans les surnageants de cellules Calu-3 cultivées en plaque par rapport aux cellules NCI-H292 non traitées. Nous avons également obtenu une augmentation de la production de MUC5AC dans les cultures sur inserts, qui était proportionnelle à la durée de culture en ALI, à savoir 3, 7 ou 14 jours. En parallèle de cette augmentation,

nous avons mis en évidence une couche de mucus se formant à la surface du tapis cellulaire, couche dont l'épaisseur augmentait jusqu'à atteindre 20 μm à 14 jours d'ALI. De manière intéressante, cette épaisseur est comparable à celle du mucus présent dans des tubes bronchiques humains (Bandi et al., 2021; Bansil and Turner, 2018). Ainsi, nous avons développé, au total, six modèles caractérisés par une production et une épaisseur de mucus croissantes.

I.2. Choix du modèle de mucus

Les échantillons de mucus utilisés dans la littérature ont des origines très hétérogènes. Ils sont prélevés chez l'Homme ou chez l'animal, sur des cellules primaires ou des lignées cellulaires cultivées dans différentes conditions, ou sont reconstitués à partir de mucines purifiées et lyophilisées. Bien entendu, le choix d'utiliser l'un ou l'autre de ces modèles est multifactoriel. Il dépend notamment de l'accessibilité de chacun des modèles et des objectifs visés. Par exemple, le mucus reconstitué à partir de lyophilisat de mucines est particulièrement utilisé pour rechercher les interactions entre les composants du mucus et les particules, puisqu'il permet notamment d'ajuster facilement les concentrations en mucines et de décomposer l'effet des différents constituants du mucus (Ibrahim et al., 2011; Nafee et al., 2018; Sanders et al., 2003). Il est intéressant de constater que, dans la littérature, et en particulier dans les études de transfection par voie pulmonaire, de nombreux auteurs ont fait le choix de recourir à plusieurs modèles de mucus au sein d'une même étude. Par exemple, Mastorakos *et al.* ont étudié la stabilité de particules de PAE PEGylées dans des BAL de souris, leur diffusion dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, leur biodistribution dans le poumon de souris saines et leur efficacité de transfection dans des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B et chez la souris saine (Mastorakos et al., 2015). De la même manière, Tagalakis *et al.* ont décrit la diffusion de nanocomplexes de DOTMA dans un échantillon commercial de mucus issu de cellules primaires de sujet sains ou de patients atteints de mucoviscidose et dans du mucus gastrique de porc *ex vivo*, et ont effectué des expériences de transfection sur la lignée 16HBE, sur des cellules épithéliales bronchiques de sujets sains et de patients atteints de mucoviscidose, et chez la souris saine (Tagalakis et al., 2018). Dans d'autres études, la diffusion des particules de transfection a été étudiée avec précision dans des expectorations de patients, en parallèle d'une évaluation de l'efficacité de transfection chez la souris saine, voire dans des lignées cellulaires peu productrices de mucus (Boylan et al., 2012; Osman et al., 2018). Pour recréer des modèles d'épithéliums recouverts de mucus, Murgia *et al.* ont déposé du mucus, récupéré sur des tubes endotrachéaux, sur des cellules épithéliales bronchiques de patients atteints de mucoviscidose (Murgia et al., 2017), tandis que d'autres auteurs ont introduit des BAL humains dans le milieu d'exposition de cellules 16HBE (Rosenecker et al., 2003). Tous ces exemples illustrent le fait que l'évaluation des agents thérapeutiques, et en particulier des particules de transfection à visée thérapeutique, se fait souvent de façon « éclatée » sur des modèles de mucus différents.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser le mucus produit par nos cultures cellulaires, pour, à la fois, caractériser l'activité mucolytique de nos lipoplexes et mesurer leur activité de transfection. À notre connaissance, notre étude est la première à utiliser un seul et même modèle de mucus pour évaluer l'ensemble des propriétés de particules de transfection destinées à une administration par voie pulmonaire. Nous avons choisi d'effectuer les prélèvements du mucus produit par les cultures par simple pipetage, en préservant l'échantillon de toute étape de congélation, d'élimination des débris cellulaires, ou d'autre traitement. Dans la littérature, il est fréquent que les échantillons de mucus soient soumis à des traitements chimiques ou physiques importants. En effet, même les expectorations de patients et le mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux sont souvent congelés et décongelés (Duncan et al., 2016; Jinnai et al., 2010; Kirkham et al., 2008; Meziu et al., 2021; Nafee et al., 2018; Ordoñez et al., 2001; Sanders et al., 2000; Serisier et al., 2009), centrifugés (Jinnai et al., 2010; Marcos et al., 2015; Meziu et al., 2021; Ordoñez et al., 2001; Schuster et al., 2013), voire traités avec le DTT (Fahy et al., 1993; Jinnai et al., 2010; Ordoñez et al., 2001; Yuan et al., 2015). En contrepartie, plusieurs études montrent que les étapes de congélation et de décongélation ne modifieraient pas la structure du mucus (Meziu et al., 2021; Murgia et al., 2016; Sanders et al., 2000; Serisier et al., 2009). De notre côté, nous avons pour objectif de dénaturer au minimum les propriétés du mucus présent lors de son prélèvement, afin de caractériser le plus fidèlement possible le mucus qui recouvre ces cellules au moment des expériences de transfection, même s'il est important de garder en mémoire que tout mucus prélevé aura ses propriétés modifiées.

I.3. Caractérisation des modèles

- Stabilité des lipoplexes dans le mucus

Pour étudier l'impact du mucus sur nos lipoplexes dans les mêmes conditions qu'en transfection, nous avons étudié la stabilité des formulations dans le mucus produit par les cellules NCI-H292 et les cellules Calu-3, en choisissant le modèle NCI-H292 cultivé en plaque et traité à l'EGF et le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Les lipoplexes préparés à partir d'un film à base des lipides oxygénés iC3, C4, C8 et C12 ont été incubés avec chacun de ces mucus, et la présence d'ADN libre, signe d'une éventuelle décomplexation des lipoplexes, a été recherchée par la technique de retard sur gel d'agarose. Avec la même technique, Ibrahim *et al.* ont mis en évidence une fuite d'ADN plasmidique de leurs complexes à base de PEI et d'acide hyaluronique en présence de PGM, avec un temps d'incubation de 30 minutes (Ibrahim et al., 2011). De notre côté, après une heure d'incubation de nos lipoplexes dans le mucus des cellules NCI-H292 cultivées en plaque, aucun ADN libre n'a été visualisé, suggérant que nos formulations étaient stables dans ce mucus. De même, aucune libération d'ADN plasmidique n'a semblé se produire après contact des lipoplexes avec le mucus du modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Toutefois, l'interprétation de ces expériences a été complexe du fait de la présence d'ADN endogène. Cet aspect est important puisque Sanders *et al.* ont montré, par Southern Blot, que les

fragments d'ADN linéaires présents dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose provoquaient un échappement de l'ADN plasmidique des lipoplexes (Sanders et al., 2001). Le Southern Blot est la seule technique qui nous permettrait de mettre en évidence un tel phénomène. Dans notre cas, nous avons choisi un dernier modèle de mucus, celui produit par les cellules Calu-3 cultivées en plaque. Après 24 heures d'incubation de lipoplexes à base de lipide C8 dans ce mucus, aucun ADN libre n'a été visualisé, suggérant que nos formulations étaient stables. À l'aide d'un dosage ELLA, nous avons estimé que la concentration en mucines dans le mucus des cellules NCI-H292 était de l'ordre de 0,1 µg/mL, et de 10 µg/mL dans le mucus du modèle Calu-3 cultivé en plaque. Or, en réalisant un ajout d'ADN libre à des concentrations croissantes de PGM de 0,1 à 20 mg/mL, nous avons pu observer que la concentration en mucines devait atteindre 20 mg/mL pour empêcher l'ADN de migrer dans le gel. Ces observations confirment que nos formulations sont stables dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en plaque jusqu'à 24 heures. Dans la suite de notre travail, nous avons donc réalisé l'évaluation de la stabilité des lipoplexes dans ce mucus.

- Propriétés rhéologiques du mucus

Pour étudier l'impact de nos lipoplexes sur les propriétés rhéologiques du mucus, nous avons choisi le mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. En effet, nous avons montré la pertinence de ce mucus, en caractérisant son comportement viscoélastique, qui est une caractéristique principale du mucus. Le mucus ainsi prélevé montrait la structure d'un solide viscoélastique ($G' > G''$) avec un angle de phase δ de $18,5 \pm 0,6^\circ$. Il est difficile de comparer ces résultats à ceux de la littérature, car, à notre connaissance, rares sont les études ayant mesuré les propriétés rhéologiques d'échantillons de mucus produits par des cellules cultivées en ALI (qu'il s'agisse de lignées cellulaires ou de cultures primaires) avec une approche similaire à la nôtre. On peut toutefois citer l'étude de Hill *et al.*, au cours de laquelle le mucus recouvrant des cellules primaires de sujets sains a été récupéré par lavages successifs du tapis cellulaire (Hill et al., 2014). Le mucus était ensuite soumis à des étapes de dialyse et de concentration, visant notamment à éliminer les débris cellulaires et à reconstituer des modèles de mucus avec différentes concentrations en éléments solides, notamment en mucines. Même si l'on peut se demander si ce mucus, après élimination des cellules et débris cellulaires et remise en solution, peut véritablement conserver son architecture initiale et sa complexité, celui-ci présentait toujours des propriétés d'un solide viscoélastique ($G' > G''$) (Ahonen et al., 2019). En cherchant à comparer notre modèle de mucus à d'autres modèles décrits dans la littérature, nous avons observé que ses caractéristiques rhéologiques sont comparables à celles d'échantillons de mucus pulmonaire humain (Murgia et al., 2017; Schuster et al., 2013), renforçant ainsi la pertinence du mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours comme modèle d'étude.

Une diminution de viscoélasticité, mesurée à l'aide d'un rhéomètre, est un phénomène qui a fréquemment été mis en évidence sur des modèles de mucus variés avec des agents mucolytiques de

référence : 1-avec la NAC sur du mucus récupéré sur des tubes endotrachéaux (Vukosavljevic et al., 2017), des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Suk et al., 2011b; Yuan et al., 2015) ou du mucus issu de cultures de cellules primaires de sujet sains (Ahonen et al., 2019), ou 2-avec le DTT sur du mucus intestinal ou gastrique porcin (Celli et al., 2007; Rohrer et al., 2016). Ainsi, afin d'approfondir la caractérisation de notre modèle de mucus prélevé sur les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, nous avons évalué l'effet du DTT sur ses propriétés viscoélastiques. Le DTT, à une concentration finale de 1 mM pendant 1 heure, a entraîné une diminution de la viscoélasticité de ce mucus, caractérisée par une réduction des modules G' et G'' de 60%. Cette observation a montré que la structure de notre modèle de mucus permet de mettre en évidence l'activité mucolytique d'une substance de référence.

Notre dernière étape de caractérisation en rhéologie a consisté à évaluer l'effet des lipoplexes à base de lipide oxygéné C8 de grande (550 nm) ou de petite taille (170 nm) sur les propriétés rhéologiques du mucus. L'ajout des lipoplexes à base de lipide C8 de grande taille a entraîné une augmentation importante de la viscoélasticité du mucus (multiplication par 3 et 4 des modules G' et G'' à 1 Hz). Dans la littérature, quelques études ont rapporté que l'ajout de particules pouvait augmenter la viscosité du mucus. Penconeck *et al.*, par exemple, ont montré que la viscosité de plusieurs modèles de mucus à base de PGM augmentait après ajout de particules de poussières du désert (composées majoritairement de quartz et d'oxyde d'aluminium, et présentant un diamètre entre 250 et 750 nm, avec une moyenne à 433 nm), et que cette augmentation était proportionnelle à la concentration en particules additionnées (Penconeck et al., 2019). À notre connaissance, aucune étude de l'impact de lipoplexes sur la viscoélasticité du mucus n'a été décrite dans la littérature. Néanmoins, on peut rappeler que l'ADN libéré par les neutrophiles serait responsable d'une augmentation de la viscoélasticité du mucus dans la mucoviscidose, l'asthme et la BPCO (voir partie introductive), et que les phospholipides présents dans le mucus pulmonaire seraient aussi importants dans les propriétés rhéologiques de ce dernier (Bansil and Turner, 2018). En réalisant une mesure sur 24 expectorations de patients atteints de mucoviscidose, Sanders *et al.* ont déterminé une concentration moyenne de 2,7 mg/mL d'ADN dans ce type de mucus (Sanders et al., 2001). Par ailleurs, selon la revue de Bansil et Turner, le mucus contiendrait entre 1 et 2% (soit grossièrement 10-20 mg/mL) de lipides (Bansil and Turner, 2018). Dans nos expériences, l'ajout des lipoplexes au mucus apportait 0,05 mg/mL d'ADN et 0,61 mg/mL de phospholipides. Ces concentrations paraissent relativement faibles par rapport aux concentrations présentes « naturellement » dans le mucus, bien que cela n'exclut leur implication dans l'augmentation de viscoélasticité mesurée au cours de nos travaux. Les petits lipoplexes induisaient également une augmentation de la viscoélasticité du mucus, mais cette augmentation avait tendance à être plus faible que celle observée avec les lipoplexes plus volumineux (augmentations des modules G' et G'' des lipoplexes à base de lipide C8 de 239 et 181% pour les petits lipoplexes vs 405 et 342% pour les gros). Pourtant, les concentrations en lipide et en ADN apportées par l'ajout des lipoplexes étaient identiques

dans les deux conditions. Une taille plus petite (film : 546 nm ; injection : 169 nm dans notre étude) pourrait diminuer le risque d'interactions des lipoplexes avec les mucines, selon le maillage du mucus. Cette hypothèse ne correspond pas aux résultats de Barthelmes *et al.*, qui ont observé que des particules de chitosane cationique de 300 nm entraînaient une augmentation plus importante du G' et du G'' que les mêmes particules de 5 μm , dans du mucus de vessie de porc (Barthelmes et al., 2013). Néanmoins, dans cette étude, le mucus traité avec des particules de chitosane cationiques de 300 nm présentait des modules G' et G'' 18 et 8 fois supérieurs, respectivement, à ceux du mucus traité avec des particules de PAA anioniques de la même taille. Or, nos lipoplexes ont une charge positive. Ainsi, dans notre cas, l'augmentation des modules G' et G'' par l'ajout des lipoplexes pourrait provenir de phénomènes d'adhésion de ces lipoplexes au mucus en raison de leur charge positive, facilitant les interactions avec les charges négatives des mucines. Nos petits lipoplexes ayant une charge de surface plus faible que les lipoplexes plus volumineux, on peut suggérer qu'ils pourraient alors être moins concernés par ces phénomènes d'interaction électrostatique avec le mucus.

- Diffusion des particules dans le mucus

La diffusion de nos formulations dans le mucus a été étudiée avec le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours et par MPT, en utilisant, pour l'analyse des données de MSD, un modèle mathématique permettant de modéliser les diffusions de type confiné (Saxton and Jacobson, 1997; Wagner et al., 2017). Ce modèle permet en effet de déterminer le coefficient de diffusion (D) d'une particule, mais aussi la taille de la zone dans laquelle elle est confinée, ce qui est intéressant pour mettre en évidence l'élargissement des mailles du mucus que peut provoquer une activité mucolytique.

Afin de valider notre modèle d'analyse, nous avons conduit des expériences avec des billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm de diamètre, dans l'intention de comparer nos résultats à ceux de la littérature, très largement obtenus sur ce type de particules. Tout d'abord, les coefficients de diffusion que nous avons déterminés pour ces particules dans le milieu de culture (cas d'une diffusion normale) étaient très proches de leurs D théoriques dans l'eau, calculés à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein, ce qui validait notre modèle mathématique. Par la suite, nous avons observé que les D moyens des particules de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm, dans le mucus de cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, étaient respectivement divisés par 1,1 et 2,2 comparés aux coefficients théoriques, mettant notamment en évidence un ralentissement plus important pour les particules de 500 nm. L'équipe de Hanes a obtenu des résultats très différents des nôtres avec la modélisation du MSD la plus fréquente, qui consiste à calculer un coefficient de diffusion effectif (D_{eff}). Pour rappel, avec notre modèle, en cas de subdiffusion (exposant anomal $\alpha < 1$) ou de diffusion confinée (MSD atteignant un plateau), la vitesse de diffusion (qui influence la cinétique d'augmentation du MSD) et le confinement des particules (qui détermine l'inflexion de la courbe du MSD en fonction du temps et sa stabilisation à une valeur plateau) sont évalués à l'aide de deux grandeurs distinctes (D et r_c), mais

influencent tout deux le calcul du D_{eff} . De ce fait, non seulement D_{eff} est fortement impacté par ces modes de diffusion, mais aussi par le temps sélectionné pour son calcul, puisqu'il diminue quand le temps choisi est élevé. Ainsi, Schuster *et al.* ont observé par MPT, dans le mucus endotrachéal de sujets sans pathologie respiratoire, que les $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ (à 1 s) de billes de polystyrène carboxylées de 200 et 500 nm étaient respectivement 1600 et 980 fois plus faibles que leur D théorique dans l'eau (Schuster et al., 2013). Les particules de 200 nm étaient donc plus ralenties. Un exposant α de 0,54 a été déterminé pour les deux types de particules, mettant bien en évidence la prédominance d'un mode de diffusion subdiffusif de ces particules considérées par les auteurs comme essentiellement immobilisées dans le mucus. Les différences observées entre nos résultats de D et ceux décrits dans cette étude reposent sur le second paramètre pris en compte dans notre modèle, le r_c . Dans notre modèle, les particules de 200 et de 500 nm présentent une diffusion confinée. La valeur médiane du r_c était de 0,97 μm pour les particules de 200 nm et de 1,33 μm pour les particules de 500 nm, nous permettant de différencier dans le mucus un D qui reste rapide pour les 200 nm dans une zone de confinement plus petite et un D plus ralenti pour les particules de 500 nm dans des zones de confinement plus grandes. La diminution plus importante du $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ des particules de 200 nm dans le modèle utilisé par Schuster *et al.* résulte de leur diffusion dans une zone plus confinée, sans prendre en compte l'impact de cette zone de diffusion dans l'évaluation du $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ au temps de 1 s. Ainsi, nos résultats étaient concordants, et nous ont permis d'utiliser le modèle mathématique initialement choisi pour identifier des modifications du D et/ou du r_c de nos lipoplexes dans le mucus.

Afin de valider notre modèle de mucus, nous avons conduit des expériences avec des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide C8 dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, mais aussi dans celui obtenu après 7 jours d'ALI, et à partir de cellules Calu-3 cultivées en plaque. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre le D des lipoplexes et la concentration en mucine MUC5AC dans les différents échantillons de mucus, comparable au lien établi par Hill *et al.* entre la diffusion de billes de polystyrène carboxylées de 1 μm de diamètre et la concentration d'échantillons de mucus de cellules primaires HBE cultivées en ALI, exprimée en pourcentage de poids sec et incluant donc les mucines, d'autres protéines mais aussi les sels (Hill et al., 2014). De plus, dans notre étude, les D ont indiqué que nos lipoplexes chargés positivement n'étaient pas immobiles dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, ce qui a renforcé l'idée que l'épaisseur du mucus pouvait jouer un rôle déterminant dans l'évaluation de la transfection dans nos modèles. Par ailleurs, les r_c avaient des valeurs très hétérogènes dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en plaque, mais moins dispersées dans le mucus des mêmes cellules cultivées en ALI pendant 7 jours. Ce phénomène était encore accentué dans le modèle cultivé en ALI pendant 14 jours, avec des valeurs de r_c alors principalement situées autour de 0,5-0,6 μm . Dans leur ensemble, ces différences de r_c soulignaient des différences de structure entre les différents mucus. À noter que les tailles des pores estimées dans le modèle de mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours étaient en

accord avec celles récemment décrites dans le mucus pulmonaire humain, qui seraient majoritairement comprises entre 1 et 2 μm (soit un r_c entre 0,5 et 1 μm) (Duncan et al., 2016; Vukosavljevic et al., 2017), en particulier dans le mucus frais et non dénaturé (Meziu et al., 2021). Enfin, pour s'assurer qu'une activité mucolytique serait visible dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, nous avons étudié l'effet du DTT (1 mM) pendant 1 heure, sur la diffusion des billes de polystyrène carboxylées de 200 nm. La diffusion de ces particules était légèrement, mais significativement ralentie dans le mucus traité au DTT (D moyens de 2,38 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ vs 2,94 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ sans prétraitement), suggérant que ce dernier avait effectivement eu un effet sur la structure du mucus.

Pour aller plus loin dans cette caractérisation, par MPT, du mucus produit par les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, nous avons comparé la diffusion des lipoplexes à base de lipide C8 préparés à partir d'un film et par injection, ces derniers étant de plus petit diamètre. Dans le milieu de culture, les lipoplexes les plus petits avaient un D en moyenne plus élevé (1,69 vs 0,90 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement). Dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, les D de ces deux formulations étaient cependant très proches (0,40 vs 0,35 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement), malgré la différence de taille importante entre les formulations. Ainsi, les D des lipoplexes étaient divisés par 2,6 pour les grands et 4,2 pour les petits comparés aux D obtenus dans le milieu de culture, mettant en évidence un ralentissement plus important des lipoplexes préparés par injection. Par conséquent, la taille des lipoplexes ne semble pas être la seule explication à leur ralentissement dans le mucus. Il semblerait que le rôle de la charge devienne prédominant lorsque la taille des particules est plus réduite. Cet effet est conforté par nos données qui montrent, dans notre modèle de mucus, un D plus faible des petits lipoplexes que celui des billes de polystyrène de plus grande taille (500 nm) et de charge négative (0,40 vs 0,60 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement). Ces observations sont en accord avec celles de Crater et Carrier, qui ont montré que des billes de polystyrène de 200 nm carboxylées (-37 mV) ou sulfatées (-55 mV) présentaient un $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ (à $t = 10$ s) environ 12 fois plus élevé dans le mucus intestinal porcin que celui de billes de polystyrène de la même taille et aminées (+7 mV) (Crater and Carrier, 2010). Ainsi, même si une petite taille est préférable pour la diffusion des lipoplexes, la charge de surface positive de ces derniers semble être la principale responsable du ralentissement de leur diffusion dans le mucus.

- Efficacité de transfection

L'efficacité de transfection des formulations préparées à partir d'un film à base de chacun des lipides oxygénés (iC3, C4, C8, C12, C12' et Suc12) a été mesurée, à 24 heures, dans les six modèles cellulaires producteurs de mucus, afin d'évaluer la pertinence de ces modèles. Dans le modèle NCI-H292, aucune diminution de l'activité de transfection n'a été observée après induction de mucus par l'EGF, quel que soit le lipide, ce qui peut être lié à une quantité de mucus trop faible pour impacter l'efficacité des lipoplexes, mais également à la nature de l'inducteur. En effet, après fixation à son récepteur, l'EGF peut déclencher plusieurs voies de signalisation, dont certaines sont impliquées dans la prolifération

cellulaire (Zeng and Harris, 2014), ce qui pourrait être à l'origine d'une augmentation de la production de luciférase pouvant masquer un effet du mucus. En revanche, lorsque la production de mucus par les cellules NCI-H292 a été induite par les allergènes, l'efficacité de tous les lipoplexes a été impactée, suggérant un lien entre la quantité de mucus et l'effet de barrière de ce mucus vis-à-vis de la transfection. Dans les cellules Calu-3 cultivées en plaque, produisant plus de mucus que les cellules NCI-H292 induites, l'efficacité de transfection de l'ensemble des lipoplexes était plus impactée que dans les modèles NCI-H292. Dans le modèle 3D de Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours (caractérisé par les plus importantes production et épaisseur de mucus), aucune activité de transfection n'a été détectée pour l'ensemble des formulations préparées à partir d'un film. Ainsi, le lien entre la quantité de mucus et l'effet de barrière de ce mucus vis-à-vis de la transfection, mis en évidence dans les modèles NCI-H292, a été confirmé dans les modèles Calu-3. Un tel lien a déjà été observé par Ferrari *et al.*, avec des lipoplexes et des polyplexes, ces systèmes ayant une activité de transfection chez la souris normale, qu'ils perdaient dans des modèles murins de mucoviscidose (Ferrari et al., 2001). De même, Rosenecker *et al.* ont observé que plus la concentration en BAL humain ajoutée dans le milieu de transfection de cellules 16HBE était importante, plus l'efficacité de transfection de polyplexes et de dendrimères était diminuée (Rosenecker et al., 2003). De plus, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, une activité de transfection a été obtenue 1-quand le mucus recouvrant les cultures était retiré avant le dépôt des lipoplexes sur les cellules, comme cela a été décrit sur un modèle d'épithélium *ex vivo* (Ferrari et al., 2001), ou 2-quand l'activité de la luciférase était mesurée plus tardivement (48 ou 72 heures après l'exposition aux lipoplexes), comme observé par Griesenbach *et al.* sur des cellules primaires cultivées en ALI (Griesenbach et al., 2011b). Ces résultats montrent que le mucus est bien responsable de l'inhibition de la transfection observée dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Ils suggèrent également que l'absence d'activité de transfection à 24 heures proviendrait du fait que les lipoplexes sont piégés ou ralentis par l'épaisse couche de mucus présente au-dessus du tapis cellulaire, ce qui coïncide avec les interactions importantes entre mucus et lipoplexes mises en évidence dans nos expériences de rhéologie et de MPT.

L'utilisation des six modèles cellulaires producteurs de mucus nous a permis, de manière intéressante, d'identifier des différences d'efficacité entre les différents lipoplexes, à base des lipides oxygénés, préparés à partir d'un film. Le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 3 jours a révélé une efficacité fortement diminuée des lipoplexes formés à partir des lipides iC3 et C4, alors que ces lipoplexes montraient une efficacité de transfection élevée dans les modèles NCI-H292 caractérisés par une faible production de mucus. Quant au modèle Calu-3 en plaque, il a fait ressortir une meilleure efficacité des lipoplexes à base des lipides C8 et Suc12. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Les lipides iC3 et C4 sont, en raison de leur chaîne de carbone courte, théoriquement plus sensibles à l'hydrolyse que les lipides C8 et C12. On pourrait donc imaginer que le *timing* de leur hydrolyse est adéquat dans les modèles avec peu de mucus, mais trop rapide en cas de ralentissement de leur diffusion

par le mucus. Dans ce deuxième cas de figure uniquement, cela conduirait à l'apparition de boucles d'ADN à la surface des lipoplexes qui augmenteraient le risque de piégeage par le mucus et/ou diminueraient leur affinité pour la membrane cellulaire. En se focalisant sur le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, les différences d'efficacité de transfection entre les lipoplexes préparés à partir d'un film ont pu être confirmées sur les lipoplexes préparés par injection, de plus petite taille. Notamment, l'activité de transfection des lipoplexes à base de lipide iC3 était limitée dans ce modèle, comparée à celle des lipoplexes à base des lipides C4, C8 ou C12. Une différence d'efficacité du lipide iC3 était donc observée dans des modèles issus de type cellulaires différents, ce qui renforce l'idée que ce lipide se comporte différemment des autres. Cette différence peut contribuer à privilégier l'activité d'un lipide plutôt qu'un autre, comme cela a déjà été observé avec des phospholipides biolabiles dans des études précédentes du laboratoire (Pierrat et al., 2013a, 2016b).

Enfin, la formulation de lipoplexes de petite taille nous a permis d'évaluer l'impact de la taille sur l'efficacité de transfection, en sélectionnant deux de nos modèles cellulaires, le modèle Calu-3 cultivé en plaque et le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, l'efficacité de transfection des lipoplexes à base de lipide C8 de petite taille (169 nm, préparés par injection) était totalement inhibée, tout comme celle des lipoplexes de grande taille (546 nm, préparés à partir d'un film) quand la transfection était mesurée à 24 heures. Toutefois, dans ce modèle, quand la transfection était mesurée à 72 heures (après retrait des lipoplexes à 24 heures), les lipoplexes à base de lipide C8 de grande taille présentaient une meilleure efficacité de transfection que ceux de petite taille. Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs études, qui ont mis en évidence que les lipoplexes les plus volumineux étaient plus internalisés et permettaient d'atteindre des niveaux de transfection augmentés dans différentes lignées cellulaires (Almofti et al., 2003; Ross and Hui, 1999).

Ainsi, avec les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, nous disposons d'un modèle dans lequel le mucus opposait une contrainte suffisamment importante pour inhiber totalement l'activité des lipoplexes non mucolytiques, préparés à partir d'un film ou par injection, et donc d'un modèle dans lequel nous pouvions *a priori* détecter plus facilement un effet de nos lipoplexes mucolytiques.

II. Évaluation des formulations à base de lipides cationiques monosoufrés ou de lipides *helper* polysoufrés

II.1. Formulations à base de lipides cationiques monosoufrés

La première stratégie envisagée pour créer des lipoplexes à activité mucolytique reposait sur la conception de lipides cationiques biolabiles capables de libérer des entités thiols après hydrolyse, leur donnant le double objectif de complexer de l'ADN pour permettre la transfection et de faciliter leur propre diffusion à travers le mucus. Ces deux rôles dépendaient étroitement de la vitesse à laquelle le

lipide était hydrolysé. Des structures lipidiques présentant des variations structurales au niveau du bras espaceur (TiC3, TC4, TC8 et TC12) et du résidu (TC12, TC12' et TSuc12) ont été synthétisées pour obtenir des lipides avec des susceptibilités hydrolytiques plus ou moins élevées.

Les lipoplexes préparés à partir d'un film de lipides monosoufrés ont présenté des caractéristiques physiques similaires à celles des lipoplexes produits à partir de leurs équivalents oxygénés, de même qu'une bonne stabilité dans le mucus. Avec la méthode de préparation des formulations par injection, les mêmes observations ont été faites, sur le couple de lipides C8/TC8.

Les propriétés rhéologiques du mucus en présence des lipoplexes à base de lipide TC8, obtenus aussi bien à partir d'un film que par injection, montraient les mêmes augmentations des modules G' et G'' que les formulations à base du lipide C8, à savoir que les petits lipoplexes à base de lipide TC8 induisaient une augmentation de la viscoélasticité du mucus plus faible que les lipoplexes à base de lipide TC8 de plus grande taille. De plus, les propriétés rhéologiques du mucus en présence des lipoplexes à base de lipide TC8, étaient identiques à celles en présence des lipoplexes à base de C8, produits aussi bien à partir d'un film que par injection. Ainsi, ces résultats de rhéologie nous ont permis de conclure à l'absence d'activité mucolytique du lipide monosoufré TC8. D'autre part, l'analyse en MPT a montré que le D des lipoplexes obtenus à partir d'un film de lipide TC8 ou de lipide C8, dans notre modèle de mucus, était respectivement divisé par un facteur de 2,6 et 2,8, comparé à celui obtenu dans le milieu de culture. La seule différence observée entre les deux types de lipoplexes a été une proportion plus importante de lipoplexes les plus ralents ($D < 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) dans le cas des lipoplexes à base de lipide TC8 (43% vs 27%, respectivement). Ces lipoplexes pourraient interagir plus facilement avec le mucus par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes (le lipide TC8 étant légèrement plus hydrophobe que le lipide C8) ou bien en raison d'une libération plus rapide de boucles d'ADN s'enchâssant dans les fibres de mucines. Ainsi, aucune différence de D ou de r_c n'a été observée entre les formulations obtenues à partir d'un film de lipide TC8 et celles préparées à partir d'un film de lipide C8 indiquant, ici encore, l'absence d'effet mucolytique des lipoplexes à base du lipide monosoufré TC8.

L'efficacité de transfection, à 24 heures, des lipoplexes préparés à partir d'un film à base de lipides monosoufrés a été comparée à celle des lipoplexes à base de lipides oxygénés, sur les six modèles cellulaires producteurs de mucus. Cette comparaison a été étendue, dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours, en mesurant l'efficacité de transfection des formulations à 72 heures. Dans ce cas, les lipoplexes étaient retirés à 24 heures. De plus, des démarches d'optimisation des formulations préparées à partir d'un film de lipides monosoufrés (ajout du lipide *helper* DOPE, mélanges de lipides oxygénés/monosoufrés, formulation par injection) ont été menées. L'ensemble des résultats ont montré que : 1-les formulations à base de lipides monosoufrés étaient impactées de la même manière par le mucus que les formulations à base de lipides oxygénés, 2-parmi les formulations préparées à partir d'un film de lipides monosoufrés, la plus performante était celle préparée à partir du lipide TC8, 3-quelle que soit la quantité de mucus produite par le modèle cellulaire ou la méthode de préparation des lipoplexes

(film ou injection), les formulations à base de lipides monosoufrés étaient aussi voire moins performantes que celles préparées à partir de leurs analogues oxygénés. Aussi, l'hypothèse qui en a découlé est que les formulations à base de lipides monosoufrés ne libèrent pas une quantité d'entité thiol suffisante pour améliorer significativement leur pénétration du mucus cellulaire.

II.2. Formulations à base de lipides *helper* polysoufrés

Les lipides *helper* polysoufrés, dont la seule mission est la libération d'entités thiols, présentent l'avantage majeur de permettre d'amplifier cette libération, en jouant sur le nombre de fonctions thiols dans le lipide et en augmentant la quantité du lipide dans les formulations. Le second avantage de ces lipides est qu'un équilibre entre cinétique de désassemblage des lipoplexes et cinétique de libération de groupements thiols n'est pas nécessaire. Ainsi, ces lipides nous ont permis de tester l'hypothèse selon laquelle les formulations à base de lipides cationiques monosoufrés ne libéraient pas suffisamment d'entités thiols. Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes concentrés principalement sur les formulations à base de lipide cationique C8 préparées par injection, auxquelles nous avons ajouté 1 ou 3 équivalent(s) de lipide polysoufré S3 ou S7. Les modèles utilisés pour évaluer ces formulations étaient les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours et leur mucus, excepté dans les études de stabilité des lipoplexes comme justifié précédemment.

La stabilité des formulations dans le mucus des cellules Calu-3 cultivées en plaque n'était pas impactée par la présence des lipides polysoufrés, ce qui est cohérent avec le fait que l'hydrolyse (même totale) des lipides polysoufrés ne devrait pas entraîner de modification importante des charges des formulations.

Dans les études de macrorhéologie, les conditions utilisées, dans la littérature, pour mettre en évidence un effet mucolytique peuvent être relativement extrêmes en termes de concentration d'agent mucolytique et/ou de temps de contact avec le mucus. Ainsi, Yuan *et al.* ont traité des expectorations de patients atteints de mucoviscidose pendant 4 heures avec la NAC à une concentration finale de 61 mM, et ont observé une réduction significative de G' et de G'' de l'ordre de 70 et 50%, respectivement (Yuan *et al.*, 2015). Sur du mucus reconstitué à partir d'échantillons prélevés sur des cellules épithéliales bronchiques de sujets sains, Ahonen *et al.* ont mis en évidence une réduction significative de G' (environ 50%) en parallèle d'une légère augmentation de G'' (environ 20%) après un traitement de 18 heures avec de la NAC à plus de 600 mmol/kg (soit plus de 600 mM si l'on considère que leur mucus avec 3% de poids sec a une densité équivalente à celle de l'eau), mais n'ont pas observé d'effet significatif à une concentration de 12 mmol/kg (Ahonen *et al.*, 2019). Rohrer *et al.* ont utilisé, comme agent mucolytique, le DTT à une concentration de 30 mmol/kg, et ont montré une réduction de la viscosité du mucus intestinal porcin d'environ 50% en 30 minutes et d'environ 70% en 1 heure (Rohrer *et al.*, 2016). Parmi les conditions moins extrêmes, les études de Suk *et al.* et de Ehre *et al.* ont traité du mucus de patients

atteints de mucoviscidose avec la NAC à une concentration finale de 20 mM pendant une durée de 30 minutes à 37 °C. Les premiers ont décrit ainsi une diminution d'environ 60% de la viscoélasticité du mucus (Suk et al., 2011b), tandis que les seconds n'ont mis en évidence aucune diminution significative de G' (Ehre et al., 2019). De notre côté, nous avons choisi un temps de contact entre les formulations et le mucus relativement court (1 heure), pour rester rationnel avec les expériences de transfection. Les concentrations en lipides ont aussi été choisies sur la base des expériences de transfection dans le modèle Calu-3 en ALI pendant 14 jours. Elles permettaient de simuler la concentration maximale en entités thiols atteinte dans le cas où l'ensemble de la formulation déposée dans un insert parvenait à atteindre la couche de mucus. Bien que nous obligeant à préparer des formulations relativement concentrées en lipides (si bien que nous ne pouvions utiliser des préparations avec des quantités en lipides polysoufrés plus élevées), ces concentrations restaient faibles comparées aux concentrations de NAC ou DTT utilisées dans les études citées. En effet, en cas d'hydrolyse totale des lipides polysoufrés, les concentrations en entités thiols atteintes dans les conditions avec 1 équivalent de lipide S3 ou 1 équivalent de lipide S7 devaient être respectivement de 1,8 et 4,2 mM. Nous avons alors observé une réduction systématique des modules G' et G'' (de 39 et 51% avec 1 équivalent de lipide S3, et de 56 et 71% avec 1 équivalent de lipide S7, respectivement), et donc de la viscoélasticité du mucus, par les lipoplexes à base de lipide polysoufré comparé aux lipoplexes à base de lipide C8 seul. Si des modifications de cette ampleur n'ont peut-être pas lieu dans les conditions de transfection, du fait que les quantités réelles en entités thiols libérés dans la couche de mucus sont probablement plus limitées, ces résultats suggèrent que les lipides polysoufrés sont capables de déstructurer le mucus.

Si les résultats de macrorhéologie suggèrent que les lipides polysoufrés ont un effet mucolytique, ils restent à eux seuls insuffisants pour affirmer que cette activité sera bénéfique dans la diffusion des lipoplexes. Nous avons complété ces données par une analyse de diffusion par MPT. Nous avons choisi comme agent mucolytique de référence la NAC, dont le mécanisme d'action par la rupture de ponts disulfures devrait conduire à une augmentation de la diffusion des particules et à un élargissement de la taille des pores. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation significative des r_c des lipoplexes à base de lipide C8 en présence de NAC à la concentration de 20 mM (médiane augmentée de 0,60 à 0,67 μm , respectivement sans et avec NAC) suggérant effectivement que la NAC a provoqué un clivage des ponts disulfures et une ouverture du maillage du mucus. Ces résultats sont en accord avec ceux de Suk *et al.* montrant qu'un traitement du mucus à la NAC à 20 mM fait augmenter la taille moyenne des pores du mucus de 145 à 230 nm, pores dans lesquels des billes de polystyrène carboxylées et PEGylées de 200 nm de diamètre se déplacent plus rapidement (Suk et al., 2011a). En effet, une augmentation de la diffusion des particules ($\langle D_{\text{eff}} \rangle$ multiplié par 11) a été observée dans cette étude, tandis que nous n'avons pas observé de changement du D des lipoplexes à base de lipide C8 en présence de NAC (D multiplié par 1,2 par rapport à leur diffusion en absence de NAC, non significatif). En utilisant un modèle mathématique d'obstruction pour calculer le r_c (formule détaillée dans

l'introduction, partie III.3.3), Suk *et al.* ont obtenu les r_c à partir du $\langle D_{\text{eff}} \rangle$, si bien que ces deux paramètres n'ont pu que varier dans le même sens. Or, notre modèle d'analyse permet de définir deux paramètres distincts, le D mais aussi le r_c à partir des MSD de nos lipoplexes. Ainsi, nos résultats montrent que le traitement à la NAC a provoqué un élargissement généralisé des pores, mais que cet élargissement n'a pas permis d'augmenter la vitesse de diffusion des lipoplexes. Ainsi, on peut supposer que les interactions entre lipoplexes et mucines restaient trop importantes par rapport aux changements de structure du mucus induits par la NAC, ou que la NAC, de par son activité mucolytique, a généré des fragments de mucines (et autres molécules du mucus) entraînant une augmentation de la microviscosité au sein des mailles du mucus.

L'activité mucolytique intrinsèque aux lipoplexes à base de lipide polysoufré n'est pas supposée être comparable à celle de la NAC. En effet, alors que la NAC agit sur la totalité du mucus, nos lipoplexes exercent leur activité à proximité directe, évitant une augmentation de la microviscosité au sein des mailles du mucus. Ainsi, les données de MPT sur la NAC ne permettaient pas de présager des données que nous allons obtenir avec nos lipoplexes. En déposant les lipoplexes préparés dans les mêmes conditions que lorsqu'ils sont utilisés en transfection (sauf concernant la présence de la rhodamine-PE), nous avons pu atteindre des concentrations maximales en entités thiols de 340 μM avec les lipoplexes incorporant 1 équivalent de lipide S7 et de 437 μM avec les lipoplexes incorporant 3 équivalents de lipide S3. De manière intéressante, la diffusion de ces deux types de lipoplexes a été significativement augmentée par rapport à celle des lipoplexes à base de lipide C8 uniquement, et ceci de manière comparable (0,75 vs 0,68 vs 0,40 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivement). Ceci nous a permis de confirmer l'activité mucolytique de nos lipides polysoufrés identifiée par macrorhéologie, et de montrer que cette activité était indépendante du lipide polysoufré testé. De plus, elle ne semblait pas non plus liée à une taille et une polydispersité réduites dans le cas des lipoplexes à base de 3 équivalents de lipide S3. Les r_c , en revanche, étaient presque identiques pour les lipoplexes incorporant 1 équivalent de lipide S7, ceux contenant 3 équivalents de lipide S3, et ceux à base de lipide C8 uniquement (médianes de 0,64 vs 0,62 vs 0,60 μm , respectivement). On peut ainsi supposer que l'effet de clivage des mucines s'est avéré bien moins prononcé avec nos formulations qu'avec la NAC (utilisée à une concentration en entités thiols plus importante). *A posteriori*, ce résultat nous laisse penser que la détermination du r_c par notre modèle mathématique n'est peut-être pas assez sensible pour mettre en évidence des effets mucolytiques légers et localisés, résultant d'une activité intrinsèque aux particules suivies. Le fait que le mucus ait une architecture très hétérogène, que nos lipoplexes aient une polydispersité importante, et qu'ils puissent être concernés par des phénomènes d'adhésion (probablement discontinus, qui plus est, puisqu'ils ne sont pas immobiles), nous conforte dans cette hypothèse. Néanmoins, les modifications du D et du r_c obtenues sont cohérentes, et sont des indicateurs d'une meilleure diffusion dans le mucus des lipoplexes à base de lipides polysoufrés, par rapport aux lipoplexes n'en incorporant pas. Pour mieux évaluer l'apport de l'effet local des lipides polysoufrés par rapport à l'effet général de la NAC sur le

mucus, il serait intéressant de comparer l'effet de la NAC à une concentration comparable à celle des lipides polysoufrés dans les formulations.

Dans certaines études, les auteurs ont proposé une estimation, à partir du coefficient de diffusion déterminé en MPT, du temps que mettrait une particule à traverser une couche de mucus d'une épaisseur donnée. Crater et Carrier ont déterminé ainsi que des particules de polystyrène aminées ou carboxylées de 200 nm mettraient, respectivement, 102 et 20 minutes à traverser une couche de mucus de 10 μm d'épaisseur (définie comme l'épaisseur du mucus dans l'iléon). Ils ont utilisé pour cela l'équation $t = L^2 / \langle D_{\text{eff}} \rangle$; dans laquelle t est le temps mis par les particules de coefficient de diffusion effectif $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ pour traverser un mucus d'épaisseur L . Dans notre cas, si l'on utilise le D et que l'on estime l'épaisseur de mucus à 20 μm (épaisseur de la couche de mucus sur le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours), le temps de passage est estimé à 18 minutes pour les lipoplexes à base de lipide C8 seul, et à 10 minutes pour les lipoplexes à base de lipide C8 incorporant 3 équivalents de lipide S3. Néanmoins, si ces estimations prennent en compte la vitesse de diffusion des particules, elles supposent que la particule ne rencontre aucun obstacle ou zone de confinement durant son trajet, supposition que nos résultats de MPT invalident totalement. Pour étudier expérimentalement, à l'échelle macroscopique, la pénétration de nos formulations dans le mucus, nous avons déposé des lipoplexes marqués sur la couche de mucus recouvrant les cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours, et observé leur pénétration 30 minutes plus tard par microscopie confocale, après un marquage des mucines par la WGA. Cette stratégie a été utilisée dans d'autres études sur d'autres types de particules (Mura et al., 2011; Nafee et al., 2018). Nous avons alors pu évaluer, de manière qualitative, que les lipoplexes à base de lipide C8 et de 3 équivalents de lipide S3 pénétraient plus facilement la couche de mucus que les lipoplexes à base de lipide C8 uniquement. Ainsi, après 30 minutes, seuls des lipoplexes incorporant le lipide S3 étaient parvenus jusqu'aux derniers micromètres de la couche de mucus. Ces résultats suggèrent que les différences de D observées en MPT se répercutent également sur la vitesse de pénétration des lipoplexes dans la couche de mucus. Néanmoins, pour être certains que la taille et la polydispersité réduites des formulations contenant 3 équivalents de lipide S3, ainsi que la concentration en particules plus importante de ces formulations, ne créent pas un biais dans l'interprétation de ces résultats, nous prévoyons de vérifier qu'un résultat similaire peut être obtenu avec les lipoplexes à base de lipide C8 et d'un équivalent de lipide S7. À notre connaissance, les SEDDS (pour rappel, *Self-emulsifying Drug Delivery System*) décrits par Rohrer et al. sont les seuls exemples de particules à activité mucolytique intrinsèque décrites dans la littérature (Rohrer et al., 2016). L'activité mucolytique de ces gouttelettes lipidiques d'environ 50 nm et de charge proche de la neutralité (-2 mV) reposait sur la libération de composés porteurs d'une fonction thiol (TBA-D et TGA-O). Dans le mucus intestinal porcin, le $\langle D_{\text{eff}} \rangle$ des meilleurs SEDDS « thiolés » était 66,1 fois plus élevé que celui des SEDDS sans motif thiol (dans notre étude, le D des lipoplexes à base de C8 et de 3 équivalents de lipide S3 était 1,7 fois plus élevé que celui des lipoplexes sans lipide S3). La pénétration dans le mucus des SEDDS

thiolés, analysée à l'aide d'un système composé de tubes en rotation remplis de mucus (spécifique au groupe de Bernkop-Schnürch), montrait que les meilleurs SEDDS étaient environ 1,5 fois plus nombreux à avoir pénétré le mucus des premiers segments du système, que les SEDDS sans motif thiol. De notre côté, les expériences de rhéologie, de MPT et de microscopie confocale, ont ensemble mis en évidence une activité mucolytique des lipides polysoufrés et son impact sur la diffusion des particules à travers le mucus. Ensemble, nos résultats et ceux de Rohrer *et al.* indiquent donc que la conception de particules à activité mucolytique intrinsèque peut être une bonne stratégie pour obtenir une diffusion plus rapide dans le mucus.

La dernière étape de notre travail a consisté en l'évaluation de la conséquence de ces effets sur l'internalisation cellulaire et l'efficacité de transfection des lipoplexes. L'internalisation des lipoplexes à base de lipide C8 seul ou de lipide C8 contenant 3 équivalents de lipide S3 a été évaluée après 4 heures ou 24 heures d'exposition des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. L'intensité moyenne de fluorescence de l'ADN marqué internalisé n'a pas montré de différence entre les deux formulations. Cependant, les expériences de transfection (effectuées en parallèle dans les mêmes conditions) ont montré une augmentation de l'activité luciférase pour la formulation contenant le lipide C8 et 3 équivalents de lipide S3, après 4 heures et 24 heures d'exposition aux lipoplexes. Il faut rappeler que le système de la luciférase *Gaussia* est extrêmement sensible, et a été particulièrement développé dans le but d'évaluer la transfection dans des modèles *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* difficiles à transfecter (Griesenbach et al., 2011b). Ce point est donc à prendre en considération dans notre étude. Mais, l'élément important est surtout l'extrême complexité de mener des analyses de cytométrie en flux sur le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours. Enfin, les études de diffusion des lipoplexes dans la couche de mucus suggèrent que même le temps de 4 heures, choisi pour évaluer l'internalisation des lipoplexes (et pour retirer les lipoplexes dans les expériences de transfection), pourrait ne pas être optimum pour mettre en évidence de différences entre formulations, compte tenu de la rapidité de pénétration des lipoplexes dans la couche de mucus. Si, dans ce travail, tous nos résultats ont été obtenus avec un temps de contact minimal de 4 heures, il serait intéressant de se placer à des temps plus courts, qui pourraient peut-être permettre la mise en évidence de différences plus nettes entre les formulations.

Dans les expériences de transfection, nous avons également mis en évidence que les lipoplexes à base de lipide C8 libérant 9 entités thiols (3 équivalents de lipide S3) étaient plus efficaces que ceux libérant 3 (1 équivalent de lipide S3) ou 7 entités thiols (1 équivalent de lipide S7), mais aussi que ceux libérant 14 (2 équivalents de lipide S7) ou 21 entités thiols (3 équivalents de lipide S7). Les lipoplexes à base de 3 équivalents de lipide S3 et de 3 équivalents de lipide S7 sont dotés de caractéristiques physiques comparables, écartant les propriétés physiques comme source de différence. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il existe une quantité d'entités thiols optimale pour améliorer la diffusion des lipoplexes à travers le mucus, ici plus proche de 9 que de 14 moles d'entités thiols libérées par mole de lipide. Avec 2 et 3 équivalents de lipide S7, l'action mucolytique pourrait être trop importante, comme

cela a déjà été proposé pour expliquer plusieurs de nos résultats. Un autre résultat très intéressant est que la NAC, déposée au même moment que les lipoplexes sur les cellules à une concentration en motif thiol équimolaire à celle avec 3 équivalents de lipide S7, n'a pas occasionné d'amélioration de l'efficacité de transfection de formulations à base de C8 seul. Les premières données d'une expérience conduite sur le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours ont permis de montrer qu'aucune amélioration n'était observée également à une concentration en NAC équimolaire à celle avec 3 équivalents de lipide S3. Ces résultats ont conforté notre projet d'étudier l'effet d'un traitement à la NAC à concentration équimolaire à celle des lipides polysoufrés dans les expériences de MPT. En effet, ils suggèrent qu'une action mucolytique locale est plus efficace pour améliorer l'activité des lipoplexes qu'un prétraitement à la NAC qui, pour rappel, en thérapie, ajouterait une étape d'administration et risquerait de provoquer une dégradation du mucus dans tout l'arbre respiratoire (avec tous les problèmes associés).

L'utilisation des lipides *helper* polysoufrés, comparée à celle des lipides cationiques monosoufrés, offre un avantage que nous n'avons pas rappelé en début de cette partie discussion : celui de pouvoir ajouter une activité mucolytique à tout lipide cationique lors de sa formulation en lipoplexes. Afin d'évaluer ce principe, nous avons utilisé tous les lipides cationiques de la série oxygénée (excepté Suc12) pour former des lipoplexes auxquels une activité mucolytique a été conférée par l'ajout de 3 équivalents de lipide S3. Une amélioration de l'efficacité de transfection a été observée pour tous ces lipides, y compris le plus modeste d'entre eux, le lipide iC3. Ces données ont donc montré que le concept de lipides *helper* polysoufrés est transposable à d'autres lipides cationiques que le lipide C8.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif du travail qui est présenté dans ce manuscrit était d'évaluer le potentiel de vecteurs lipidiques à activité mucolytique intrinsèque, synthétisés au laboratoire, dans la thérapie génique par voie pulmonaire.

L'étude de ces vecteurs, dans un contexte pertinent vis-à-vis de leur objectif, a nécessité une adaptation des protocoles expérimentaux habituellement mis en œuvre au laboratoire pour évaluer l'activité de transfection, et en particulier, la mise en place et la caractérisation de modèles cellulaires producteurs de mucus. Cet objectif a été atteint en cultivant les lignées cellulaires NCI-H292 et Calu-3 dans différentes conditions. Il a notamment abouti à la définition d'un modèle cellulaire recouvert d'une couche de mucus d'épaisseur et de propriétés proches de celles du mucus pulmonaire humain, le modèle des cellules Calu-3 cultivées en ALI pendant 14 jours. Ce modèle opposait une contrainte suffisamment importante pour inhiber totalement l'activité de transfection des lipoplexes non mucolytiques à base de lipides oxygénés. De plus, par l'intermédiaire d'un protocole de prélèvement simple et sans traitement, il nous a permis d'avoir accès à un modèle de mucus assez structuré pour mettre en évidence l'activité mucolytique d'agents de référence et celle des vecteurs mucolytiques développés. Ainsi, les différentes évaluations biologiques de nos lipoplexes ont pu être réalisées sur un seul et même modèle, ce qui démarque notre travail de la littérature existante.

La première stratégie pour concevoir des lipoplexes mucolytiques était basée sur le développement d'une série de lipides cationiques biodégradables « monosoufrés », libérant un composé portant une fonction thiol sous l'effet de l'hydrolyse. Malgré un travail d'optimisation des formulations, la formulation de lipoplexes de tailles différentes, et le large panel de techniques d'évaluation utilisé, nous n'avons pu ni mettre en évidence une activité mucolytique de ces lipoplexes, ni révéler une meilleure efficacité de ceux-ci, en comparaison de leurs équivalents non mucolytiques. Notre hypothèse principale est que le pouvoir mucolytique de ces lipides monosoufrés, dépendant de la quantité d'entités thiols qu'ils libèrent dans le mucus, est insuffisant pour avoir un effet détectable et bénéfique. En contrepartie, l'évaluation de ces lipides monosoufrés nous a permis d'explorer de nouvelles méthodes de préparation des lipoplexes et de mieux comprendre les interactions entre les lipoplexes et le mucus, en dehors même du contexte d'activité mucolytique. Ainsi, nous avons pu constater que la charge positive des lipoplexes, bien que primordiale dans leur efficacité de transfection, est une contrainte majeure, sinon la contrainte principale à leur diffusion dans le mucus.

Notre deuxième stratégie pour concevoir des lipoplexes mucolytiques était d'ajouter des lipides polysoufrés, capables de libérer plusieurs entités thiols, dans les formulations de lipides cationiques oxygénés. Incorporés dans les lipoplexes, ces lipides polysoufrés ont conféré aux formulations une activité mucolytique révélée par : 1-une diminution de la viscoélasticité du mucus, 2-une meilleure

diffusion des lipoplexes dans le mucus (tant à l'échelle microscopique qu'à l'échelle macroscopique), et 3-une efficacité de transfection augmentée (dans le modèle Calu-3 cultivé en ALI pendant 14 jours), et ceci pour tous les lipides cationiques testés. La concentration en lipide polysoufré s'est avérée déterminante dans l'apport de cette activité mucolytique. Cette stratégie a aussi permis de souligner le bénéfice d'une action mucolytique locale (efficacité augmentée pour une concentration en entité thiol fortement réduite) comparée à l'action générale des agents mucolytiques comme la NAC, même si ce point doit encore être confirmé. Pour cela, nous vérifierons que la taille plus petite des lipoplexes comprenant 3 équivalents de lipides polysoufrés n'a pas influencé certains résultats, et réévaluerons nos formulations à des temps de contact avec le mucus plus courts, ce qui nous permettra de mieux appréhender la contrainte imposée par la clairance mucociliaire, et ainsi de mieux valoriser l'apport de l'activité mucolytique. Si ces vérifications s'avèrent concluantes, nous envisageons de tester nos formulations dans des conditions plus représentatives du poumon pathologique, comme par exemple sur des expectorations de patients atteints de pathologie pulmonaire ou sur des modèles murins d'asthme, caractérisés par une hypersécrétion de mucus. Pour des tests de transfection *in vivo*, il serait intéressant d'utiliser un acide nucléique plus pertinent que celui de la luciférase, comme un siARN ciblant des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation du poumon.

Enfin, nos données ont montré que le concept de lipides *helper* polysoufrés est transposable à d'autres lipides cationiques que le lipide C8. Ces résultats prometteurs nous permettent d'étendre le concept de vecteurs de thérapie génique à activité mucolytique intrinsèque à d'autres types de vecteurs. Ainsi, une nouvelle étude démarre actuellement au laboratoire sur des nanoparticules de carbone (les *carbon dots*), de diamètre plus petit que les lipoplexes (< 100 nm), fonctionnalisées pour complexer de l'acide nucléique, mais également porter une activité de libération de composés thiols.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THÈSE

Publications :

- 1 - Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic nanoparticles than zeta potential. Weiss M., Fan J., Claudel M., Sonntag T., Didier P., Ronzani C., Lebeau L., Pons F. J. Nanobiotech. 2021, 19, 5 (DOI: 10.1186/s12951-020-00747-7)
- 2 - Mucus producing epithelium models for investigating the activity of gene delivery systems in the lung. Sonntag T., Rapp M., Didier P., Lebeau L., Pons F., Casset A. Soumis à Int. J. Pharm. le 31/08/2021, en révision.

Communications à des congrès :

- 1 - Sonntag T.*, Casset A., Didier P., Rapp M., Lebeau L., Pons F. Impact of mucus on gene delivery efficacy by phospholipid carriers in the lung. SFNano – C’Nano joint Meeting, Dijon (France), 10-12/12/2019 (*communication affichée)
- 2 - Sonntag T.*, Casset A., Rapp M., Lebeau L., Pons F. Evaluation of mucolytic carriers for gene therapy in the lung. Journées Campus d’Illkirch, Illkirch, 1-2/04/2019 (*communication orale)
- 3 - Pons F.*, Fan J., Claudel M., Weiss M., Sonntag T., Lebeau L., Ronzani C. Impact of the physicochemical characteristics of nanoparticles on their safety: Lessons from a comprehensive study on a carbon particle library. Fifth Annual Meeting SFNano, Montpellier, 3-5/12/2018 (*communication affichée)
- 4 - Fan J., Weiss M., Claudel M., Sonntag T., Lebeau L., Ronzani C., Pons F*. Positive surface charge: a predictive factor for nanoparticle toxicity? Nanosafe 2018, Grenoble, 5-9/11/2018 (*communication orale)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulkarim, M., Agulló, N., Cattoz, B., Griffiths, P., Bernkop-Schnürch, A., Borros, S.G., and Gumbleton, M. (2015). Nanoparticle diffusion within intestinal mucus: Three-dimensional response analysis dissecting the impact of particle surface charge, size and heterogeneity across polyelectrolyte, pegylated and viral particles. *Eur J Pharm Biopharm* 97, 230–238.
- Ahonen, M.J.R., Hill, D.B., and Schoenfisch, M.H. (2019). Nitric oxide-releasing alginates as mucolytic agents. *ACS Biomater Sci Eng* 5, 3409–3418.
- Aissaoui, A., Chami, M., Hussein, M., and Miller, A.D. (2011). Efficient topical delivery of plasmid DNA to lung *in vivo* mediated by putative triggered, PEGylated pDNA nanoparticles. *J Control Release* 154, 275–284.
- Almofti, M.R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Li, W., and Kiwada, H. (2003). Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. *Mol Membr Biol* 20, 35–43.
- Alton, E.W.F.W., Armstrong, D.K., Ashby, D., Bayfield, K.J., Bilton, D., Bloomfield, E.V., Boyd, A.C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., et al. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 3, 684–691.
- Alton, E.W.F.W., Beekman, J.M., Boyd, A.C., Brand, J., Carlon, M.S., Connolly, M.M., Chan, M., Conlon, S., Davidson, H.E., Davies, J.C., et al. (2017). Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 72, 137–147.
- Amsden, B. (1999). An obstruction-scaling model for diffusion in homogeneous hydrogels. *Macromolecules* 32, 874–879.
- Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C.P., and Amal, R. (2010). Assembly of polyethylenimine-based magnetic iron oxide vectors: insights into gene delivery. *Langmuir* 26, 7314–7326.
- Arulmuthu, E.R., Williams, D.J., Baldascini, H., Versteeg, H.K., and Hoare, M. (2007). Studies on aerosol delivery of plasmid DNA using a mesh nebulizer. *Biotechnol Bioeng* 98, 939–955.
- Atanasova, K.R., and Reznikov, L.R. (2019). Strategies for measuring airway mucus and mucins. *Respir Res* 20, 261.
- Athanasopoulos, T., Munye, M.M., and Yáñez-Muñoz, R.J. (2017). Nonintegrating gene therapy vectors. *Hematol Oncol Clin North Am* 31, 753–770.
- Bajka, B.H., Rigby, N.M., Cross, K.L., Macierzanka, A., and Mackie, A.R. (2015). The influence of small intestinal mucus structure on particle transport *ex vivo*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 135, 73–80.
- Bandi, S.P., Bhatnagar, S., and Venuganti, V.V.K. (2021). Advanced materials for drug delivery across mucosal barriers. *Acta Biomater* 119, 13–29.

- Bansil, R., and Turner, B.S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 11, 164–170.
- Bansil, R., and Turner, B.S. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 3–15.
- Barnes, P.J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 138, 16–27.
- Barthelmes, J., Dünnhaupt, S., Unterhofer, S., Perera, G., Schlocker, W., and Bernkop-Schnürch, A. (2013). Thiolated particles as effective intravesical drug delivery systems for treatment of bladder-related diseases. *Nanomedicine* 8, 65–75.
- Behr, J.P. (1997). The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* 51, 34–36.
- Behr, J.P., Demeneix, B., Loeffler, J.P., and Perez-Mutul, J. (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6982–6986.
- Belmadi, N., Midoux, P., Loyer, P., Passirani, C., Pichon, C., Le Gall, T., Jaffres, P.-A., Lehn, P., and Montier, T. (2015). Synthetic vectors for gene delivery: An overview of their evolution depending on routes of administration. *Biotechnol J* 10, 1370–1389.
- Berchel, M., Haelters, J.-P., Afonso, D., Maroto, A., Deschamps, L., Giamarchi, P., and Jaffrès, P.-A. (2014). Functionalized phospholipid molecular platform: Use for production of cationic fluorescent lipids. *Eur J Org Chem* 2014, 1076–1083.
- Berger, J.T., Voynow, J.A., Peters, K.W., and Rose, M.C. (1999). Respiratory carcinoma cell lines: *MUC* genes and glycoconjugates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 500–510.
- Beumer, W., Swildens, J., Leal, T., Noel, S., Anthonijsz, H., van der Horst, G., Kuiperij-Boersma, H., Potman, M., van Putten, C., Biasutto, P., et al. (2019). Evaluation of eluforsen, a novel RNA oligonucleotide for restoration of CFTR function in *in vitro* and murine models of p.Phe508del cystic fibrosis. *PLoS ONE* 14, e0219182.
- Bhattacharjee, S., Mahon, E., Harrison, S.M., McGetrick, J., Muniyappa, M., Carrington, S.D., and Brayden, D.J. (2017). Nanoparticle passage through porcine jejunal mucus: Microfluidics and rheology. *Nanomedicine* 13, 863–873.
- Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guégan, P., Mével, M., et al. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 33, 2980–2990.
- Birket, S.E., Chu, K.K., Liu, L., Houser, G.H., Diephuis, B.J., Wilsterman, E.J., Dierksen, G., Mazur, M., Shastry, S., Li, Y., et al. (2014). A functional anatomic defect of the cystic fibrosis airway. *Am J Respir Crit Care Med* 190, 421–432.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L.,

- Chiang, Y., Tolstoshev, P., et al. (1995). T Lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475–480.
- Boegh, M., Baldursdóttir, S.G., Müllertz, A., and Nielsen, H.M. (2014). Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing *in vitro* model for assessment of intestinal drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 87, 227–235.
- Bonifazi, P., D’Angelo, C., Zagarella, S., Zelante, T., Bozza, S., De Luca, A., Giovannini, G., Moretti, S., Iannitti, R.G., Fallarino, F., et al. (2010). Intranasally delivered siRNA targeting PI3K/Akt/mTOR inflammatory pathways protects from aspergillosis. *Mucosal Immunol* 3, 193–205.
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., and Baeza-Squiban, A. (2013). Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium *in vitro* to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol In Vitro* 27, 533–542.
- Boucher, R.C., Knowles, M.R., Johnson, L.G., Olsen, J.C., Pickles, R., Wilson, J.M., Engelhardt, J., Yang, Y., and Grossman, M. (1994). Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity. The University of North Carolina at Chapel Hill. *Hum Gene Ther* 5, 615–639.
- Boylan, N.J., Suk, J.S., Lai, S.K., Jelinek, R., Boyle, M.P., Cooper, M.J., and Hanes, J. (2012). Highly compacted DNA nanoparticles with low MW PEG coatings: *In vivo*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation. *J Control Release* 157, 72–79.
- Braeckmans, K., Peeters, L., Sanders, N.N., De Smedt, S.C., and Demeester, J. (2003). Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys J* 85, 2240–2252.
- Broughton-Head, V.J., Smith, J.R., Shur, J., and Shute, J.K. (2007). Actin limits enhancement of nanoparticle diffusion through cystic fibrosis sputum by mucolytics. *Pulm Pharmacol Ther* 20, 708–717.
- Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., and De Spirito, M. (2007). Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J* 21, 3872–3876.
- Burgel, P.-R., Montani, D., Danel, C., Dusser, D.J., and Nadel, J.A. (2007). A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 62, 153–161.
- Bustamante-Marin, X.M., and Ostrowski, L.E. (2017). Cilia and mucociliary clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a028241.
- Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., and Rubinstein, M. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 337, 937–941.
- Calverley, P., Rogliani, P., and Papi, A. (2021). Safety of *N*-acetylcysteine at high doses in chronic respiratory diseases: A review. *Drug Saf* 44, 273–290.

- Cantin, A.M., Hanrahan, J.W., Bilodeau, G., Ellis, L., Dupuis, A., Liao, J., Zielenski, J., and Durie, P. (2006). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 1139–1144.
- Capel, V., Vllasaliu, D., Watts, P., and Stolnik, S. (2016). Insight into the relationship between the cell culture model, cell trafficking and siRNA silencing efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 477, 260–265.
- Carlstedt, I., and Sheehan, J.K. (1989). Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins. *Symp Soc Exp Biol* 43, 289–316.
- Carman, C.V. (2011). Overview: Imaging in the study of integrins. *Methods Mol Biol* 757, 159–189.
- Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci* 17, 1712.
- Celli, J.P., Turner, B.S., Afdhal, N.H., Ewoldt, R.H., McKinley, G.H., Bansil, R., and Erramilli, S. (2007). Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol–gel transition. *Biomacromolecules* 8, 1580–1586.
- Charrier, C., Rodger, C., Robertson, J., Kowalczyk, A., Shand, N., Fraser-Pitt, D., Mercer, D., and O’Neil, D. (2014). Cysteamine (Lynovex®), a novel mucoactive antimicrobial & antibiofilm agent for the treatment of cystic fibrosis. *Orphanet J Rare Dis* 9, 189.
- Chayed, S., and Winnik, F.M. (2007). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 65, 363–370.
- Chen, E.Y.T., Wang, Y.-C., Chen, C.-S., and Chin, W.-C. (2010). Functionalized positive nanoparticles reduce mucin swelling and dispersion. *PLoS ONE* 5, e15434.
- Chen, E.Y.T., Garnica, M., Wang, Y.-C., Chen, C.-S., and Chin, W.-C. (2011). Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles. *PLoS ONE* 6, e16198.
- Cheng, X., and Lee, R.J. (2016). The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 99, 129–137.
- Chisholm, J.F., Shenoy, S.K., Shade, J.K., Kim, V., Putcha, N., Carson, K.A., Wise, R., Hansel, N.N., Hanes, J.S., Suk, J.S., et al. (2019). Nanoparticle diffusion in spontaneously expectorated sputum as a biophysical tool to probe disease severity in COPD. *Eur Respir J* 54, 1900088.
- Chu, Q., Tousignant, J.D., Fang, S., Jiang, C., Eastman, S.J., Chen, L.H., Cheng, S.H., and Scheule, R.K. (1999). Binding and uptake of cationic lipid: pDNA complexes by polarized airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* 10, 25–36.
- Cone, R.A. (2009). Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 75–85.
- Craparo, E.F., Porsio, B., Sardo, C., Giammona, G., and Cavallaro, G. (2016). Pegylated polyaspartamide–polylactide-based nanoparticles penetrating cystic fibrosis artificial mucus. *Biomacromolecules* 17, 767–777.
- Crater, J.S., and Carrier, R.L. (2010). Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle

- transport. *Macromol Biosci* 10, 1473–1483.
- Crooke, S.T., Wang, S., Vickers, T.A., Shen, W., and Liang, X. (2017). Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 35, 230–237.
- Cu, Y., and Saltzman, W.M. (2009). Mathematical modeling of molecular diffusion through mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 101–114.
- Dailey, L.A., Jekel, N., Fink, L., Gessler, T., Schmehl, T., Wittmar, M., Kissel, T., and Seeger, W. (2006). Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 215, 100–108.
- Daubeuf, F., and Frossard, N. (2013). Acute asthma models to ovalbumin in the mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 3, 31–37.
- Davies, L.A., Nunez-Alonso, G.A., McLachlan, G., Hyde, S.C., and Gill, D.R. (2014). Aerosol delivery of DNA/liposomes to the lung for cystic fibrosis gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev* 25, 97–107.
- Dawson, M., Wirtz, D., and Hanes, J. (2003). Enhanced viscoelasticity of human cystic fibrotic sputum correlates with increasing microheterogeneity in particle transport. *J Biol Chem* 278, 50393–50401.
- Dawson, M., Krauland, E., Wirtz, D., and Hanes, J. (2004). Transport of polymeric nanoparticle gene carriers in gastric mucus. *Biotechnol Prog* 20, 851–857.
- Deacon, J., Abdelghany, S.M., Quinn, D.J., Schmid, D., Megaw, J., Donnelly, R.F., Jones, D.S., Kissenpfennig, A., Elborn, J.S., Gilmore, B.F., et al. (2015). Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *J Control Release* 198, 55–61.
- Demouveau, B., Gouyer, V., Gottrand, F., Narita, T., and Desseyn, J.-L. (2018). Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv Colloid Interface Sci* 252, 69–82.
- Densmore, C.L., Giddings, T.H., Waldrep, J.C., Kinsey, B.M., and Knight, V. (1999). Gene transfer by guanidinium-cholesterol: dioleoylphosphatidyl-ethanolamine liposome-DNA complexes in aerosol. *J Gene Med* 1, 251–264.
- Di Gioia, S., Trapani, A., Castellani, S., Carbone, A., Belgiovine, G., Craparo, E.F., Puglisi, G., Cavallaro, G., Trapani, G., and Conese, M. (2015). Nanocomplexes for gene therapy of respiratory diseases: Targeting and overcoming the mucus barrier. *Pulm Pharmacol Ther* 34, 8–24.
- Ding, Y., Jiang, Z., Saha, K., Kim, C.S., Kim, S.T., Landis, R.F., and Rotello, V.M. (2014). Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol Ther* 22, 1075–1083.
- Douglas, K., Piccirillo, C., and Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm* 68, 676–687.

- Duncan, G.A., Jung, J., Joseph, A., Thaxton, A.L., West, N.E., Boyle, M.P., Hanes, J., and Suk, J.S. (2016). Microstructural alterations of sputum in cystic fibrosis lung disease. *JCI Insight* *1*, e88198.
- Dunican, E.M., Elicker, B.M., Gierada, D.S., Nagle, S.K., Schiebler, M.L., Newell, J.D., Raymond, W.W., Lachowicz-Scroggins, M.E., Di Maio, S., Hoffman, E.A., et al. (2018). Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin Invest* *128*, 997–1009.
- Dünnhaupt, S., Barthelmes, J., Hombach, J., Sakloetsakun, D., Arkhipova, V., and Bernkop-Schnürch, A. (2011). Distribution of thiolated mucoadhesive nanoparticles on intestinal mucosa. *Int J Pharm* *408*, 191–199.
- Dünnhaupt, S., Barthelmes, J., Köllner, S., Sakloetsakun, D., Shahnaz, G., Düregger, A., and Bernkop-Schnürch, A. (2015). Thiolated nanocarriers for oral delivery of hydrophilic macromolecular drugs. *Carbohydr Polym* *117*, 577–584.
- Ehre, C., Rushton, Z.L., Wang, B., Hothem, L.N., Morrison, C.B., Fontana, N.C., Markovetz, M.R., Delion, M.F., Kato, T., Villalon, D., et al. (2019). An improved inhaled mucolytic to treat airway muco-obstructive diseases. *Am J Respir Crit Care Med* *199*, 171–180.
- El-Sayed, A., and Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther* *21*, 1118–1130.
- Ensign, L.M., Henning, A., Schneider, C.S., Maisel, K., Wang, Y.-Y., Porosoff, M.D., Cone, R., and Hanes, J. (2013). *Ex vivo* characterization of particle transport in mucus secretions coating freshly excised mucosal tissues. *Mol Pharm* *10*, 2176–2182.
- Ernst, J., Klinger-Strobel, M., Arnold, K., Thamm, J., Hartung, A., Pletz, M.W., Makarewicz, O., and Fischer, D. (2018). Polyester-based particles to overcome the obstacles of mucus and biofilms in the lung for tobramycin application under static and dynamic fluidic conditions. *Eur J Pharm Biopharm* *131*, 120–129.
- Esther, C.R., Muhlebach, M.S., Ehre, C., Hill, D.B., Wolfgang, M.C., Kesimer, M., Ramsey, K.A., Markovetz, M.R., Garbarine, I.C., Forest, M.G., et al. (2019). Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. *Sci Transl Med* *11*, eaav3488.
- Evans, C.M., and Koo, J.S. (2009). Airway mucus: The good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther* *121*, 332–348.
- Evans, C.M., Raclawska, D.S., Ttofali, F., Liptzin, D.R., Fletcher, A.A., Harper, D.N., McGing, M.A., McElwee, M.M., Williams, O.W., Sanchez, E., et al. (2015). The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat Commun* *6*, 6281.
- Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* *363*, 2233–2247.
- Fahy, J.V., Steiger, D.J., Liu, J., Basbaum, C.B., Finkbeiner, W.E., and Boushey, H.A. (1993). Markers

- of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 147, 1132–1137.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7413–7417.
- Ferrari, S., Kitson, C., Farley, R., Steel, R., Marriott, C., Parkins, D., Scarpa, M., Wainwright, B., Evans, M., Colledge, W., et al. (2001). Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Ther* 8, 1380–1386.
- Filion, M.C., and Phillips, N.C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta* 1329, 345–356.
- Friedmann, T., and Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 8.
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7, 5577–5591.
- Fujita, Y., Takeshita, F., Kuwano, K., and Ochiya, T. (2013). RNAi therapeutic platforms for lung diseases. *Pharmaceuticals* 6, 223–250.
- Gao, Y., He, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Gao, T., Wang, J.-H., and Wang, S. (2021). Zwitterion-functionalized mesoporous silica nanoparticles for enhancing oral delivery of protein drugs by overcoming multiple gastrointestinal barriers. *J Colloid Interface Sci* 582, 364–375.
- Geiser, M., Quaile, O., Wenk, A., Wigge, C., Eigeldinger-Berthou, S., Hirn, S., Schäffler, M., Schleh, C., Möller, W., Mall, M.A., et al. (2013). Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol* 10, 19.
- George, I., Vranic, S., Boland, S., Courtois, A., and Baeza-Squiban, A. (2015a). Development of an *in vitro* model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicol In Vitro* 29, 51–58.
- George, I., Naudin, G., Boland, S., Mornet, S., Contremoulins, V., Beugnon, K., Martinon, L., Lambert, O., and Baeza-Squiban, A. (2015b). Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale* 7, 4529–4544.
- Ghanem, R., Laurent, V., Roquefort, P., Haute, T., Ramel, S., Le Gall, T., Aubry, T., and Montier, T. (2020). Optimizations of *in vitro* mucus and cell culture models to better predict *in vivo* gene transfer in pathological lung respiratory airways: cystic fibrosis as an example. *Pharmaceutics* 13, 47.
- Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., and Abedi, M.R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 20, e3015.
- Girón Moreno, R.M., García-Clemente, M., Diab-Cáceres, L., Martínez-Vergara, A., Martínez-García, M.Á., and Gómez-Punter, R.M. (2021). Treatment of pulmonary disease of cystic fibrosis: a

- comprehensive review. *Antibiotics* *10*, 486.
- Glenister, D.A., Salamon, K.E., Smith, K., Beighton, D., and Keevil, C.W. (1988). Enhanced growth of complex communities of dental plaque bacteria in mucin-limited continuous culture. *Microb Ecol Health Dis* *1*, 31–38.
- Gonçalves, C., Ardourel, M.-Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B., and Pichon, C. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med* *11*, 401–411.
- Gorman, C., Aikawa, M., Fox, B., Fox, E., Lapuz, C., Michaud, B., Nguyen, H., Roche, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (1997). Efficient *in vivo* delivery of DNA to pulmonary cells using the novel lipid EDMPC. *Gene Ther* *4*, 983–992.
- Grainger, C.I., Greenwell, L.L., Lockley, D.J., Martin, G.P., and Forbes, B. (2006). Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* *23*, 1482–1490.
- Griesenbach, U., McLachlan, G., Owaki, T., Somerton, L., Shu, T., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Baker, E., et al. (2011a). Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model. *Gene Ther* *18*, 182–188.
- Griesenbach, U., Vicente, C.C., Roberts, M.J., Meng, C., Soussi, S., Xenariou, S., Tennant, P., Baker, A., Baker, E., Gordon, C., et al. (2011b). Secreted Gaussia luciferase as a sensitive reporter gene for *in vivo* and *ex vivo* studies of airway gene transfer. *Biomaterials* *32*, 2614–2624.
- Griesser, J., Hetényi, G., Kadas, H., Demarne, F., Jannin, V., and Bernkop-Schnürch, A. (2018). Self-emulsifying peptide drug delivery systems: How to make them highly mucus permeating. *Int J Pharm* *538*, 159–166.
- Grießinger, J., Dünnhaupt, S., Cattoz, B., Griffiths, P., Oh, S., Gómez, S.B. i, Wilcox, M., Pearson, J., Gumbleton, M., Abdulkarim, M., et al. (2015). Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *Eur J Pharm Biopharm* *96*, 464–476.
- Griffiths, P.C., Occhipinti, P., Morris, C., Heenan, R.K., King, S.M., and Gumbleton, M. (2010). PGSE-NMR and SANS studies of the interaction of model polymer therapeutics with mucin. *Biomacromolecules* *11*, 120–125.
- Griffiths, P.C., Cattoz, B., Ibrahim, M.S., and Anuonye, J.C. (2015). Probing the interaction of nanoparticles with mucin for drug delivery applications using dynamic light scattering. *Eur J Pharm Biopharm* *97*, 218–222.
- Groo, A.-C., and Lagarce, F. (2014). Mucus models to evaluate nanomedicines for diffusion. *Drug Discov Today* *19*, 1097–1108.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* *118*, 3132–3142.
- Hamed, R., and Fiegel, J. (2014). Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension

- properties. *J Biomed Mater Res* 102, 1788–1798.
- Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M.W., Bonfield, T., Davis, P.B., and Ferkol, T. (1997). Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest* 100, 2810–2815.
- Heijink, I.H., Marcel Kies, P., van Oosterhout, A.J.M., Postma, D.S., Kauffman, H.F., and Vellenga, E. (2007). Der p, IL-4, and TGF- β cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 351–359.
- Heijink, I.H., Postma, D.S., Noordhoek, J.A., Broekema, M., and Kapus, A. (2010). House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 69–79.
- Held, K.D., and Biaglow, J.E. (1994). Mechanisms for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. *Radiat Res* 139, 15–23.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., et al. (2014). Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J Clin Invest* 124, 3047–3060.
- Henke, M.O., John, G., Germann, M., Lindemann, H., and Rubin, B.K. (2007). MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 816–821.
- Henning, A., Schneider, M., Bur, M., Blank, F., Gehr, P., and Lehr, C.-M. (2008). Embryonic chicken trachea as a new *in vitro* model for the investigation of mucociliary particle clearance in the airways. *AAPS PharmSciTech* 9, 521–527.
- Hibbitts, A., Lieggi, N., McCabe, O., Thomas, W., Barlow, J., O'Brien, F., and Cryan, S.-A. (2011). Screening of siRNA nanoparticles for delivery to airway epithelial cells using high-content analysis. *Ther Deliv* 2, 987–999.
- Hill, D.B., and Button, B. (2012). Establishment of respiratory air–liquid interface cultures and their use in studying mucin production, secretion, and function. *Methods Mol Biol* 842, 245–258.
- Hill, D.B., Vasquez, P.A., Mellnik, J., McKinley, S.A., Vose, A., Mu, F., Henderson, A.G., Donaldson, S.H., Alexis, N.E., Boucher, R.C., et al. (2014). A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. *PLoS ONE* 9, e87681.
- Hillaireau, H., and Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66, 2873–2896.
- Hoegger, M.J., Fischer, A.J., McMenimen, J.D., Ostedgaard, L.S., Tucker, A.J., Awadalla, M.A., Moninger, T.O., Michalski, A.S., Hoffman, E.A., Zabner, J., et al. (2014). Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science* 345, 818–822.
- Hoekstra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F., and Zuhorn, I. (2007). Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem Soc Trans* 35, 68–71.

- Hofmann, W., and Asgharian, B. (2003). The effect of lung structure on mucociliary clearance and particle retention in human and rat lungs. *Toxicol Sci* 73, 448–456.
- Hong, S.-H., Park, S.-J., Lee, S., Cho, C.S., and Cho, M.-H. (2015). Aerosol gene delivery using viral vectors and cationic carriers for *in vivo* lung cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 12, 977–991.
- Hong, Z., Chasan, B., Bansil, R., Turner, B.S., Bhaskar, K.R., and Afdhal, N.H. (2005). Atomic force microscopy reveals aggregation of gastric mucin at low pH. *Biomacromolecules* 6, 3458–3466.
- Hovenberg, H.W., Davies, J.R., Herrmann, A., Lindén, C.-J., and Carlstedt, I. (1996). MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J* 13, 839–847.
- Huang, H.-Y., Lee, C.-C., and Chiang, B.-L. (2008). Small interfering RNA against interleukin-5 decreases airway eosinophilia and hyper-responsiveness. *Gene Ther* 15, 660–667.
- Ibrahim, B.M., Park, S., Han, B., and Yeo, Y. (2011). A strategy to deliver genes to cystic fibrosis lungs: A battle with environment. *J Control Release* 155, 289–295.
- Innes, A.L., Woodruff, P.G., Ferrando, R.E., Donnelly, S., Dolganov, G.M., Lazarus, S.C., and Fahy, J.V. (2006). Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 130, 1102–1108.
- Innes, A.L., Carrington, S.D., Thornton, D.J., Kirkham, S., Rousseau, K., Dougherty, R.H., Raymond, W.W., Caughey, G.H., Muller, S.J., and Fahy, J.V. (2009). *Ex Vivo* sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 203–210.
- Jeffries, J.L., Jia, J., Choi, W., Choe, S., Miao, J., Xu, Y., Powell, R., Lin, J., Kuang, Z., Gaskins, H.R., et al. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewisx to increase binding to airway epithelial cells. *Mucosal Immunol* 9, 1039–1050.
- Jeong, M.H., Kim, H.R., Bang, I.J., Yoo, S.H., Lee, S.J., Lee, K.H., and Chung, K.H. (2019). *In vitro* model for predicting acute inhalation toxicity by using a Calu-3 epithelium cytotoxicity assay. *J Pharmacol Toxicol Methods* 98, 106576.
- Jia, Z., Guo, Z., Yang, C.-T., Prestidge, C., and Thierry, B. (2021). “Mucus-on-Chip”: A new tool to study the dynamic penetration of nanoparticulate drug carriers into mucus. *Int J Pharm* 598, 120391.
- Jiang, C., O’Connor, S.P., Fang, S.L., Wang, K.X., Marshall, J., Williams, J.L., Wilburn, B., Echelard, Y., and Cheng, S.H. (1998). Efficiency of cationic lipid-mediated transfection of polarized and differentiated airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 9, 1531–1542.
- Jiang, J., Malavia, N., Suresh, V., and George, S.C. (2009). Nitric oxide gas phase release in human small airway epithelial cells. *Respir Res* 10, 3.
- Jinnai, M., Niimi, A., Ueda, T., Matsuoka, H., Takemura, M., Yamaguchi, M., Otsuka, K., Oguma, T., Takeda, T., Ito, I., et al. (2010). Induced sputum concentrations of mucin in patients with asthma and chronic cough. *Chest* 137, 1122–1129.

- Jokerst, J.V., Lobovkina, T., Zare, R.N., and Gambhir, S.S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* 6, 715–728.
- Juliano, R.L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 44, 6518–6548.
- Kanai, K., Koarai, A., Shishikura, Y., Sugiura, H., Ichikawa, T., Kikuchi, T., Akamatsu, K., Hirano, T., Nakanishi, M., Matsunaga, K., et al. (2015). Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. *Respir Investig* 53, 137–148.
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Kuno, Y. (2000). Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm Dev Technol* 5, 77–85.
- Kennedy, M.T., Pozharski, E.V., Rakhmanova, V.A., and MacDonald, R.C. (2000). Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes. *Biophys J* 78, 1620–1633.
- Kesimer, M., Ford, A.A., Ceppe, A., Radicioni, G., Cao, R., Davis, C.W., Doerschuk, C.M., Alexis, N.E., Anderson, W.H., Henderson, A.G., et al. (2017). Airway mucin concentration as a marker of chronic bronchitis. *N Engl J Med* 377, 911–922.
- Khan, M.A., Khan, Z.A., Charles, M., Pratap, P., Naeem, A., Siddiqui, Z., Naqvi, N., and Srivastava, S. (2021). Cytokine storm and mucus hypersecretion in COVID-19: Review of mechanisms. *J Inflamm Res* 14, 175–189.
- Kim, A.J., Boylan, N.J., Suk, J.S., Hwangbo, M., Yu, T., Schuster, B.S., Cebotaru, L., Lesniak, W.G., Oh, J.S., Adstamongkonkul, P., et al. (2013). Use of single-site-functionalized PEG dendrons to prepare gene vectors that penetrate human mucus barriers. *Angew Chem Int Ed* 52, 3985–3988.
- Kim, N., Duncan, G.A., Hanes, J., and Suk, J.S. (2016). Barriers to inhaled gene therapy of obstructive lung diseases: A review. *J Control Release* 240, 465–488.
- Kirch, J., Schneider, A., Abou, B., Hopf, A., Schaefer, U.F., Schneider, M., Schall, C., Wagner, C., and Lehr, C.-M. (2012). Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 18355–18360.
- Kirchner, S., Fothergill, J.L., Wright, E.A., James, C.E., Mowat, E., and Winstanley, C. (2012). Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. *J Vis Exp* 3857.
- Kirkham, S., Sheehan, J.K., Knight, D., Richardson, P.S., and Thornton, D.J. (2002). Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J* 361, 537–546.
- Kirkham, S., Kolsum, U., Rousseau, K., Singh, D., Vestbo, J., and Thornton, D.J. (2008). MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1033–1039.
- Kleemann, E., Neu, M., Jekel, N., Fink, L., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., and Kissel, T. (2005). Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG–PEI. *J Control Release* 109, 299–316.

- Kočevar-Nared, J., Kristl, J., and Šmid-Korbar, J. (1997). Comparative rheological investigation of crude gastric mucin and natural gastric mucus. *Biomaterials* 18, 677–681.
- Koch, K., Dew, B., Corcoran, T.E., Przybycien, T.M., Tilton, R.D., and Garoff, S. (2011). Surface tension gradient driven spreading on aqueous mucin solutions: a possible route to enhanced pulmonary drug delivery. *Mol Pharm* 8, 387–394.
- Köllner, S., Dünnhaupt, S., Waldner, C., Hauptstein, S., Pereira de Sousa, I., and Bernkop-Schnürch, A. (2015). Mucus permeating thiomers nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 97, 265–272.
- Kolte, A., Patil, S., Lesimple, P., Hanrahan, J.W., and Misra, A. (2017). PEGylated composite nanoparticles of PLGA and polyethylenimine for safe and efficient delivery of pDNA to lungs. *Int J Pharm* 524, 382–396.
- Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J.O., and Safinya, C.R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* 281, 78–81.
- Kong, F., Liu, F., Li, W., Guo, X., Wang, Z., Zhang, H., Li, Q., Luo, L., Du, Y., Jin, Y., et al. (2016). Smart carbon nanotubes with laser-controlled behavior in gene delivery and therapy through a non-digestive trafficking pathway. *Small* 12, 6753–6766.
- Koynova, R., and MacDonald, R.C. (2003). Cationic *O*-ethylphosphatidylcholines and their lipoplexes: phase behavior aspects, structural organization and morphology. *Biochim Biophys Acta* 1613, 39–48.
- Koynova, R., Wang, L., and MacDonald, R.C. (2006). An intracellular lamellar-nonlamellar phase transition rationalizes the superior performance of some cationic lipid transfection agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 14373–14378.
- Koynova, R., Tenchov, B., Wang, L., and MacDonald, R.C. (2009). Hydrophobic moiety of cationic lipids strongly modulates their transfection activity. *Mol Pharm* 6, 951–958.
- Kreda, S.M., Okada, S.F., Van Heusden, C.A., O’Neal, W., Gabriel, S., Abdullah, L., Davis, C.W., Boucher, R.C., and Lazarowski, E.R. (2007). Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells: Coordinated release of nucleotides and mucins. *J Physiol* 584, 245–259.
- Kreft, M.E., Jerman, U.D., Lasič, E., Hevir-Kene, N., Rižner, T.L., Peterlin, L., and Kristan, K. (2015). The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized *in vitro* model to investigate bronchial epithelial function. *Eur J Pharm Sci* 69, 1–9.
- Krug, N., Hohlfeld, J.M., Kirsten, A.-M., Kornmann, O., Beeh, K.M., Kappeler, D., Korn, S., Ignatenko, S., Timmer, W., Rogon, C., et al. (2015). Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *N Engl J Med* 372, 1987–1995.
- Kurbatova, P., Bessonov, N., Volpert, V., Tiddens, H.A.W.M., Cornu, C., Nony, P., and Caudri, D. (2015). Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *J Theor Biol* 372, 81–88.
- Lachowicz-Scroggins, M.E., Yuan, S., Kerr, S.C., Dunican, E.M., Yu, M., Carrington, S.D., and Fahy, G.J. (2015). Mucus permeability and its role in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L11–L21.

- J.V. (2016). Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* *194*, 1296–1299.
- Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2013). Strategies for improving mucosal drug delivery. *Nanomedicine* *8*, 2061–2075.
- Laffleur, F., Hintzen, F., Shahnaz, G., Rahmat, D., Leithner, K., and Bernkop-Schnürch, A. (2014). Development and *in vitro* evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus. *Nanomedicine* *9*, 387–396.
- Laffleur, F., Netsomboon, K., Bernkop-Schnürch, A., Westmeier, D., Stauber, R.H., and Docter, D. (2017). Comprehensive mucoadhesive study of anionic polymers and their derivate. *Eur Polym J* *93*, 314–322.
- Lai, S.K., O’Hanlon, D.E., Harrold, S., Man, S.T., Wang, Y.-Y., Cone, R., and Hanes, J. (2007). Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 1482–1487.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009a). Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* *61*, 86–100.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Cone, R., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009b). Altering mucus rheology to “solidify” human mucus at the nanoscale. *PLoS ONE* *4*, e4294.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., and Hanes, J. (2009c). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev* *61*, 158–171.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Hida, K., Cone, R., and Hanes, J. (2010). Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*, 598–603.
- Lai, S.K., Suk, J.S., Pace, A., Wang, Y.-Y., Yang, M., Mert, O., Chen, J., Kim, J., and Hanes, J. (2011). Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus. *Biomaterials* *32*, 6285–6290.
- Lam, H.T., Le, N.-M.N., Phan, T.N.Q., and Bernkop-Schnürch, A. (2021). Mucolytic self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) containing a hydrophobic ion-pair of proteinase. *Eur J Pharm Sci* *162*, 105658.
- Lapinsky, S.E. (2015). Endotracheal intubation in the ICU. *Crit Care* *19*, 258.
- Leal, J., Smyth, H.D.C., and Ghosh, D. (2017). Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm* *532*, 555–572.
- Lee, C.S., Bishop, E.S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E.M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., et al. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis* *4*, 43–63.
- Lee, D.F., Lethem, M.I., and Lansley, A.B. (2021). A comparison of three mucus-secreting airway cell lines (Calu-3, SPOC1 and UCN3T) for use as biopharmaceutical models of the nose and lung. *Eur J Pharm Biopharm* *167*, 159–174.

- Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., et al. (1996). Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 7, 1701–1717.
- Leopold, P.L., O'Mahony, M.J., Lian, X.J., Tilley, A.E., Harvey, B.-G., and Crystal, R.G. (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS ONE* 4, e8157.
- Leslie Fulcher, M., Gabriel, S., Burns, K.A., Yankaskas, J.R., and Randell, S.H. (2005). Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Med* 107, 183–206.
- Li, W., and Szoka, F.C. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res* 24, 438–449.
- Li, L.D., Crouzier, T., Sarkar, A., Dunphy, L., Han, J., and Ribbeck, K. (2013). Spatial configuration and composition of charge modulates transport into a mucin hydrogel barrier. *Biophys J* 105, 1357–1365.
- Li, X., Chen, D., Le, C., Zhu, C., Gan, Y., Hovgaard, L., and Yang, M. (2011). Novel mucus-penetrating liposomes as a potential oral drug delivery system: preparation, *in vitro* characterization, and enhanced cellular uptake. *Int J Nanomedicine* 6, 3151–3162.
- Lieleg, O., Vladescu, I., and Ribbeck, K. (2010). Characterization of particle translocation through mucin hydrogels. *Biophys J* 98, 1782–1789.
- Liu, X., Yan, Z., Luo, M., and Engelhardt, J.F. (2006). Species-specific differences in mouse and human airway epithelial biology of recombinant adeno-associated virus transduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 56–64.
- Liu, Y., Liggitt, D., Zhong, W., Tu, G., Gaensler, K., and Debs, R. (1995). Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J Biol Chem* 270, 24864–24870.
- Liu, Y., Zhao, D., Sun, M., Wei, W., Wang, Y., Zhou, J., Zhang, R., Wang, J., Zhang, H., He, Z., et al. (2018). Covalently mucoadhesive amphiphilic prodrug of 5-fluorouracil for enhanced permeation and improved oral absorption. *Drug Deliv and Transl Res* 8, 645–656.
- Lu, W., Liu, X., Wang, T., Liu, F., Zhu, A., Lin, Y., Luo, J., Ye, F., He, J., Zhao, J., et al. (2021). Elevated MUC1 and MUC5AC mucin protein levels in airway mucus of critical ill COVID-19 patients. *J Med Virol* 93, 582–584.
- Lundstrom, K. (2018). Viral vectors in gene therapy. *Diseases* 6, 42.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* 114, 100–109.
- MacDonald, R.C., Ashley, G.W., Shida, M.M., Rakhmanova, V.A., Tarahovsky, Y.S., Pantazatos, D.P., Kennedy, M.T., Pozharski, E.V., Baker, K.A., Jones, R.D., et al. (1999). Physical and biological properties of cationic triesters of phosphatidylcholine. *Biophys J* 77, 2612–2629.
- MacDonald, R.C., Gorbonos, A., Momsen, M.M., and Brockman, H.L. (2006). Surface properties of dioleoyl- *sn* -glycerol-3-ethylphosphocholine, a cationic phosphatidylcholine transfection agent, alone and in combination with lipids or DNA. *Langmuir* 22, 2770–2779.

- Mahler, G.J., Shuler, M.L., and Glahn, R.P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J Nutr Biochem* 20, 494–502.
- Mahmood, A., Laffleur, F., Leonaviciute, G., and Bernkop-Schnürch, A. (2017). Protease-functionalized mucus penetrating microparticles: *In-vivo* evidence for their potential. *Int J Pharm* 532, 177–184.
- Marcos, V., Zhou-Suckow, Z., Önder Yildirim, A., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Krautgartner, W.D., Stoiber, W., Griesse, M., Eickelberg, O., et al. (2015). Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm* 2015, 1–11.
- Masotti, A., Miller, M.R., Celluzzi, A., Rose, L., Micciulla, F., Hadoke, P.W.F., Bellucci, S., and Caporali, A. (2016). Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine* 12, 1511–1522.
- Mastorakos, P., da Silva, A.L., Chisholm, J., Song, E., Choi, W.K., Boyle, M.P., Morales, M.M., Hanes, J., and Suk, J.S. (2015). Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 8720–8725.
- Mattiuzzi, C., and Lippi, G. (2020). Worldwide asthma epidemiology: insights from the Global Health Data Exchange database. *Int Forum Allergy Rhinol* 10, 75–80.
- McCormack, M.P., and Rabbitts, T.H. (2004). Activation of the T-cell oncogene *LMO2* after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 350, 913–922.
- McGill, S.L., and Smyth, H.D.C. (2010). Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol Pharm* 7, 2280–2288.
- Medina-Kauwe, L.K., Xie, J., and Hamm-Alvarez, S. (2005). Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* 12, 1734–1751.
- Menzel, C., and Bernkop-Schnürch, A. (2018). Enzyme decorated drug carriers: Targeted swords to cleave and overcome the mucus barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 164–174.
- Mercer, P.F., Abbott-Banner, K., Adcock, I.M., and Knowles, R.G. (2015). Translational models of lung disease. *Clin Sci* 128, 235–256.
- Meziu, E., Koch, M., Fleddermann, J., Schwarzkopf, K., Schneider, M., and Kraegeloh, A. (2021). Visualization of the structure of native human pulmonary mucus. *Int J Pharm* 597, 120238.
- Miah, K.M., Hyde, S.C., and Gill, D.R. (2019). Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 13, 709–725.
- Miller, C.R., Bondurant, B., McLean, S.D., McGovern, K.A., and O'Brien, D.F. (1998). Liposome–cell interactions *in vitro*: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* 37, 12875–12883.
- Mislick, K.A., and Baldeschwieler, J.D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12349–12354.

- Mochizuki, S., Kanegae, N., Nishina, K., Kamikawa, Y., Koiwai, K., Masunaga, H., and Sakurai, K. (2013). The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. *Biochim Biophys Acta* 1828, 412–418.
- Morgan, L.E., Jaramillo, A.M., Shenoy, S.K., Raclawska, D., Emezienna, N.A., Richardson, V.L., Hara, N., Harder, A.Q., NeeDell, J.C., Hennessy, C.E., et al. (2021). Disulfide disruption reverses mucus dysfunction in allergic airway disease. *Nat Commun* 12, 249.
- Mottais, A., Le Gall, T., Sibiril, Y., Ravel, J., Laurent, V., d'Arbonneau, F., and Montier, T. (2017). Enhancement of lung gene delivery after aerosol: a new strategy using non-viral complexes with antibacterial properties. *Biosci Rep* 37, BSR20160618.
- Müller, C., Leithner, K., Hauptstein, S., Hintzen, F., Salvenmoser, W., and Bernkop-Schnürch, A. (2013). Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly(acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications. *J Nanopart Res* 15, 1353.
- Mura, S., Hillaireau, H., Nicolas, J., Kerdine-Römer, S., Le Droumaguet, B., Deloménie, C., Nicolas, V., Pallardy, M., Tsapis, N., and Fattal, E. (2011). Biodegradable nanoparticles meet the bronchial airway barrier: how surface properties affect their interaction with mucus and epithelial cells. *Biomacromolecules* 12, 4136–4143.
- Murgia, X., Pawelzyk, P., Schaefer, U.F., Wagner, C., Willenbacher, N., and Lehr, C.-M. (2016). Size-limited penetration of nanoparticles into porcine respiratory mucus after aerosol deposition. *Biomacromolecules* 17, 1536–1542.
- Murgia, X., Yasar, H., Carvalho-Wodarz, C., Loretz, B., Gordon, S., Schwarzkopf, K., Schaefer, U., and Lehr, C.-M. (2017). Modelling the bronchial barrier in pulmonary drug delivery: A human bronchial epithelial cell line supplemented with human tracheal mucus. *Eur J Pharm Biopharm* 118, 79–88.
- Murgia, X., Loretz, B., Hartwig, O., Hittinger, M., and Lehr, C.-M. (2018). The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 82–97.
- Nafee, N., Husari, A., Maurer, C.K., Lu, C., de Rossi, C., Steinbach, A., Hartmann, R.W., Lehr, C.-M., and Schneider, M. (2014). Antibiotic-free nanotherapeutics: Ultra-small, mucus-penetrating solid lipid nanoparticles enhance the pulmonary delivery and anti-virulence efficacy of novel quorum sensing inhibitors. *J Control Release* 192, 131–140.
- Nafee, N., Forier, K., Braeckmans, K., and Schneider, M. (2018). Mucus-penetrating solid lipid nanoparticles for the treatment of cystic fibrosis: Proof of concept, challenges and pitfalls. *Eur J Pharm Biopharm* 124, 125–137.
- Nguyen, J., Xie, X., Neu, M., Dumitrascu, R., Reul, R., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Schermuly, R., Fink, L., Schmehl, T., et al. (2008). Effects of cell-penetrating peptides and pegylation on transfection efficiency of polyethylenimine in mouse lungs. *J Gene Med* 10, 1236–1246.
- Nishimoto, Y., Hisatsune, A., Katsuki, H., Miyata, T., Yokomizo, K., and Isohama, Y. (2010).

- Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression *in vivo* and *in vitro*. *J Pharmacol Sci* 113, 76–83.
- Nordgård, C.T., Nonstad, U., Olderøy, M.Ø., Espevik, T., and Draget, K.I. (2014). Alterations in mucus barrier function and matrix structure induced by guluronate oligomers. *Biomacromolecules* 15, 2294–2300.
- Norris, D.A., and Sinko, P.J. (1997). Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin. *J Appl Polym Sci* 63, 1481–1492.
- Odziomek, M., Sosnowski, T.R., and Gradoń, L. (2015). The influence of Functional Carrier Particles (FCPs) on the molecular transport rate through the reconstructed bronchial mucus: *in vitro* studies. *Transp Porous Med* 106, 439–454.
- Oguma, T., Asano, K., Tomomatsu, K., Kodama, M., Fukunaga, K., Shiomi, T., Ohmori, N., Ueda, S., Takihara, T., Shiraishi, Y., et al. (2011). Induction of mucin and MUC5AC expression by the protease activity of *Aspergillus fumigatus* in airway epithelial cells. *J Immunol* 187, 999–1005.
- Olmsted, S.S., Padgett, J.L., Yudin, A.I., Whaley, K.J., Moench, T.R., and Cone, R.A. (2001). Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys J* 81, 1930–1937.
- OMS. The top 10 causes of death (December, 9th 2020). Consulté le 21 octobre 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Ordoñez, C.L., Khashayar, R., Wong, H.H., Ferrando, R., Wu, R., Hyde, D.M., Hotchkiss, J.A., Zhang, Y., Novikov, A., Dolganov, G., et al. (2001). Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 517–523.
- Osman, G., Rodriguez, J., Chan, S.Y., Chisholm, J., Duncan, G., Kim, N., Tatler, A.L., Shakesheff, K.M., Hanes, J., Suk, J.S., et al. (2018). PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J Control Release* 285, 35–45.
- Parlato, R.M., Greco, F., Maffettone, P.L., and Larobina, D. (2019). Effect of pH on the viscoelastic properties of pig gastric mucus. *J Mech Behav Biomed Mater* 98, 195–199.
- Patil, S., Gao, Y.-G., Lin, X., Li, Y., Dang, Tian, Y., Zhang, W.-J., Jiang, S.-F., Qadir, A., and Qian, A.-R. (2019). The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *Int J Mol Sci* 20, 5491.
- Penconek, A., Michalczyk, U., Sienkiewicz, A., and Moskal, A. (2019). The effect of desert dust particles on rheological properties of saliva and mucus. *Environ Sci Pollut Res* 26, 12150–12157.
- Pereira de Sousa, I., Steiner, C., Schmutzler, M., Wilcox, M.D., Veldhuis, G.J., Pearson, J.P., Huck, C.W., Salvenmoser, W., and Bernkop-Schnürch, A. (2015a). Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 97, 273–279.

- Pereira de Sousa, I., Cattoz, B., Wilcox, M.D., Griffiths, P.C., Dalglish, R., Rogers, S., and Bernkop-Schnürch, A. (2015b). Nanoparticles decorated with proteolytic enzymes, a promising strategy to overcome the mucus barrier. *Eur J Pharm Biopharm* 97, 257–264.
- Pereira de Sousa, I., Moser, T., Steiner, C., Fichtl, B., and Bernkop-Schnürch, A. (2016). Insulin loaded mucus permeating nanoparticles: Addressing the surface characteristics as feature to improve mucus permeation. *Int J Pharm* 500, 236–244.
- Perrais, M., Pigny, P., Copin, M.-C., Aubert, J.-P., and Van Seuningen, I. (2002). Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the Epidermal Growth Factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* 277, 32258–32267.
- Pichon, C., LeCam, E., Guérin, B., Coulaud, D., Delain, E., and Midoux, P. (2002). Poly[Lys-(AEDTP)]: a cationic polymer that allows dissociation of pDNA/cationic polymer complexes in a reductive medium and enhances polyfection. *Bioconjug Chem* 13, 76–82.
- Pierrat, P., Creusat, G., Laverny, G., Pons, F., Zuber, G., and Lebeau, L. (2012). A cationic phospholipid-detergent conjugate as a new efficient carrier for siRNA delivery. *Chem Eur J* 18, 3835–3839.
- Pierrat, P., Kereselidze, D., Wehrung, P., Zuber, G., Pons, F., and Lebeau, L. (2013a). Bioresponsive deciduous-charge amphiphiles for liposomal delivery of DNA and siRNA. *Pharm Res* 30, 1362–1379.
- Pierrat, P., Laverny, G., Creusat, G., Wehrung, P., Strub, J.-M., VanDorsselaer, A., Pons, F., Zuber, G., and Lebeau, L. (2013b). Phospholipid-detergent conjugates as novel tools for siRNA delivery. *Chem Eur J* 19, 2344–2355.
- Pierrat, P., Wang, R., Kereselidze, D., Lux, M., Didier, P., Kichler, A., Pons, F., and Lebeau, L. (2015). Efficient *in vitro* and *in vivo* pulmonary delivery of nucleic acid by carbon dot-based nanocarriers. *Biomaterials* 51, 290–302.
- Pierrat, P., Kereselidze, D., Lux, M., Lebeau, L., and Pons, F. (2016a). Enhanced gene delivery to the lung using biodegradable polyunsaturated cationic phosphatidylcholine-detergent conjugates. *Int J Pharm* 511, 205–218.
- Pierrat, P., Casset, A., Didier, P., Kereselidze, D., Lux, M., Pons, F., and Lebeau, L. (2016b). Cationic DOPC-detergent conjugates for safe and efficient *in vitro* and *in vivo* nucleic acid delivery. *Chembiochem* 17, 1771–1783.
- Pierrat, P., Casset, A., Kereselidze, D., Lux, M., Pons, F., and Lebeau, L. (2016c). DOPC-detergent conjugates: fusogenic carriers for improved *in vitro* and *in vivo* gene delivery. *Macromol Biosci* 16, 984–989.
- Ponti, F., Campolungo, M., Melchiori, C., Bono, N., and Candiani, G. (2021). Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. *Chem Phys Lipids* 235, 105032.
- Potash, A.E., Wallen, T.J., Karp, P.H., Ernst, S., Moninger, T.O., Gansemer, N.D., Stoltz, D.A., Zabner,

- J., and Chang, E.H. (2013). Adenoviral gene transfer corrects the ion transport defect in the sinus epithelia of a porcine CF model. *Mol Ther* 21, 947–953.
- Quagliarini, E., Di Santo, R., Palchetti, S., Ferri, G., Cardarelli, F., Pozzi, D., and Caracciolo, G. (2020). Effect of protein corona on the transfection efficiency of lipid-coated graphene oxide-based cell transfection reagents. *Pharmaceutics* 12, 113.
- Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C.R. (1997). Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275, 810–814.
- Raik, S., Andranovits, S., Petrova, V., Xu, Y., Lam, J., Morris, G., Brodskaja, A., Casettari, L., Kritchenkov, A., and Skorik, Y. (2018). Comparative study of diethylaminoethyl-chitosan and methylglycol-chitosan as potential non-viral vectors for gene therapy. *Polymers* 10, 442.
- Rakhmanova, V.A., McIntosh, T.J., and Macdonald, R.C. (2000). Effects of dioleoylphosphatidylethanolamine on the activity and structure of *O*-alkyl Phosphatidylcholine-DNA transfection complexes. *Cell Mol Biol Lett* 5, 51–65.
- Ramalingam, P., Yoo, S.W., and Ko, Y.T. (2016). Nanodelivery systems based on mucoadhesive polymer coated solid lipid nanoparticles to improve the oral intake of food curcumin. *Food Res Int* 84, 113–119.
- Ramsey, K.A., Rushton, Z.L., and Ehre, C. (2016). Mucin agarose gel electrophoresis: Western Blotting for high-molecular-weight glycoproteins. *J Vis Exp* 54153.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80, 148–158.
- Reid, C.J., Gould, S., and Harris, A. (1997). Developmental Expression of Mucin Genes in the Human Respiratory Tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 592–598.
- Rogers, S., and Pfuderer, P. (1968). Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature* 219, 749–751.
- Rohrer, J., Partenhauser, A., Hauptstein, S., Gallati, C.M., Matuszczak, B., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., and Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucus permeating thiolated self-emulsifying drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 98, 90–97.
- Rose, M.C., and Voynow, J.A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86, 245–278.
- Rosenecker, J., Naundorf, S., Gersting, S.W., Hauck, R.W., Gessner, A., Nicklaus, P., Müller, R.H., and Rudolph, C. (2003). Interaction of bronchoalveolar lavage fluid with polyplexes and lipoplexes: analysing the role of proteins and glycoproteins. *J Gene Med* 5, 49–60.
- Rosenzweig, H.S., Rakhmanova, V.A., McIntosh, T.J., and MacDonald, R.C. (2000). *O* -alkyl dioleoylphosphatidylcholinium compounds: the effect of varying alkyl chain length on their physical properties and *in vitro* DNA transfection activity. *Bioconjug Chem* 11, 306–313.

- Ross, P.C., and Hui, S.W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of *in vitro* lipofection efficiency. *Gene Ther* 6, 651–659.
- Roy, M.G., Livraghi-Butrico, A., Fletcher, A.A., McElwee, M.M., Evans, S.E., Boerner, R.M., Alexander, S.N., Bellinghausen, L.K., Song, A.S., Petrova, Y.M., et al. (2014). Muc5b is required for airway defence. *Nature* 505, 412–416.
- Russell, R.J., and Brightling, C. (2017). Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci* 131, 1723–1735.
- Saltzman, W.M., Radomsky, M.L., Whaley, K.J., and Cone, R.A. (1994). Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys J* 66, 508–515.
- Sanchez-Guzman, D., Boland, S., Brookes, O., Mc Cord, C., Lai Kuen, R., Sirri, V., Baeza Squiban, A., and Devineau, S. (2021). Long-term evolution of the epithelial cell secretome in preclinical 3D models of the human bronchial epithelium. *Sci Rep* 11, 6621.
- Sanders, N., De Smedt, S., Cheng, S., and Demeester, J. (2002a). Pegylated GL67 lipoplexes retain their gene transfection activity after exposure to components of CF mucus. *Gene Ther* 9, 363–371.
- Sanders, N.N., De Smedt, S.C., Van Rompaey, E., Simoens, P., De Baets, F., and Demeester, J. (2000). Cystic fibrosis sputum: a barrier to the transport of nanospheres. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1905–1911.
- Sanders, N.N., Van Rompaey, E., De Smedt, S.C., and Demeester, J. (2001). Structural alterations of gene complexes by cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 486–493.
- Sanders, N.N., Rompaey, E.V., Smedt, S.C.D., and Demeester, J. (2002b). On the transport of lipoplexes through cystic fibrosis sputum. *Pharm Res* 19, 451–456.
- Sanders, N.N., De Smedt, S.C., and Demeester, J. (2003). Mobility and stability of gene complexes in biogels. *J Control Release* 87, 117–129.
- Saxton, M.J., and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 373–399.
- Sbalzarini, I.F., and Koumoutsakos, P. (2005). Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J Struct Biol* 151, 182–195.
- Schneider, C.S., Xu, Q., Boylan, N.J., Chisholm, J., Tang, B.C., Schuster, B.S., Henning, A., Ensign, L.M., Lee, E., Adstamongkonkul, P., et al. (2017). Nanoparticles that do not adhere to mucus provide uniform and long-lasting drug delivery to airways following inhalation. *Sci Adv* 3, e1601556.
- Schömig, V.J., Käs Dorf, B.T., Scholz, C., Bidmon, K., Lieleg, O., and Berensmeier, S. (2016). An optimized purification process for porcine gastric mucin with preservation of its native functional properties. *RSC Adv* 6, 44932–44943.
- Schuster, B.S., Suk, J.S., Woodworth, G.F., and Hanes, J. (2013). Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials* 34, 3439–3446.
- Schuster, B.S., Kim, A.J., Kays, J.C., Kanzawa, M.M., Guggino, W.B., Boyle, M.P., Rowe, S.M.,

- Muzyczka, N., Suk, J.S., and Hanes, J. (2014). Overcoming the cystic fibrosis sputum barrier to leading adeno-associated virus gene therapy vectors. *Mol Ther* 22, 1484–1493.
- Serisier, D.J., Carroll, M.P., Shute, J.K., and Young, S.A. (2009). Macrorheology of cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease & normal sputum. *Respir Res* 10, 63.
- Shahryari, A., Saghaeian Jazi, M., Mohammadi, S., Razavi Nikoo, H., Nazari, Z., Hosseini, E.S., Burtscher, I., Mowla, S.J., and Lickert, H. (2019). Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders. *Front Genet* 10, 868.
- Shan, W., Zhu, X., Tao, W., Cui, Y., Liu, M., Wu, L., Li, L., Zheng, Y., and Huang, Y. (2016). Enhanced oral delivery of protein drugs using zwitterion-functionalized nanoparticles to overcome both the diffusion and absorption barriers. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, 25444–25453.
- Shao, M.X.G., Nakanaga, T., and Nadel, J.A. (2004). Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- α -converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L420-7.
- Shaw, L.R., Irwin, W.J., Grattan, T.J., and Conway, B.R. (2005). The influence of excipients on the diffusion of ibuprofen and paracetamol in gastric mucus. *Int J Pharm* 290, 145–154.
- Sheehan, J.K., Richardson, P.S., Fung, D.C., Howard, M., and Thornton, D.J. (1995). Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 748–756.
- Sheffner, A.L. (1963). The reduction *in vitro* in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, *N*-acetyl-L-cysteine. *Ann N Y Acad Sci* 106, 298–310.
- Shen, B.Q., Finkbeiner, W.E., Wine, J.J., Mrsny, R.J., and Widdicombe, J.H. (1994). Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 266, L493–L501.
- Shen, H., Hu, Y., and Saltzman, W.M. (2006). DNA diffusion in mucus: effect of size, topology of DNAs, and transfection reagents. *Biophys J* 91, 639–644.
- Shteinberg, M., Haq, I.J., Polineni, D., and Davies, J.C. (2021). Cystic fibrosis. *Lancet* 397, 2195–2211.
- da Silva, A.L., Cruz, F.F., Rocco, P.R.M., and Morales, M.M. (2017). New perspectives in nanotherapeutics for chronic respiratory diseases. *Biophys Rev* 9, 793–803.
- Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y., Faerman, A., Shoshani, T., and Barenholz, Y. (2003). The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *J Biol Chem* 278, 39858–39865.
- Simberg, D., Weiss, A., and Barenholz, D.Y. (2005). Reversible mode of binding of serum proteins to DOTAP/cholesterol lipoplexes: a possible explanation for intravenous lipofection efficiency. *Hum Gene Ther* 16, 1087–1096.
- Snouwaert, J.N., Brigman, K.K., Latour, A.M., Malouf, N.N., Boucher, R.C., Smithies, O., and Koller, B.H. (1992). An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 257, 1083–1088.

- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-Guidice, J.-M., and Canivet, L. (2019). Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environ Res* 176, 108538.
- Stentebjerg-Andersen, A., Notlevsen, I.V., Brodin, B., and Nielsen, C.U. (2011). Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: Implications for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances. *Eur J Pharm Biopharm* 78, 19–26.
- Stürmer, R., Müller, S., Hanisch, F.-G., and Hoffmann, W. (2014). Porcine gastric TFF2 is a mucus constituent and differs from pancreatic TFF2. *Cell Physiol Biochem* 33, 895–904.
- Suh, J., Dawson, M., and Hanes, J. (2005). Real-time multiple-particle tracking: applications to drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 63–78.
- Suk, J.S., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Ensign, L.M., Zeitlin, P.L., Boyle, M.P., and Hanes, J. (2009). The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles. *Biomaterials* 30, 2591–2597.
- Suk, J.S., Lai, S.K., Boylan, N.J., Dawson, M.R., Boyle, M.P., and Hanes, J. (2011a). Rapid transport of muco-inert nanoparticles in cystic fibrosis sputum treated with *N*-acetyl cysteine. *Nanomedicine* 6, 365–375.
- Suk, J.S., Boylan, N.J., Trehan, K., Tang, B.C., Schneider, C.S., Lin, J.-M.G., Boyle, M.P., Zeitlin, P.L., Lai, S.K., Cooper, M.J., et al. (2011b). *N*-acetylcysteine enhances cystic fibrosis sputum penetration and airway gene transfer by highly compacted DNA nanoparticles. *Mol Ther* 19, 1981–1989.
- Suk, J.S., Kim, A.J., Trehan, K., Schneider, C.S., Cebotaru, L., Woodward, O.M., Boylan, N.J., Boyle, M.P., Lai, S.K., Guggino, W.B., et al. (2014). Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. *J Control Release* 178, 8–17.
- Tagalakakis, A.D., Munye, M.M., Ivanova, R., Chen, H., Smith, C.M., Aldossary, A.M., Rosa, L.Z., Moulding, D., Barnes, J.L., Kafetzis, K.N., et al. (2018). Effective silencing of ENaC by siRNA delivered with epithelial-targeted nanocomplexes in human cystic fibrosis cells and in mouse lung. *Thorax* 73, 847–856.
- Taherali, F., Varum, F., and Basit, A.W. (2018). A slippery slope: On the origin, role and physiology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 16–33.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Lee, H.-M., Agusti, C., Lausier, J.A., Ueki, I.F., Grattan, K.M., and Nadel, J.A. (1999). Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3081–3086.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Jeong Shim, J., Dao-Pick, T., Ueki, I.F., and Nadel, J.A. (2000). Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 164, 1546–1552.
- Tam, J., Nash, E.F., Ratjen, F., Tullis, E., and Stephenson, A. (2013). Nebulized and oral thiol

- derivatives for pulmonary disease in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD007168.
- Tan, Q., Choi, K.M., Sicard, D., and Tschumperlin, D.J. (2017). Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling. *Biomaterials* *113*, 118–132.
- Tang, B.C., Dawson, M., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Suk, J.S., Yang, M., Zeitlin, P., Boyle, M.P., Fu, J., and Hanes, J. (2009). Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* *106*, 19268–19273.
- Tang, X.X., Ostedgaard, L.S., Hoegger, M.J., Moninger, T.O., Karp, P.H., McMenimen, J.D., Choudhury, B., Varki, A., Stoltz, D.A., and Welsh, M.J. (2016). Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J Clin Invest* *126*, 879–891.
- Tenchov, B.G., Wang, L., Koynova, R., and MacDonald, R.C. (2008). Modulation of a membrane lipid lamellar–nonlamellar phase transition by cationic lipids: A measure for transfection efficiency. *Biochim Biophys Acta* *1778*, 2405–2412.
- Terheggen, H.G., Lowenthal, A., Lavinha, F., Colombo, J.P., and Rogers, S. (1975). Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Z Kinder-Heilk* *119*, 1–3.
- Teubl, B.J., Absenger, M., Fröhlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., and Roblegg, E. (2013). The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal *in vitro* permeability model. *Eur J Pharm Biopharm* *84*, 386–393.
- Thapa, R.K., and Sullivan, M.O. (2018). Gene delivery by peptide-assisted transport. *Curr Opin Biomed Eng* *7*, 71–82.
- Thornton, D.J., and Sheehan, J.K. (2004). From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc* *1*, 54–61.
- Thornton, D.J., Rousseau, K., and McGuckin, M.A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* *70*, 459–486.
- Tomaiuolo, G., Rusciano, G., Caserta, S., Carciati, A., Carnovale, V., Abete, P., Sasso, A., and Guido, S. (2014). A new method to improve the clinical evaluation of cystic fibrosis patients by mucus viscoelastic properties. *PLoS ONE* *9*, e82297.
- Tomkiewicz, R.P., App, E.M., De Sanctis, G.T., Coffiner, M., Maes, P., Rubin, B.K., and King, M. (1995). A comparison of a new mucolytic *N*-acetylcysteine l-lysinate with *N*-acetylcysteine: Airway epithelial function and mucus changes in dog. *Pulm Pharmacol* *8*, 259–265.
- Uchida, S., Itaka, K., Chen, Q., Osada, K., Ishii, T., Shibata, M.-A., Harada-Shiba, M., and Kataoka, K. (2012). PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol Ther* *20*, 1196–1203.
- Ungaro, F., d’Angelo, I., Coletta, C., d’Emmanuele di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Perfetto, B., Tufano, M.A., Miro, A., La Rotonda, M.I., and Quaglia, F. (2012). Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *J Control Release* *157*, 149–159.

- Vermeulen, L.M.P., Brans, T., De Smedt, S.C., Remaut, K., and Braeckmans, K. (2018). Methodologies to investigate intracellular barriers for nucleic acid delivery in non-viral gene therapy. *Nano Today* 21, 74–90.
- Vllasaliu, D., Fowler, R., Garnett, M., Eaton, M., and Stolnik, S. (2011). Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: A comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 579–585.
- Vukosavljevic, B., Murgia, X., Schwarzkopf, K., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., and Windbergs, M. (2017). Tracing molecular and structural changes upon mucolysis with *N*-acetyl cysteine in human airway mucus. *Int J Pharm* 533, 373–376.
- Wagner, J.A., Messner, A.H., Moran, M.L., Daifuku, R., Kouyama, K., Desch, J.K., Manley, S., Norbash, A.M., Conrad, C.K., Friborg, S., et al. (1999). Safety and biological efficacy of an Adeno-Associated Virus Vector-Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *Laryngoscope* 109, 266–274.
- Wagner, T., Kroll, A., Haramagatti, C.R., Lipinski, H.-G., and Wiemann, M. (2017). Classification and segmentation of nanoparticle diffusion trajectories in cellular micro environments. *PLoS ONE* 12, e0170165.
- Wahane, A., Waghmode, A., Kapphahn, A., Dhuri, K., Gupta, A., and Bahal, R. (2020). Role of lipid-based and polymer-based non-viral vectors in nucleic acid delivery for next-generation gene therapy. *Molecules* 25, 2866.
- Wang, L., Koynova, R., Parikh, H., and MacDonald, R.C. (2006). Transfection activity of binary mixtures of cationic *O*-substituted phosphatidylcholine derivatives: the hydrophobic core strongly modulates physical properties and DNA delivery efficacy. *Biophys J* 91, 3692–3706.
- Wang, Y.-Y., Lai, S.K., Suk, J.S., Pace, A., Cone, R., and Hanes, J. (2008). Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that “slip” through the human mucus barrier. *Angew Chem Int Ed* 47, 9726–9729.
- Wang, Y.-Y., Lai, S.K., Ensign, L.M., Zhong, W., Cone, R., and Hanes, J. (2013). The microstructure and bulk rheology of human cervicovaginal mucus are remarkably resistant to changes in pH. *Biomacromolecules* 14, 4429–4435.
- Weiss, M., Fan, J., Claudel, M., Sonntag, T., Didier, P., Ronzani, C., Lebeau, L., and Pons, F. (2021). Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential. *J Nanobiotechnology* 19, 5.
- Weiszhar, Z., and Horvath, I. (2013). Induced sputum analysis: step by step. *Breathe* 9, 300–306.
- Welsh, K.G., Rousseau, K., Fisher, G., Bonser, L.R., Bradding, P., Brightling, C.E., Thornton, D.J., and Gaillard, E.A. (2017). MUC5AC and a glycosylated variant of MUC5B alter mucin composition in children with acute asthma. *Chest* 152, 771–779.
- Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., Arron, J.R., Koth, L.L., and Fahy, J.V. (2009). T-helper type 2–driven inflammation defines major subphenotypes of

- asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 388–395.
- Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1987). Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262, 4429–4432.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, G., Jia, Y., Yang, J., Shi, J., Dong, J., Wei, J., and Liu, X. (2018a). Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. *Braz J Med Biol Res* 51, e6950.
- Wu, L., Shan, W., Zhang, Z., and Huang, Y. (2018b). Engineering nanomaterials to overcome the mucosal barrier by modulating surface properties. *Adv Drug Deliv Rev* 124, 150–163.
- Xie, Y., Kim, N.H., Nadithe, V., Schalk, D., Thakur, A., Kılıç, A., Lum, L.G., Bassett, D.J.P., and Merkel, O.M. (2016). Targeted delivery of siRNA to activated T cells via transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma. *J Control Release* 229, 120–129.
- Xie, Y., Ostedgaard, L., Abou Alaiwa, M.H., Lu, L., Fischer, A.J., and Stoltz, D.A. (2018). Mucociliary transport in healthy and cystic fibrosis pig airways. *Ann Am Thorac Soc* 15, S171–S176.
- Xu, Y., and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35, 5616–5623.
- Xu, Q., Ensign, L.M., Boylan, N.J., Schön, A., Gong, X., Yang, J.-C., Lamb, N.W., Cai, S., Yu, T., Freire, E., et al. (2015). Impact of surface Polyethylene Glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus *ex vivo* and distribution *in vivo*. *ACS Nano* 9, 9217–9227.
- Yang, M., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Zhong, W., Happe, C., Zhang, M., Fu, J., and Hanes, J. (2011a). Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus. *Angew Chem Int Ed* 50, 2597–2600.
- Yang, Y., Tsifansky, M.D., Wu, C.-J., Yang, H.I., Schmidt, G., and Yeo, Y. (2010). Inhalable antibiotic delivery using a dry powder co-delivering recombinant deoxyribonuclease and ciprofloxacin for treatment of cystic fibrosis. *Pharm Res* 27, 151–160.
- Yang, Y., Tsifansky, M.D., Shin, S., Lin, Q., and Yeo, Y. (2011b). Mannitol-guided delivery of ciprofloxacin in artificial cystic fibrosis mucus model. *Biotechnol Bioeng* 108, 1441–1449.
- Yang, Z., Duan, J., Wang, J., Liu, Q., Shang, R., Yang, X., Lu, P., Xia, C., Wang, L., and Dou, K. (2018). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with polyethylenimine and galactose for siRNA targeted delivery in hepatocellular carcinoma therapy. *Int J Nanomedicine* 13, 1851–1865.
- Yhee, J., Im, J., and Nho, R. (2016). Advanced therapeutic strategies for chronic lung disease using nanoparticle-based drug delivery. *J Clin Med* 5, 82.
- Youn, H., and Chung, J.-K. (2015). Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin Biol Ther* 15, 1337–1348.
- Yuan, S., Hollinger, M., Lachowicz-Scroggins, M.E., Kerr, S.C., Dunican, E.M., Daniel, B.M., Ghosh, S., Erzurum, S.C., Willard, B., Hazen, S.L., et al. (2015). Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels. *Sci Transl Med* 7, 276ra27.

- Zabner, J., Couture, L.A., Gregory, R.J., Graham, S.M., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75, 207–216.
- Zabner, J., Cheng, S.H., Meeker, D., Launspach, J., Balfour, R., Perricone, M.A., Morris, J.E., Marshall, J., Fasbender, A., Smith, A.E., et al. (1997). Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia *in vivo*. *J Clin Invest* 100, 1529–1537.
- Zeng, F., and Harris, R.C. (2014). Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 28, 2–11.
- Zhang, L., Button, B., Gabriel, S.E., Burkett, S., Yan, Y., Skiadopoulos, M.H., Dang, Y.L., Vogel, L.N., McKay, T., Mengos, A., et al. (2009). CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol* 7, e1000155.
- Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P.W., Abraham, N.G., Kappas, A., and Lee, P.J. (2004). Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 279, 10677–10684.
- Zhang, Y., Wu, X., Meng, L., Zhang, Y., Ai, R., Qi, N., He, H., Xu, H., and Tang, X. (2012). Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm* 436, 341–350.
- Zhang, Y., Lin, X., Du, X., Geng, S., Li, H., Sun, H., Tang, X., and Xiao, W. (2015). pH-sensitive thiolated nanoparticles facilitate the oral delivery of insulin *in vitro* and *in vivo*. *J Nanopart Res* 17, 103.
- Zhong, W., Zhang, X., Zeng, Y., Lin, D., and Wu, J. (2021). Recent applications and strategies in nanotechnology for lung diseases. *Nano Res* 14, 2067–2089.
- Zhou, T., Kim, Y., and MacLeod, A.R. (2016). Targeting long noncoding RNA with antisense oligonucleotide technology as cancer therapeutics. *Methods Mol Biol* 1402, 199–213.
- Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., Niu, B., Wu, B., Huang, Y., Pan, X., and Wu, C. (2018). Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharm Sin B* 8, 165–177.
- Ziello, J.E., Huang, Y., and Jovin, I.S. (2010). Cellular endocytosis and gene delivery. *Mol Med* 16, 222–229.

Développement de lipides mucolytiques pour la thérapie génique par voie pulmonaire

Résumé en français

Un défi majeur posé aux vecteurs d'acides nucléiques dans le poumon est de traverser le mucus, afin d'accéder aux cellules devant être transfectées. Dans cette problématique, nous avons cherché à développer des vecteurs mucolytiques, *i.e.* capables de déstructurer localement les ponts disulfures des mucines, pour une meilleure diffusion à travers le mucus, et donc une meilleure efficacité de transfection. Des modèles cellulaires producteurs de mucus ont été mis en place pour une évaluation pertinente de ces vecteurs. Les premiers vecteurs mucolytiques évalués étaient des lipides cationiques monosoufrés, pour lesquels ni activité mucolytique ni bénéfice en termes de transfection n'ont pu être mis en évidence. Dans une deuxième stratégie, des lipides cationiques ont été associés à des lipides *helper* polysoufrés à plus haut potentiel mucolytique. Ces nouvelles formulations possédaient une activité mucolytique, diffusaient plus rapidement et plus profondément dans le mucus, et avaient une efficacité de transfection augmentée. Ce travail est le premier à introduire le concept de vecteurs d'acide nucléique à activité mucolytique intrinsèque capables de déstructurer localement le mucus, et suggère que cette stratégie est encourageante, en particulier au regard de l'utilisation d'agents mucolytiques tels que la *N*-acétylcystéine ayant une action généralisée sur le mucus.

Mots clés : Thérapie génique ; poumon ; mucus ; vecteur mucolytique ; modèles cellulaires ; rhéologie ; multiple particle tracking

Résumé en anglais

A major challenge for nucleic acid carriers in the lung is to cross the mucus to reach the epithelial cells in order to transfect them. In this issue, we sought to develop mucolytic carriers, *i.e.* able to open the mesh structure of the mucus by breaking the disulfide bridges of the mucins, to improve their diffusion through the mucus, and thus increase their transfection efficiency. Mucus-producing cellular models were set up for a relevant evaluation of those carriers. The first mucolytic carriers to be evaluated were monothiolated cationic lipids, for which no mucolytic activity nor gain in transfection activity could be highlighted. In a second strategy, cationic lipids were associated to polythiolated helper lipids with higher mucolytic potential. Those new formulations held a mucolytic activity, diffused faster and deeper in the mucus, and had an increased transfection efficiency. This work is the first to introduce the concept of gene carrier with an intrinsic mucolytic activity able to break down the mucus locally, and suggest that this strategy is promising, in particular compared to the use of mucolytic agents such as *N*-acetylcysteine having a generalized action on the mucus.

Keywords: Gene therapy; lung; mucus; mucolytic carrier; cellular models; rheology; multiple particle tracking