



**HAL**  
open science

# Développement de nouveaux nanovecteurs pour les thérapies anti-HCV/HCC

Roxane Alles

► **To cite this version:**

Roxane Alles. Développement de nouveaux nanovecteurs pour les thérapies anti-HCV/HCC. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ052 . tel-00998936

**HAL Id: tel-00998936**

**<https://theses.hal.science/tel-00998936v1>**

Submitted on 3 Jun 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**U1121 ET U1110**

**THÈSE** présentée par :  
**Roxane SAAD (ALLES)**

soutenue le **27 novembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**  
Discipline/Spécialité : **Aspects Moléculaires Et Cellulaires De La Biologie**  
Option **Biologie Cellulaire Et Virologie**

**Développement de nouveaux nanovecteurs  
pour les thérapies anti-HCV/HCC**

**THÈSE dirigée par :**

**Pr. Joëlle Ogier** PU-PH, Université de Strasbourg  
**Pr. Thomas F. Baumert** PU-PH, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. Sylvie Bégu** MCU, HDR, Université de Montpellier 1  
**Pr. Philippe Barthélémy** PU, HDR, Université Bordeaux Segalen

**EXAMINATRICE :**

**Dr Béatrice Heurtault** MCU, HDR, Université de Strasbourg

---

**SUPERVISEUR :**

**Pr Florent Meyer** PU-PH, HDR, Université de Strasbourg



Tomber sept fois, se relever huit (Proverbe japonais)

# Remerciements

---

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres de mon jury de thèse, qui me font l'honneur de juger mon travail. Merci au Docteur Sylvie Bégu et au Professeur Philippe Barthélémy d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci également au Docteur Béatrice Heurtault, qui a déjà suivi mon travail lors de ma présentation de mi-parcours, et qui a accepté à nouveau d'examiner de mon travail.

Pendant les trois années qu'a duré mon doctorat, j'ai été accueillie dans deux laboratoires. Merci au Professeur Thomas Baumert, directeur de l'unité INSERM UMR 1110 de m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais également de m'avoir choisie comme doctorante. Merci au Professeur Joëlle Ogier, appartenant à l'unité INSERM UMR 1121, d'avoir accepté d'être ma co-directrice de thèse. Je tiens également à remercier les directeurs successifs de l'unité INSERM UMR 1121, le Docteur Jean-Claude Voegel, puis le Professeur Pierre Schaaf, de m'avoir donné une place dans leurs équipes, ainsi que le Professeur Florent Meyer. Merci pour ton suivi et ton encadrement tout au long de ces trois ans.

Merci aux membres de l'U1121 pour votre aide et vos discussions : merci à Christine, Damien, pour vos conseils techniques et votre aide. Merci aux anciens et nouveaux doctorants et membres de l'unité avec qui j'ai eu l'occasion de discuter avec plaisir, même si le temps passé au sein de cette unité a été relativement court au final...: Morgane, Florence, Mathilde, Christophe, Julien, Christian, Christiane, Vincent, Géraldine, Armelle, Florian, Hayriye, Philippe, Dominique, Fabienne, Bernard, Engin...

Merci aux membres de l'U1110, avec qui j'ai eu l'occasion de passer davantage de temps. Merci pour votre soutien, votre aide à tous moments. Merci pour les mots fléchés du midi, les discussions en 309 ou dans les couloirs ! Merci à Laetitia, Alizé, Isabel, Marine, Marina, Laura, Sarah, Charlotte, Mathieu, Emilie, Lamine, Rajeev, Dan, Nauman, Catherine F., Joachim, Mirjam, Fei, Bin, Tao,... Merci à l'équipe technique et administrative... On ne serait rien sans votre travail efficace : merci Dominique, Sigis, Jérémy, Patricia, Nicolas, Richard, Catherine C., et Anne ! Merci Catherine S., Christine, Eric, Mirjam, d'avoir fait le relai entre les deux unités, et de m'avoir aidé lorsque cela était nécessaire ! Merci pour vos conseils et votre encadrement... Merci également à Halima, que j'ai croisé un certain nombre de fois... Vous veniez travailler et je repartais... Merci pour vos discussions, ca a toujours été un plaisir !

Merci également à l'équipe d'enseignement d'immuno... Ca a été un vrai plaisir de travailler à vos côtés ! Merci Sylvie et Fred de m'avoir accueillie ! Merci à mes collègues, Paul, Julie, Samuel, Benjamin, Hélène, j'ai eu plaisir à partager les salles de TP avec vous !

Merci à tous ceux que j'ai pu oublier de citer, et que j'ai eu l'occasion de croiser au cours de ces trois ans !

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu pendant ces trois années, qu'ils aient été près ou loin, mais toujours présents pour un petit mot d'encouragement, pour me remonter le moral, ou pour comparer nos galères ! Merci à mes témoins, Céline et Yara, merci Marine, merci Ayman et Marina, George, Jess, Manu, Siham, et Rafael, merci pour nos discussions au milieu de la nuit pendant ma rédaction ^^ ! Merci également Francis et Michel, pour cette très agréable parenthèse musicale, qui m'a fait beaucoup de bien, même si elle ne fut qu'Ephémère ;-) )

Un énorme Merci à mes parents et mon frère, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long du chemin. Merci pour votre amour et votre confiance en moi, et merci d'avoir cru en moi ! Merci également à mes grands-parents... Cette période a marqué la fin d'une génération, puisque trois d'entre vous ont disparu en un peu plus d'un an... Merci à vous, Pierre, Christiane, et Thérèse, et à toi Gilbert, qui nous a quitté il y a longtemps déjà... Sans vous, je ne serai pas là ! Merci à toi, Christian, également... Tu es le premier qui m'a donné envie de faire de la recherche, et à m'avoir accueillie dans ton laboratoire... Les meilleurs stages que j'ai faits !

Enfin, merci à toi mon amour, mon mari... Tu as été là tout le long du parcours, m'encourageant, me poussant, me consolant, t'énervant à ma place quand tu me trouvais trop peu réactive ;-) ! Je n'aurais pas tenu jusqu'au bout sans toi. Tu es LE vrai chercheur pour moi, un modèle que j'admire...

# Table des matières

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>I. ARN INTERFERENCE</b>	<b>11</b>
1. Découverte de l'ARN interférence	11
2. Mécanisme de l'ARN interférence	13
3. Potentiel de l'ARN interférence	15
4. Quelles différences entre siRNA, shRNA ? Que choisir ?	16
5. Limites et défi des siRNA thérapeutiques	18
6. Modifications chimiques : amélioration de la stabilité et de la circulation des siRNA	25
7. Transport des siRNA	28
<b>II. VECTORISATION DES siRNA</b>	<b>29</b>
1. Administration des siRNA	29
2. Entrée des particules dans les cellules	30
3. Quels sont les paramètres importants à prendre en compte lors du choix du vecteur ?	32
4. Fonctionnalisation	35
5. Différents types de vecteurs : avantages et inconvénients	39
6. Un vecteur de choix : les nanoparticules de phosphate de calcium enrobées	48
<b>III. MODELES UTILISES</b>	<b>49</b>
1. Modèle d'infection in vitro : virus de l'hépatite C	49
2. Carcinome hépatocellulaire (HCC) et autres tumeurs	66
<b>OBJECTIFS</b>	<b>71</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>73</b>
<b>I. MATÉRIEL</b>	<b>73</b>
1. Polyéthylèneimine (PEI)	73
2. siRNA	75
3. Plasmides	75

4. Lignées cellulaires	76
<b>II. METHODES</b>	<b>78</b>
1. Préparation des nanoparticules	78
2. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	81
3. Evaluation de la cytotoxicité des CPnp	85
4. Préparation des particules virales HCVcc	86
5. Expérimentations <i>in vitro</i> « classiques »	88
6. Techniques d'analyse	90
7. Expérimentation <i>in vitro</i> en 3D et analyse	96
8. Expérimentation <i>in vivo</i>	96
<b>RESULTATS</b>	<b>99</b>
<b>I. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE PHOSPHATE DE CALCIUM DE FORMULATION CPNP(SIRNA/PEIY)<sub>2</sub></b>	<b>99</b>
1. Production et caractérisation des CPnp (siRNA/PEIY) <sub>2</sub>	99
2. Efficacité d'interférence ARN <i>in vitro</i>	100
3. Efficacité d'interférence ARN <i>in vivo</i>	101
4. Biodistribution <i>in vivo</i>	102
5. Conclusion	103
<b>II. PREUVE DE CONCEPT : EVALUATION DE LA FORMULATION CPNP(PEIPYR/SIRNA)<sub>2,5</sub> SUR DES MODELES D'HEPATITE C</b>	<b>104</b>
1. Construction et caractérisation des CPnp(PEIPyr/siRNA) <sub>2,5</sub>	106
2. Entrée cellulaire, et libération des siRNA	109
3. Toxicité des CPnp	112
4. Inhibition de l'infection par le HCV par les CPnp : Preuve de concept	113
5. Inhibition de l'expression protéique de facteurs hôtes et de l'infection virale associée	116
<b>III. PREUVE DE CONCEPT : CPNP(PEIPYR/SIRNA)<sub>2,5</sub> ET MODELES TUMORAUX</b>	<b>119</b>
1. CPnp et expression génique <i>in vitro</i> en culture cellulaire bidimensionnelle	121
2. Inhibition de la croissance cellulaire par l'interférence ARN	126
3. Evaluations préliminaires des CPnp(PEIPyr/siRNA) <sub>2,5</sub> <i>in vivo</i>	136
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>147</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>165</b>

# Table des illustrations

---

## **INTRODUCTION**

---

Illustration I-1 : Modèle possible d'interférence génétique médiée par dsRNA chez <i>c. elegans</i> .....	12
Illustration I-2 : Voies des ARN interférents.....	14
Illustration I-3 : siRNA et immunité .....	19
Illustration I-4 : Modifications chimiques des siRNA.....	26
Illustration II-1 : Représentation de l'entrée des nanoparticules dans les cellules non-phagocytes.....	30
Illustration II-2 : Impact de la géométrie des particules sur le ratio surface/volume. ....	34
Illustration II-3 : Différents types de vecteurs de siRNA.....	39
Illustration III-1 : Diagramme de l'évolution de l'hépatite C. ....	50
Illustration III-2 : Représentation schématique de la particule du HCV.....	52
Illustration III-3 : Organisation génétique et protéines du HCV. ....	53
Illustration III-4 : Cycle viral du HCV. ....	57
Illustration III-5 : Modifications anatomiques et cellulaires conduisant au HCC. ....	67
Illustration III-6 : Production de sphéroïdes. ....	69

## **MATERIEL ET METHODES**

---

Illustration I-1 : Structure du PEI Tyrosine (A) et du PEI Tyrosine-Galactose (B).....	73
Illustration I-2 : Structure du PEI Pyridine .....	73
Illustration II-1 : Représentation schématique de la production et enrobage des CPnp.....	78
Illustration II-2 : Structure du vert d'indocyanine.....	79
Illustration II-3 : Structure de l'alizarine complexone .....	79
Illustration II-4 : Microscopie électronique en transmission.....	83
Illustration II-5 : Microscope confocal.....	84
Illustration II-6 : Modèles d'infection virale et de transfection en pré- et en post-infection. ....	89
Illustration II-7 : qRT-PCR. ....	92
Illustration II-8 : Cytométrie en flux.....	94
Illustration II-1 : Représentation schématique du modèle de pré-infection. ....	113
Illustration II-2 : Représentation schématique du modèle de post-infection. ....	114

# ABRÉVIATIONS

apoE, apoB : apolipoprotéine E ou B  
 auNP : *gold nanoparticles*, nanoparticules d'or  
 bp : *base pair*, paires de bases  
 BET : bromure d'éthidium  
 BLI : bioluminescence  
 BRG : Balb/c Rag2<sup>-/-</sup> γC<sup>-/-</sup>  
 BSA : *Bovine serum albumine*, albumine sérique bovine  
 CHS : chalcone synthase  
 CLD : *chronic liver diseases*, maladies hépatiques chroniques  
 CLDN1 : claudine-1  
 CMV : cytomégalovirus  
 CNT : *carbon nanotubes*, nanotubes de carbone  
 CPnp : *Calcium phosphate nanoparticle*, nanoparticules de phosphate de calcium  
 CPP : *cell-penetrating peptide*, peptide pénétrant les cellules  
 CSC : cellules souches cancéreuses  
 CT : *computerized tomography*, tomographie calculée  
 CypA : cyclophiline A  
 DAA : *direct acting antiviral*, substances antivirales directes  
 DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
 DLS : *Dynamic light scattering*, Granulomètre à diffusion en dynamique de la lumière  
 DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, milieu de Eagle modifié par Dulbecco  
 DMSO : Diméthylsulfoxyde  
 dsRNA : *double stranded RNA*, ARN double brin  
 EEA1 : *early endosome antigen 1*, antigène 1 des endosomes précoces  
 EGFR : *epidermal growth factor receptor*, récepteur du facteur de croissance épidermique  
 EMC : *extra-cellular matrix*, matrice extracellulaire  
 EMSA : *electromobility shift assay*, expérience de gel retard par électromobilité  
 EphA2 : récepteur A2 de l'ephrine  
 EPR : *enhanced permeability and retention*, perméabilité et rétention augmentées  
 FCS : *Fetal Calf Serum*, Sérum de veau foetal  
 GAG : glycosaminoglycanes  
 GFP : *green fluorescent protein*, protéine verte fluorescente  
 HBV : *hepatitis B virus*, virus de l'hépatite B  
 HCC : *hepatocellular carcinoma*, carcinome hépatocellulaire  
 HCV : *hepatitis C virus*, virus de l'hépatite C  
 HCVcc : particules recombinantes du HCV adaptées en culture cellulaire  
 HCVpp : pseudoparticules du HCV  
 HDL : *high density lipoproteins*, lipoprotéines de haute densité  
 HIV : *human immunodeficiency virus*, virus de l'immunodéficience humaine  
 HS : héparanes sulfates  
 HSC : *hematopoietic stem cells*, cellules souches hématopoiétiques  
 HTA : *host targeting agents*, agents ciblant l'hôte  
 i.p. : intra-péritonéal  
 i.v. : intraveineux  
 ICG : *indocyanine green*, vert d'indocyanine  
 IFN $\alpha$  : interféron alpha  
 IFN $\beta$  : interféron bêta  
 IFN $\gamma$  : interféron gamma  
 IL-2R $\gamma$  : *γ-chain of the receptor for IL-2*, chaîne gamma du récepteur à l'IL-2  
 IL6 : interleukine 6  
 IL12 : interleukine 12  
 IRES : *internal ribosome entry site*, site d'entrée interne du ribosome  
 IRF3, IRF5, IRF7 : *IFN regulatory factor 3,5 and 7*, facteurs régulateurs de l'Ifn 3, 5 et 7  
 IRM : imagerie de résonance magnétique  
 LDL : *low density lipoproteins*, lipoprotéines de faible densité  
 LDLR : *low density lipoproteins receptor*, récepteur des lipoprotéines de faible densité  
 LNA : *locked nucleic acid*, acide nucléique verrouillé  
 LPS : lipopolysaccharide

LSPR : *localized surface plasmon resonance*, résonance plasmonique de surface localisée  
 MAP3K : MAPK kinase kinases  
 MAPK : *mitogen-activated protein kinase*, kinase activée par les mitogènes  
 MEM : *Minimum Essential Medium*, milieu minimum essentiel  
 miRNA : microRNA  
 MLV : *murine leukemia virus*, virus de la leucémie murine  
 mRNA : *messenger RNA*, ARN messager  
 MSN : *mesoporous silica nanoparticles*, nanoparticules de silice mésoporeuse  
 MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium  
 nAb : *neutralizing antibodies*, anticorps neutralisants  
 NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor  $\kappa$ B*, facteur nucléaire de  
 NS : *non-structural protein*, protéine non-structurale  
 NTBC : 2-(2-nitro-4-trifluoro-méthylbenzoyl)-1.3-cyclohexanedione  
 OCLN : occludine  
 PBS : *Phosphate buffered saline*, tampon phosphate salin  
 PE : phycoerythrine  
 PEG : polyéthylène glycol  
 PEI: poly(éthylène imine)  
 PEIPyr : PEI-Pyridine  
 PEIY : PEI-Tyrosine  
 PET : *positron emission tomography*, tomographie à émission de positrons  
 PFA : Paraformaldéhyde  
 PHH : *primary human hepatocytes*, hépatocytes primaires humains  
 PI4KIII $\alpha$  : phosphatidylinositol 4-kinase III alpha  
 polyHEMA : polyhydroxyéthylméthacrylate  
 qRT-PCR : *quantitative real time polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel  
 Rag2 : *recombination activating gene 2*, gène d'activation de la recombinaison 2  
 Ras : *rat sarcoma*  
 RdRp : *RNA dependant RNA polymerase*, polymérase à ARN dépendante de l'ARN  
 RE : réticulum endoplasmique  
 REG : réticulum endoplasmique granuleux  
 RES : système réticulo-endothélial  
 RFP : *red fluorescent protein*, protéine fluorescente rouge  
 RISC : *RNA-induced silencing complex*, complexe d'interférence ARN induit par l'ARN  
 RLU : *Relative Luminescence unit*, unité relative de luminescence  
 RNAi : ARN interférence  
 RPMI 1640 : *Roswell Parc Memorial Institute*  
 RTK : récepteurs à tyrosine kinase  
 s.c. : sous-cutané  
 SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*, Immunodéficienc e combinée sévère  
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
 sE1/sE2 : forme soluble de E1 et E2  
 shRNA : *short hairpin RNA*, petit ARN en structure tige-boucle  
 siRNA : *short interfering RNA*, petit ARN interférant  
 SOC : *Standard of care*, traitement courant  
 SPECT : *single-photon emission computerized tomography*  
 SPIO : *supramagnetic iron particles*, particules de fer supramagnétiques  
 SR-BI : récepteur scavenger de classe B de type I  
 ssRNA : *single stranded RNA*, ARN simple brin  
 SV40 : *simian virus 40*, virus simien 40  
 SVR : *sustained virological response*, réponse virologique soutenue  
 TAF : *tumor associated fibroblasts*, fibroblastes associés aux tumeurs  
 TCID<sub>50</sub> : *50 % tissue culture infective dose*, dose permettant d'infecter 50 % de la culture tissulaire  
 TEM : *transmission electronic microscopy*, microscopie à transmission électronique  
 TGF $\beta$  : *Transforming growth factor  $\beta$* , facteur de croissance transformant  $\beta$   
 TLR : *Toll like receptor*  
 TNF $\alpha$  : *tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumoral  
 uPA : urokinase plasminogène  
 UTR : *untranslated regions*, régions non traduites  
 VEGF : *vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
 VLDL : *very low density lipoproteins*, lipoprotéines de très faible densité  
 VLP : *virus-like particles*

# Introduction

---

Malgré des avancées impressionnantes ces dernières années en médecine, et de nouvelles thérapies de plus en plus poussées, de nombreux progrès sont encore nécessaires. En virologie, par exemple, de nombreuses infections virales restent encore sans traitement efficace, et les traitements existants présentent d'importants effets secondaires et contre-indications. De plus, ceux-ci ne permettent généralement que de maintenir l'infection à un niveau basal, sans pour autant pouvoir éradiquer le virus. De même, en cancérologie, les traitements possibles, bien que très efficaces, sont peu nombreux, limités à la chimiothérapie, la radiothérapie, ou la chirurgie. La majorité de ces techniques ne sont pas ciblées, et résultent en des effets secondaires importants sur les tissus sains et l'organisme des patients.

En réponse à cette demande d'alternatives thérapeutiques, différents systèmes d'acheminement de molécules se sont développés. Un panel croissant de nanoparticules sont en cours d'étude, produits à partir de matériaux aussi divers que les lipides, les métaux, ou les polymères, présentant tous des avantages et des inconvénients. L'essor de ces vecteurs nanométriques a également redonné un second souffle à un outil thérapeutique des plus intéressants : l'ARN interférence. En effet, malgré des résultats expérimentaux impressionnants, l'utilisation de cette technique est fortement limitée par la fragilité des molécules thérapeutiques, les siRNA, et par leur faible rémanence. L'utilisation des nanovecteurs permet de protéger les siRNA, et de les libérer de façon progressive, entraînant une augmentation de la rémanence d'action de ceux-ci. La combinaison de ces deux outils laisse entrevoir de nombreuses perspectives thérapeutiques, et la suppression des écueils ayant empêché l'emploi de l'ARN interférence jusqu'à présent.

Au cours des prochaines pages, nous évoquerons, les domaines des nanoparticules et de l'interférence ARN. Ceux-ci présentent de nombreuses applications thérapeutiques potentielles, illustrées dans ce travail par le développement de nanovecteurs d'ARN interférents à visées antivirale (virus de l'hépatite C) et anti-tumorale (carcinome hépatocellulaire). Ces cas pratiques seront l'occasion pour nous de tester l'impact de l'outil thérapeutique que nous avons choisi de développer. Celui-ci, associant nanoparticules et ARN interférence, promet, comme le montrent les résultats obtenus, d'avoir un impact non négligeable dans un certain nombre de domaines médicaux.

## I. ARN interférence

### 1. Découverte de l'ARN interférence

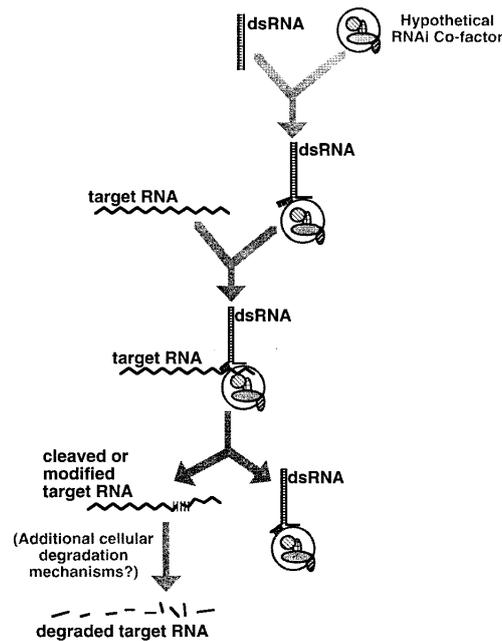
L'ARN interférence (RNAi) a été découverte et décrite pour la première fois en 1990, par Napoli, Lemieux, et Jorgensen<sup>1</sup>. Lors de l'étude de l'implication de la chalcone synthase (CHS) dans la biosynthèse de l'anthocyanine (qui donne sa couleur aux pétunias), ils ont surexprimé cette enzyme dans les fleurs grâce à l'introduction d'un transgène codant une CHS exogène. Le résultat surprenant de cette expérience – 42 % des pétunias ont blanchi, et la concentration de CHS totale 50 fois inférieure à la concentration sauvage – leur a permis d'envisager que le transgène puisse être un co-suppresseur du gène endogène. Le même phénomène a été observé par Romano et Macino en 1992 chez *Neurospora crassa*<sup>2</sup>.

En 1993, Lee *et al.* progressent vers la compréhension de ce mécanisme. En effet, ils montrent que *LIN-4*, un petit ARN de *C. elegans*, participe au bon développement du nématode en se fixant à un ARN messager (mRNA) cible, ce qui empêche alors sa traduction<sup>3</sup>. A la fin des années 1990, Fire, Mello *et al.* vont pour la première fois expliquer l'atténuation de gènes, en émettant l'hypothèse que le mécanisme observé n'est pas basé sur un ARN simple brin (ssRNA), mais sur un double brin d'ARN (dsRNA). Pour vérifier cette hypothèse, ils ont comparé l'effet de ssRNA et de dsRNA sur l'expression du gène *unc-22* chez *C. elegans*<sup>4,5</sup>. Que les ssRNA soient sens ou antisens, leurs effets étaient entre 10 et 100 fois plus faibles que ceux du dsRNA correspondant. De manière intéressante, l'injection de ssRNA sens, puis antisens, ou inversement, permettait de restaurer l'efficacité d'atténuation du gène, ce qui a permis de suggérer que les deux types de ssRNA peuvent s'hybrider *in vivo* afin de former le dsRNA. Les travaux de Fire et Mello ont été récompensés en 2006 par le Prix Nobel de Physiologie et Médecine « pour leur découverte de l'ARN interférence – *gene silencing* par ARN double brin ».

Au cours des deux années qui ont suivi, plusieurs équipes ont cherché et constaté la présence d'intermédiaires ARN dans le mécanisme<sup>6</sup>. En effet, des molécules de 21 à 25 nucléotides, les petits ARN interférents ("*small interfering RNA*" ou siRNA), complémentaires du mRNA cible, ont été isolés. Il a été montré que l'association mRNA/siRNA entraîne la dégradation du transcrite correspondant.

En 2000 et 2001, les équipes de Pasquinelli et Elbashir ont montré que, non seulement les siRNA et miRNA ne sont pas une exclusivité de *C. elegans*, puisque des siRNA ont également été retrouvés chez les champignons, plantes, et insectes<sup>7</sup>, mais que ce mécanisme RNAi est aussi présent chez les vertébrés<sup>8</sup>. Cela semblait de prime abord peu plausible, l'immunité innée de ceux-ci, et notamment des mammifères, engendrant une réponse antivirale interféron

importante lors de l'introduction d'ARN dans les cellules. L'ARNi est donc un système très ancien, dont la mise en place remonte à une période de l'évolution précédant la séparation des animaux des végétaux. Les travaux de Elbashir ont également montré qu'il était possible d'utiliser des siRNA synthétisés chimiquement et imitant les siRNA natifs pour inhiber la traduction de mRNA cibles dans les cellules transfectées. A partir de ce point, l'interférence ARN est devenue une technique de choix, notamment pour les études de génomique fonctionnelle.



**Illustration I-1 : Modèle possible d'interférence génétique médiée par dsRNA chez *c. elegans*.**  
(Source : Montgomery *et al.*, 1998<sup>5</sup>)

L'interférence ARN a notamment été longuement étudiée chez la drosophile. Cela a permis la découverte d'un ensemble protéique complexe entrant en jeu lors de la division du double brin de l'ARN interférant. Ce complexe a été nommé "*RNA-Induced Silencing Complex*", ou RISC<sup>9</sup>. L'endoribonucléase Dicer, quant à elle, a été décrite par l'équipe de Bernstein en 2001<sup>10</sup>.

## 2. Mécanisme de l'ARN interférence

Le mécanisme d'interférence ARN est déclenché lorsqu'un dsRNA exogène est introduit dans le cytoplasme de la cellule. Suite à cela, une endonucléase de la famille des RNaseIII, appelée Dicer, identifie le dsRNA et le clive en fragments doubles brins de 21 à 23 paires de bases, avec un groupe monophosphate en 5' et un dinucléotide sortant en 3'<sup>8</sup>. Ce duplexe RNA est appelé siRNA.

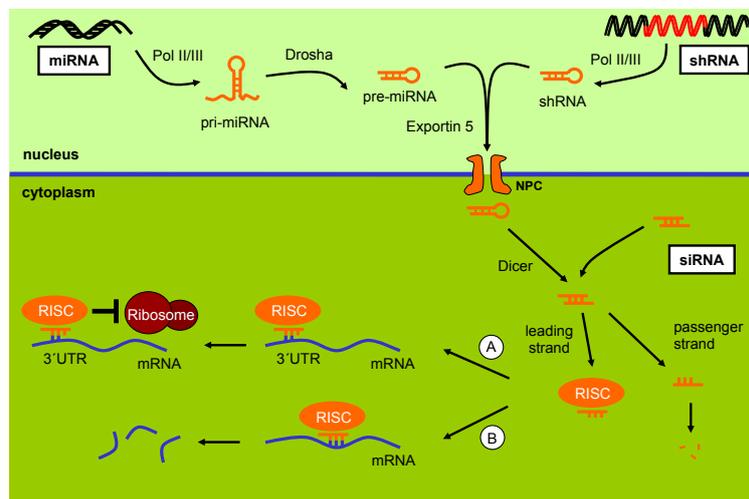
Dicer contient généralement un domaine hélicase/ATPase, un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), deux domaines de type RNaseIII, et un domaine de liaison au dsRNA<sup>10</sup>. L'extrémité sortante en 3' est caractéristique de l'activité RNaseIII. La distance entre les domaines PAZ et RNaseIII détermine la taille des siRNA produits. Dicer livre ensuite le siRNA à RISC. La longueur du duplex siRNA, ainsi que les extrémités distinctives sont des caractéristiques nécessaires pour la reconnaissance efficace et l'intégration dans RISC<sup>9</sup>. Le cœur de RISC, ainsi que le principal exécuteur de l'inhibition d'expression génique médiée par RNAi est la protéine Argonaute. Il existe quatre protéines Argonaute chez l'Homme (AGO1-4), et l'inhibition d'expression génique par les siRNA est effectué via AGO2.

Pour engendrer une interférence médiée par siRNA, AGO2 doit éjecter le brin passager, puis entreprendre différents cycles de reconnaissance, de clivage, et de libération du mRNA cible, tandis que le brin guide reste lié, servant de co-facteur. La séparation des deux brins d'ARN se fait grâce à une étape ATP-dépendante. Des études structurales ont révélé certains mécanismes nécessaires à l'activité de AGO2. AGO2 possède trois domaines fonctionnels, PAZ, MID, et PIWI, ce dernier, adoptant une conformation de type RNase H, fournit l'énergie à RISC pour son activité de « débitage »<sup>11</sup>. Lors du chargement de RISC, des évidences structurales suggèrent que les extrémités caractéristiques des siRNA ont des fonctions d'ancrage : le dinucléotide en 3' est spécifiquement reconnu par le domaine PAZ d'Argonaute. Cette extrémité sortante plonge profondément dans la poche hydrophobique du domaine, dans laquelle la base du nucléotide terminal s'associe à un cycle aromatique de l'un des nombreux résidus aromatiques qui bordent la poche. Pendant ce temps, le groupe phosphate en 5' s'insère entre les domaines MID et PIWI, se liant à un ion magnésium, lui-même coordonnée à l'extrémité C-terminale de la protéine. Concernant la sélection du brin guide, les données thermodynamiques suggèrent qu'Argonaute sélectionne le brin possédant l'extrémité 5' la moins stable thermodynamiquement, tandis que le brin passager est clivé pour entraîner son éjection.

Une fois le brin guide complexé à RISC, celui-ci identifie les mRNA qui lui sont complémentaires dans le cytoplasme. La sous-unité de RISC, Argonaute, possédant une activité endonucléase, va se charger de réaliser un clivage du mRNA cible en un site unique. Les

fragments résultants, déstabilisés, sont alors totalement dégradés par les mécanismes endogènes naturels. Un complexe RISC activé est capable de dégrader des milliers de molécules cibles.

La machinerie RNAi peut également être mise en marche par des courts ARN endogènes, appelés microRNA (miRNA)<sup>12</sup>. Après une étape, réalisée dans le noyau, destinée à générer les pre-miRNA à partir de leurs précurseurs pri-miRNA, grâce à une enzyme de type RNase III, Drosha, ceux-ci sont exportés dans le cytoplasme, et clivés par Dicer afin d'obtenir les miRNA possédant les mêmes structures terminales que les siRNA. Si les miRNA peuvent parfois réguler leurs cibles de la même manière que les siRNA, leur mode d'action principal diffère. En effet, ces molécules ne sont que partiellement complémentaires à leurs cibles mRNA, et vont principalement engendrer une interférence génique en opérant une répression traductionnelle en aval, ainsi que la dégradation des mRNA par déadénylation.



**Illustration I-2 : Voies des ARN interférents**  
(Source : Jürgen Wittmann, Center University of Erlangen-Nürnberg)

Enfin, un troisième type de molécules peut activer la machinerie RNAi : les short hairpin RNA (shRNA). Ceux-ci peuvent être synthétisés dans la cellule grâce à une production médiée par un plasmide ADN, qui peut lui-même être empaqueté dans un vecteur rétroviral ou lentiviral. Ils consistent en deux séquences ARN complémentaires de 19 à 22 bp reliées par une courte boucle de 4 à 11 nucléotides, formant une structure en épingle à cheveux similaire à celles des miRNA. Leur synthèse à partir du plasmide ADN est dépendante du promoteur choisi, et peut également être inductible, afin de sélectionner le type de cellules exprimant le shRNA *in vivo* par exemple. Une fois transcrits, les séquences shRNA sont exportées du noyau vers le cytosol, où elles sont reconnues par Dicer, qui va cliver les shRNA en duplexes siRNA. La suite du mécanisme est identique à celui des siRNA. Comme toute séquence plasmidique, les shRNA sont capables de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte, et permettent ainsi d'obtenir des lignées stables présentant une interférence ARN continue sur un gène particulier.

### 3. Potentiel de l'ARN interférence

La puissance de la RNAi tient au fait que la machinerie endogène d'interférence génique peut être détournée afin de réguler artificiellement n'importe quel gène d'intérêt. En effet, en théorie, des siRNA peuvent être générés pour tout gène à partir de son seul ARNm. Ce fort potentiel a fait de la technique de RNAi une des stratégies favorites pour supprimer une activité génique dans les cellules de mammifères. De plus, cette technique peut potentiellement être utilisée pour développer des thérapies pour un vaste éventail de maladies humaines, qu'elles soient causées par un ou quelques gènes, comme les maladies génétiques. L'ARN interférence pourrait également venir à bout d'infections virales, de pathologies autoimmunes, ou encore de cancers<sup>13</sup>. Dans de nombreux cas, notamment pour les cancers, et grâce aux avancées dans le domaine du séquençage, il serait possible d'associer ce formidable outil à des cibles très précises, permettant ainsi de mettre en place une thérapie personnalisée et ciblée, et donc d'augmenter d'autant les chances de succès du traitement.

Lors de la conception d'un traitement, la puissance d'action de celui-ci est très importante. C'est pourquoi l'ARN interférence surpasse largement les autres technologies basées sur les acides nucléiques antisens. En effet, étant donné qu'un brin guide peut être utilisé pour cliver un grand nombre d'ARNm, avec le bon déclencheur, l'ARNi présente une efficacité surprenante. L'efficacité de cette méthode peut cependant varier de manière importante, un grand nombre de facteurs étant impliqué. Si tous les paramètres ne sont pas encore bien délimités à l'heure actuelle, il est clair que le design des siRNA (notamment leur stabilité structurale), l'accessibilité de la cible, ou encore d'autres caractéristiques structurales, mais également la durée de vie et le « turn-over » de la protéine ciblée sont à prendre en compte.

#### 4. Quelles différences entre siRNA, shRNA ? Que choisir ?

##### *siRNA*<sup>14</sup>

Les siRNA synthétisés chimiquement sont la forme la plus simple de RNAi. Ce sont des réactifs directement utilisables, qui ne nécessitent pas de manipulation particulière avant emploi. C'est la méthode la plus rapide pour inhiber une expression génique spécifique. La synthèse des siRNA peut assez aisément être réalisée en grandes quantités. De plus, les siRNA peuvent être marqués par un fluorochrome, ou encore modifiés chimiquement, afin d'améliorer leur stabilité. Enfin, il est plus facile de contrôler la quantité de siRNA utilisé qu'avec une approche vectorielle. Ce contrôle théorique de la quantité permet de minimiser les effets off-target et les effets non spécifiques. Un autre avantage de cette technique est qu'il n'est pas nécessaire que les siRNA soient captés par le noyau pour faire effet, contrairement aux shRNA. De plus, plusieurs siRNA peuvent être utilisés en même temps, afin d'augmenter leur potentialité d'action, mais il est indispensable de tester chaque siRNA individuellement et leurs interactions lors d'essais cliniques avant de pouvoir les utiliser de manière conjointe.

Comme nous le verrons plus loin, l'un des plus importants obstacles à l'obtention de RNAi efficace avec les siRNA est la difficulté de transfection de nombreux types cellulaires, ainsi que la durée limitée et transitoire des effets des siRNA après leur transfection. Dans le cas d'une utilisation thérapeutique à long terme, il sera nécessaire de doser régulièrement les siRNA pour s'assurer du maintien de l'efficacité du traitement. De plus, ces molécules sont coûteuses et donc peu utilisées *in vivo*, ces expériences nécessitant de grandes quantités de siRNA. Elles ne sont pas d'une grande stabilité, et les possibilités de modifications chimiques pouvant augmenter leur stabilité peuvent entraîner une perte de fonction. Il faut donc trouver le juste équilibre dans les modifications entre la stabilité et l'efficacité. Ce sujet sera discuté ultérieurement. Enfin, contrairement aux shRNA plasmidiques, leur expression n'est pas inductible.

##### *shRNA*

Les shRNA nécessitent une manipulation beaucoup plus importante et longue en amont de l'expérience à proprement parler. En effet, comme toute construction plasmidique, il est nécessaire de réaliser de nombreuses étapes de clonage des shRNA dans le plasmide, puis de vérification de séquence. Ce travail peut devenir très fastidieux si différents gènes doivent être inhibés. Cependant, une fois que les constructions sont réalisées, elles peuvent être reproduites facilement et sont très peu coûteuses. Il est également possible d'utiliser un unique vecteur d'expression pour encoder de multiples shRNA, augmentant le potentiel thérapeutique du produit. De plus, l'expérimentateur n'est pas directement en contact avec l'ARN, mais travaille

uniquement avec l'ADN, qui est plus stable, et dont les manipulations et méthodes d'acheminement vers les cellules sont bien connues. L'utilisation d'un vecteur lentiviral ou rétroviral pour infecter les cellules permet également de surmonter la difficulté de la transfection des cellules, et d'exprimer de grandes quantités de shRNA sur de longues périodes. En fonction du vecteur choisi, l'expression peut être transitoire ou stable, et des systèmes d'induction de l'expression existent.

Cette méthode n'est toutefois pas utilisable pour réaliser un « screen » de shRNA. En effet, chaque construction est bien trop laborieuse pour que cela ait un intérêt. Il n'est pas possible de marquer directement les shRNA exprimés. Enfin, comme toute construction ADN, il y a des possibilités d'intégrations dans le génome de la cellule, avec les risques que cela comporte : coupure d'un gène, décalage du cadre de lecture d'une séquence, modification d'un promoteur...

### *Que choisir ?*

De manière générale, si certains avantages de la technique shRNA peuvent sembler plus attrayants que ceux des siRNA, il faut toutefois prendre en compte d'autres paramètres. En effet, malgré les points positifs de stabilité et d'expression inductible et à long-terme des shRNA, le risque d'intégration dans le génome est un problème non négligeable : d'un point de vue éthique, il serait difficile de justifier la transformation d'un être humain en organisme génétiquement modifié, même si la première intention est louable. Il existe de plus un risque que l'intégration génomique se fasse au niveau des gamètes, entraînant non seulement la transformation génétique du patient, mais également potentiellement celle de sa descendance.

Pour l'instant les données concernant l'intégration de plasmides dans le génome sont trop limitées pour pouvoir assurer une insertion dans une zone précise, et il est quasiment impossible de certifier que cette insertion, même si la zone y semble propice, ne soit pas sans effets délétères ultérieurement à d'autres niveaux métaboliques ou physiologiques. De plus, si cette éventualité pourrait être envisagée dans le cadre d'un traitement de maladie génétique incurable, comment la justifier dans le cadre d'une infection ou d'un cancer, aussi virulents soient-ils, si le traitement peut engendrer davantage de complications par la suite ?

Dans le cadre de ma thèse, le problème se pose différemment, mais n'invalide cependant pas cette réflexion. En effet, le but de mon travail n'est pas de traiter de façon parfaite une pathologie, mais bien de mettre en avant une méthode de vectorisation des siRNA, et de réaliser la preuve de concept de son efficacité. Dans ce cadre, le but est de travailler avec les molécules de siRNA directement, afin d'améliorer l'efficacité du traitement les utilisant, en « sublimant » leurs capacités par un apport extérieur capable de favoriser leur stabilité, et leur libération à long terme.

## 5. Limites et défi des siRNA thérapeutiques

Grâce à leur efficacité et spécificité d'interférence génique, le potentiel thérapeutique des siRNA est colossal, comme cela a été démontré dans un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo*. Il reste cependant un grand nombre d'obstacles à franchir afin de pouvoir exploiter toute la puissance de cette technologie<sup>13</sup>.

### *Stabilité et ciblage des siRNA*

Dans le sérum, comme dans les tissus, les siRNA sont très sensibles à la dégradation enzymatique. En effet, la demi-vie de siRNA nus dans le sérum se situe entre quelques minutes et une heure<sup>15</sup>. De plus, du fait de leur faible masse moléculaire, les siRNA sont rapidement excrétés par les reins. De ce fait, la détermination d'une dose adéquate pour le traitement au niveau de la zone ciblée, et d'autant plus au niveau des cellules cibles, est un réel défi<sup>16</sup>.

Une fois arrivés au niveau des cellules cibles, les siRNA doivent encore arriver à passer la membrane cellulaire. Cependant, la taille, ainsi que la charge négative des siRNA nus en empêche la diffusion. En cas d'entrée des siRNA par les voies d'endocytose, il leur faut encore pouvoir accéder au cytoplasme, où ils risquent d'être dégradés par les RNases cytosoliques. Une fois tous ces obstacles passés, les siRNA n'ont toujours pas été reconnus et incorporés à RISC...

### *Interférence off-target*

Outre les difficultés d'acheminement, des effets *off-target* ont été constatés lors d'analyses microarray, c'est-à-dire l'interférence de gènes autres que ceux dont l'inhibition d'expression est souhaitée<sup>17</sup>. Ces effets *off-target* sont évidemment indésirables, puisqu'ils peuvent entraîner des modifications de l'expression génique, ainsi que des modifications cellulaires imprévues.

En accord avec nos connaissances de l'interférence des miRNA, les résultats obtenus lors d'études récentes semblent logiques<sup>18,19</sup>. En effet, ces études ont montré que les effets *off-target* sont liés à des homologies de séquences de six ou sept nucléotides, ce qui s'apparente à la complémentarité partielle obtenue entre le mRNA et le miRNA. De plus, les siRNA peuvent également être complémentaires aux miRNA endogènes, qui ont pour rôle de réguler certaines familles de gènes<sup>20</sup>. Pour toutes ces raisons, il est indispensable d'apporter une attention toute particulière au choix du brin guide, afin de limiter autant que possible ces effets *off-target*. Cependant, l'avancée de nos connaissances concernant les mécanismes d'interférence ARN, les prédictions bioinformatiques utilisables pour la création des siRNA se font de plus en plus précises, et pourront probablement à l'avenir réduire, voire supprimer totalement l'interférence *off-target*.

### Activation de la réponse immunitaire

L'activation de l'immunité innée par les siRNA fait potentiellement partie des effets indésirables de ceux-ci *in vivo*. En effet, la libération excessive de cytokines, ainsi que les syndromes inflammatoires qui y sont associés peuvent engendrer une réaction toxique, en particulier chez l'Homme. Bien que l'idée d'exploiter cette réponse immunitaire dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses ou anti-infectieuses soit séduisante, son développement requière une précaution infinie, du fait de la sensibilité humaine à la toxicité médiée par les cytokines.

L'administration systémique de siRNA peut engendrer une réponse immunitaire innée, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), l'interleukin-6 (IL-6), et des interférons (IFN), en particulier de l'IFN-alpha (IFN $\alpha$ ). En effet, lorsque les siRNA sont acheminés vers des cellules immunitaires, ceux-ci engendrent la production d'IFN $\alpha$  dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), et de cytokines inflammatoires dans les cellules dendritiques myéloïdes (mDC)<sup>21,22</sup>.

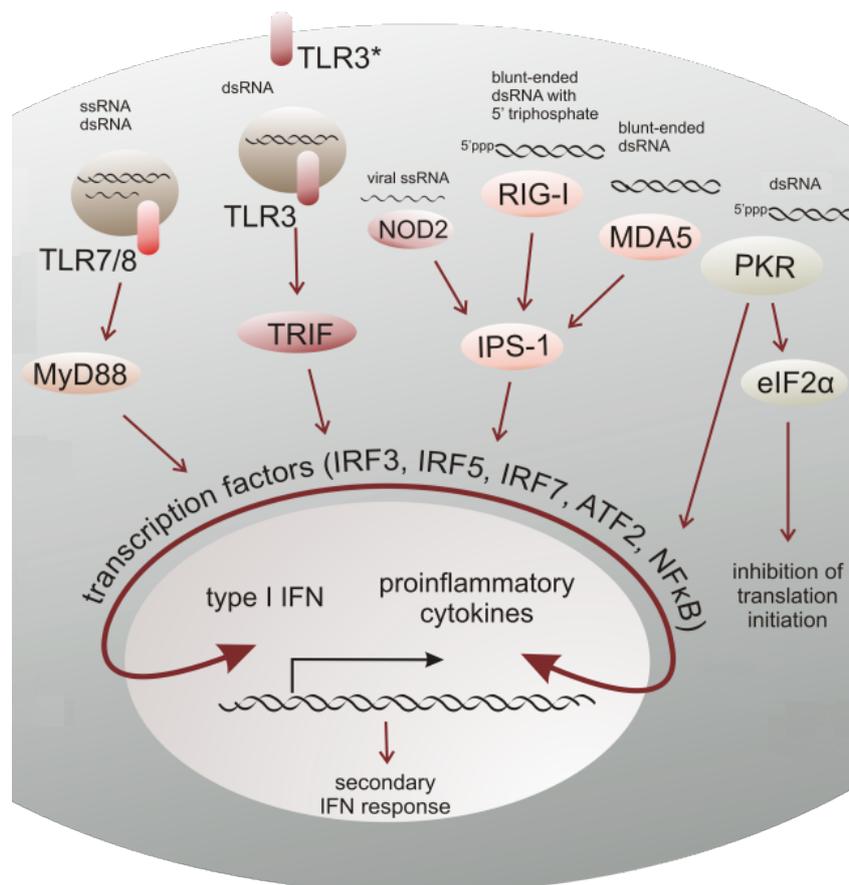


Illustration I-3 : siRNA et immunité  
(Modifiée à partir de Olejniczak *et al.*, 2012<sup>23</sup>)

Cette activation de l'immunité innée permet à l'hôte de se protéger d'agents potentiellement infectieux ou de corps étrangers. Plusieurs voies peuvent être activées par les siRNA, étant soit médiée par les récepteurs Toll-like (TLR ; mise en jeu des TLR3, 7 et 8, sensibles à l'ARN), soit non-TLR-médiée (par des protéines intracellulaires telles que le gène 1 inductible par l'acide rétinoïque, RIG1). Les trois types de TLR sont principalement situés dans la cellule, et captent des acides nucléiques de pathogènes lorsqu'ils sont dégradés par les endolysosomes. TLR3 se situe également en surface de certains types cellulaires, et RIG1, quant à lui, va se fixer aux siRNA dans le cytoplasme. En fonction de leur mode de transport et de leur présentation, les siRNA peuvent potentiellement activer à la fois les réponses immunitaires dépendantes et indépendantes des TLR. De plus, la présence de siRNA immunostimulants peut également initier une réponse immune adaptative en potentialisant la production d'anticorps dirigés contre les composants du vecteur. Ceux-ci peuvent alors augmenter la clairance des vecteurs des siRNA, et ainsi diminuer l'efficacité des traitements ultérieurs.

### TLR7 et TLR8

Tous les TLR ne réagissent pas aux mêmes stimuli. En effet, les TLR7 et 8 reconnaissent plus particulièrement certaines séquences de ssRNA (poly-uridine (poly-U), ou régions riches en guanosine (G) et en U<sup>24</sup>. Il a même été suggéré plus récemment que les ligands de TLR7 soient uniquement définis par la présence d'une chaîne de riboses et de groupes de plusieurs U relativement rapprochés<sup>25</sup>. La nature exacte des motifs reconnus par les TLR7/8 n'est pas claire pour l'instant. Il semble cependant que le motif 5'-UGU-3' soit particulièrement immunostimulant, alors que la suppression des U dans ce motif, ainsi qu'en évitant la présence de séquences riches en GU réduit le potentiel immunostimulant du duplex<sup>22</sup>. Ces motifs ne sont cependant pas les seuls reconnus par les TLR7/8. En effet, une grande majorité des séquences siRNA présentent une activité immunostimulante de plus ou moins forte intensité.

Le fait que la réponse immunitaire médiée par les TLR soit dépendante des séquences de siRNA présente des conséquences importantes pour le développement des technologies employant les siRNA, soulignant la nécessité de sélectionner les contrôles expérimentaux adéquats. En effet, il est indispensable de pouvoir différencier les effets non spécifiques induits par des séquences cibles ou contrôles immunostimulatrices, notamment *in vivo*<sup>26</sup>.

Les signaux TLR7 et 8 sont véhiculés exclusivement par la protéine adaptatrice MyD88 (Illustration I-3)<sup>27,28</sup>. L'association des TLR et de MyD88 va entraîner la formation d'un complexe de signalisation qui aboutira à la translocation de NF- $\kappa$ B, et à l'activation de facteurs de transcriptions tels que IRF5 et IRF7, qui vont provoquer la surexpression de l'IFN $\alpha$  et des cytokines pro-inflammatoires<sup>27</sup>.

## TLR3

TLR3 possède une structure génique unique parmi les TLRs et fait partie d'une sous-famille différente des TLR7 et TLR8<sup>29</sup>. Contrairement aux TLR7 et 8, qui se trouvent principalement sur des cellules immunitaires, TLR3 est également exprimé dans un certain nombre de types cellulaires, notamment certaines lignées endothéliales, épithéliales et fibroblastiques.

Les dsRNA ont été identifiés comme étant les agonistes principaux des TLR3<sup>30</sup>. Les TLR3 présents à la surface de cellules endothéliales sont également activés *in vivo* par des siRNA exogènes mesurant au moins 21 nucléotides de long, et induisent la production de cytokines comme l'IFN $\gamma$  et l'IL-12<sup>31</sup>. S'il semble logique qu'il soit peu probable que les siRNA, une fois libérés dans les cellules, dans les endosomes ou dans le cytoplasme, puissent activer les TLR3 à la surface cellulaire, cette hypothèse n'a pas pu être démontrée pour l'instant.

Contrairement aux autres TLR détectant les acides nucléiques, la voie de signalisation de TLR3 passe par la protéine adaptatrice TRIF<sup>32</sup>, qui va entraîner la production en aval d'IFN $\beta$  et d'IFN $\alpha$ 4. Lors de ce mécanisme, un rétrocontrôle positif se met en place : en effet, la production d'IFN $\beta$  et d'IFN $\alpha$ 4 renvoie un signal à la cellule, entraînant la surexpression de gènes induisant la production d'IFN, ce qui entraîne une amplification de la réponse<sup>33</sup>. L'activation de TRIF par le TLR3 va également induire une activation en aval des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, ATF, et c-Jun et l'induction de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ <sup>33</sup>.

## Senseurs cytoplasmiques d'ARN (non-TLR)

Outre les systèmes TLR, les cellules de mammifères ont développé un certain nombre de mécanismes indépendants des TLR pour détecter les ARN cytoplasmiques, y compris les siRNA, signes d'infection et de réplication virale. Ces mécanismes sont souvent induits par la kinase protéique liant les dsRNA (PKR) ou la protéine RIG1 (Illustration I-3). En effet, RIG1 agit comme un senseur des ARN viraux et se lie et s'active en présence d'ARN simples ou doubles-brins contenant des 5'-triphosphates non capés, caractéristiques de certains ARN viraux<sup>34</sup>. Ces caractéristiques des ligands de RIG1 sont également trouvés dans certaines constructions de siRNA, notamment dans les siRNA à extrémités franches et les siRNA transcrits *in vitro*. L'expression de RIG1 est également inductible par l'IFN, et son expression est ainsi rapidement régulée positivement de manière autocrine ou paracrine suite à l'initiation d'une réponse interféron. Une fois lié au dsRNA, RIG1 déclenche l'activation de IRF3 et de NF- $\kappa$ B, induisant respectivement la production d'IFN $\beta$  et de médiateurs de l'inflammation<sup>35</sup>.

Avant l'identification des TLR et de RIG1, la protéine PKR était considérée comme le principal détecteur de dsRNA viraux. Cependant, au vu des travaux plus récents, il semble que

l'activation de RIG1 puisse être responsable d'une grande partie de ces observations<sup>36</sup>. En effet, si l'interaction de PKR avec des dsRNA jusqu'à 11 bp est possible, la possibilité d'activer PKR avec des siRNA n'est pas clairement confirmée pour l'instant. De plus, les travaux menés jusqu'à présent n'ont pas permis de savoir si le niveau d'activation engendré est suffisant pour l'activation de NF- $\kappa$ B et pour l'inhibition traductionnelle.

Les lignées cellulaires non hématologiques n'expriment généralement pas les TLR7 et 8, et ne manifestent donc pas de réponse immunitaire innée forte aux siRNA contrairement à ce qui est aisément observable à la fois *in vivo* et dans les culture primaires sanguines. Cependant, les récepteurs cytoplasmiques aux ARN sont présents dans un plus large éventail de types cellulaires mammifères, offrant à ces cellules un mécanisme de défense antiviral autonome. Il n'est donc pas surprenant que certaines lignées à forte expression de RIG1 mettent en place une importante réponse interféron lorsqu'elles sont transfectées avec des siRNA à extrémités franches<sup>37</sup>. Il semble également que ces siRNA soient capables d'induire des réponses interféron (bien que plus faiblement) dans un certain nombre de lignées cellulaires humaines de différents types utilisées couramment<sup>38</sup>. L'intensité de la réponse observée est probablement associée au niveau d'expression de RIG1 ou autres récepteurs ARN équivalents.

Un siRNA donné peut logiquement contenir différentes caractéristiques structurales, physiques, ou de séquence qui pourront activer à la fois les voies TLR et non-TLR, en fonction également du type de cellules transfectées. Chaque voie pouvant engendrer une réponse interféron de type I, et donc des effets off-targets et des réactions toxiques, il est important de s'assurer que les siRNA choisis n'activent aucune des différentes voies mentionnées ci-dessus.

Les conditions de culture cellulaire peuvent également affecter directement la sensibilité des cellules aux réponses aux siRNA. En effet, certains facteurs physiologiques tels que le stress cellulaire peuvent augmenter l'expression de certains composants des voies de signalisation TLR et non-TLR, et pourraient ainsi amener les cellules à répondre aux siRNAs. Il est également important de prendre en compte un certain nombre d'autres facteurs, comme la structure chimique et le mode d'acheminement des siRNA, dont il sera question ultérieurement.

Il existe cependant des cas dans lesquels le déclenchement d'une réponse interféron pourrait être intéressant. Ainsi, par exemple, l'interféron est une des principales molécules utilisées pour le traitement de l'hépatite C. Il pourrait alors être intéressant de profiter, outre l'impact direct de siRNA dirigés contre le virus, d'une réponse interféron induite volontairement afin d'augmenter la puissance du traitement. Il faudrait cependant dans ce cas pouvoir contrôler précisément cette réponse interféron. Il serait également important de vérifier que cette activation volontaire de la réponse immunitaire innée ne déclenche pas le développement d'une réponse immunitaire acquise contre les composants du vecteur des siRNA.

### *Quelles sont les barrières biologiques à surmonter ?*

Outre les différentes limites de stabilité et de déclenchement de réponse immunitaire, l'efficacité des siRNA est également dépendante de leur capacité à dépasser certaines barrières biologiques s'interposant entre l'administration de ces molécules et leur activité finale dans les cellules<sup>39</sup>. Il est indispensable de comprendre ces processus afin de pouvoir imaginer des systèmes de vectorisation et de libération les plus efficaces possibles.

Comme nous le verrons ultérieurement, différentes stratégies ont été étudiées afin de surmonter ces barrières : modifications chimiques, permettant d'augmenter la stabilité des siRNA, notamment en les rendant plus résistants aux nucléases sanguines, et différents systèmes de transport. Dans un premier temps, intéressons-nous à décrire les deux principales barrières à la livraison, l'internalisation, et à l'activité des siRNA : une première barrière est tissulaire et cellulaire, et est composée du système réticulo-endothélial, du foie, et de la rate ; la seconde, quant à elle, est intracellulaire, et correspond à l'échappement endosomal.

#### Système réticulo-endothélial (RES), foie et rate

Le RES est composé de phagocytes, dont des monocytes circulants et des macrophages tissulaires, qui ont une fonction « d'éboueurs », débarrassant le corps de pathogènes inconnus, mais également de débris cellulaires ou de corps apoptotiques<sup>40</sup>. Outre les nucléases circulantes et la clairance rénale, le RES est le principal obstacle à la livraison de siRNA. En effet, les phagocytes, et en particulier les cellules de Kupffer (composant environ 30% du foie), ainsi que les macrophages spléniques vont détecter et phagocyter les siRNA, mais également les vecteurs de siRNA<sup>41</sup>.

La capture des siRNA et de leurs vecteurs par le RES est également corrélée à l'observation de toxicité *in vivo*. En effet, les molécules vont être déposées sur les organes du RES, entraînant diverses anomalies physiologiques, telles que la dégénération des tubules rénaux, la splénomégalie, ou encore l'augmentation de l'expression des transaminases hépatiques<sup>42</sup>.

#### Membrane plasmique et échappement endosomal

Une fois les siRNA et leurs vecteurs arrivés au niveau des cellules cibles demeure le problème de leur internalisation. En effet, la membrane plasmique, très hydrophile, et chargée négativement, empêche l'entrée facile des siRNA, également chargés négativement, dans les cellules. Pour surmonter cette barrière, la charge nette négative des siRNA peut être masquée par leur complexation avec des polymères cationiques, ou encore des lipides. Dans certains cas, les siRNA peuvent également être livrés à des types cellulaires spécifiques grâce à leur

conjugaison directe à diverses molécules, telles que les anticorps, certains ligands, ou des aptamères, qui vont reconnaître des antigènes spécifiques en surface des cellules cibles.

De manière générale, que les siRNAs et leurs vecteurs se lient spécifiquement à la cellule ou non, ceux-ci vont être endocytés et commencent leur trajet intracellulaire dans les vésicules endosomales primaires. Ceux-ci vont ensuite fusionner avec des endosomes de tri, qui à leur tour vont transférer leur contenu aux endosomes tardifs<sup>43</sup>. Le pH de ces derniers descend jusqu'à pH 5-6 grâce à des ATPases pompes à protons liés à leur membrane, puis le contenu est déplacé vers les lysosomes (pH  $\approx$  4,5), qui contiennent différentes nucléases pouvant dégrader les siRNA. Pour éviter la dégradation lysosomale, les siRNA, qu'ils soient nus ou complexés à un vecteur, doivent s'échapper vers le cytosol, où ils pourront s'associer à la machinerie RNAi. Différentes approches sont actuellement étudiées afin de faciliter l'échappement endosomal, qui est un point-clé dans les stratégies d'utilisation thérapeutiques des siRNA<sup>43</sup>.

Comme nous avons pu le constater au cours des dernières pages, les limites et les obstacles à surmonter pour une utilisation efficace des siRNA sont nombreux. Nous allons à présent nous intéresser dans la suite de ce chapitre aux différentes stratégies qui ont été mises en place afin notamment d'améliorer la stabilité des siRNA et de faciliter le passage des barrières biologiques.

## 6. Modifications chimiques : amélioration de la stabilité et de la circulation des siRNA

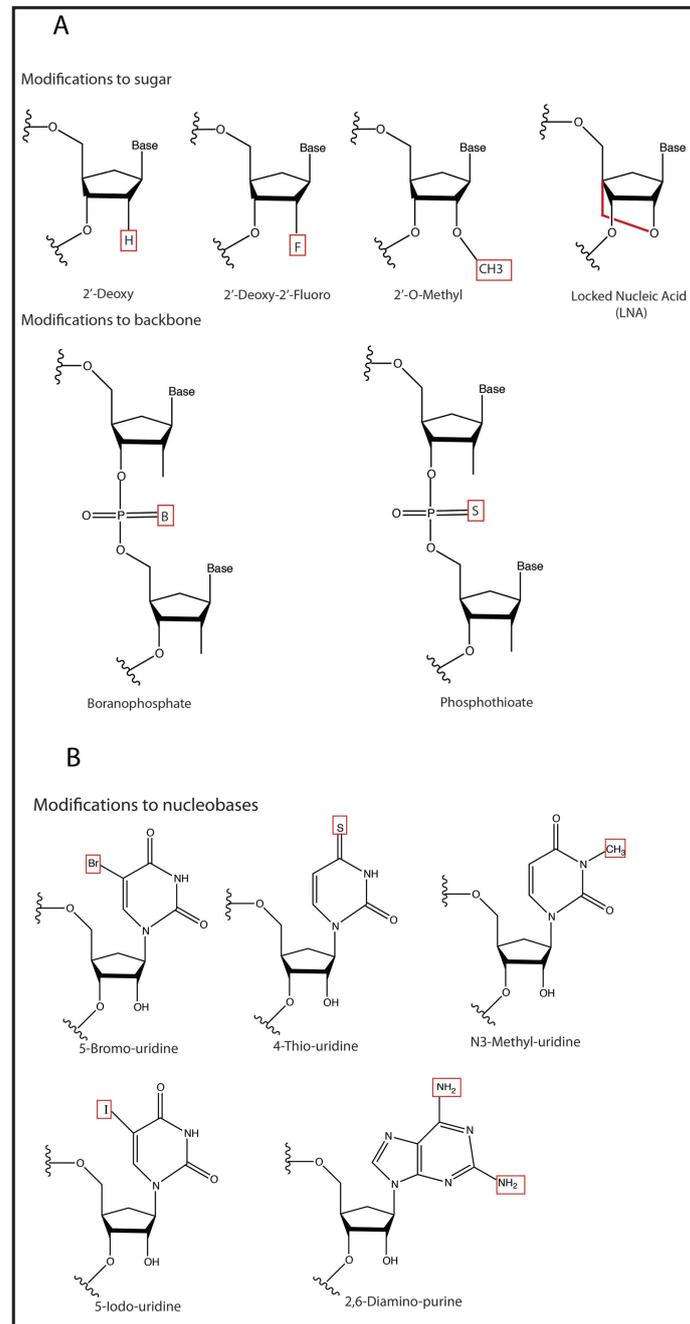
Les modifications chimiques peuvent améliorer de façon significative la stabilité et l'entrée des siRNA dans les cellules, et ce, sans diminuer leurs capacités à inhiber l'expression de leurs cibles<sup>44</sup>. Depuis la découverte des siRNA, toutes les possibilités de modifications chimiques ont été explorées, qu'elles touchent les extrémités des siRNA, le squelette, ou encore les sucres et les bases, le tout dans le but de prolonger la demi-vie des molécules et d'augmenter leur capacité à entrer dans les cellules<sup>13</sup>.

Les modifications les plus courantes touchent les sucres. Ainsi, par exemple, l'incorporation d'un fluor<sup>45</sup> ou d'une amine<sup>46</sup> en 2', ou la liaison des positions 2' et 4' des sucres par une liaison -O-CH<sub>2</sub> (formant alors un acide nucléique verrouillé, ou *locked nucleic acid*, [LNA]<sup>47</sup>)(A) permettent d'augmenter significativement la stabilité des siRNA dans le sérum. Il est pourtant important de noter que lorsque les sucres des deux brins du duplex siRNA sont remplacés par des groupements 2'-O-méthyl, le duplex perd sa capacité à inhiber l'expression du gène cible. Au contraire, si les modifications se font uniquement sur le brin sens, l'activité du siRNA reste totale, tant que certaines positions importantes restent intactes<sup>48</sup>. Il a également été démontré que d'importantes modifications du duplexe siRNA par des LNA prolonge sa demi-vie dans le sérum de jusqu'à 90 heures. Ces modifications vont cependant altérer l'activité d'interférence ARN, suggérant que la machinerie RNAi ne peut gérer que des altérations modérées de la structure des siRNA<sup>49</sup>.

Les modifications du squelette des duplexes siRNA peuvent les protéger contre l'action des nucléases à la fois dans le sérum et dans le cytoplasme. Ainsi, par exemple, modifier les liens phosphates internucléotides dans les siRNA par des phosphothioate (P = S) (Illustration I-4A) entraîne une amélioration modérée de la stabilité en présence de nucléases<sup>44</sup> et facilite l'entrée cellulaire, tout en préservant la fonction d'interférence ARN<sup>50</sup>. Cette solution n'est toutefois pas non plus idéale, car dans certains cas la substitution P=S engendre de la cytotoxicité<sup>51</sup>. Une alternative pourrait être de modifier le squelette avec un boranophosphate (P = B) (Illustration I-4A), qui améliore la résistance aux nucléases de plus de 10 fois en comparaison avec des siRNA non modifiés, et ce sans engendrer de cytotoxicité ni diminuer l'efficacité d'interférence ARN<sup>52</sup>.

Les modifications des bases des siRNA ont également été explorées avec des résultats mitigés. Ainsi, des modifications comme l'insertion de résidus 5-iodouridine, N-3-Me-uridine, et 2,6-diaminopurine (Illustration I-4B) sont tolérées sur le brin passager ou dans la partie terminale du duplexe de siRNA, mais pas sur le brin guide ou dans la région centrale du siRNA. De manière intéressante, les nucléotides 2-8 (à partir de l'extrémité 5' du brin guide) de la

région centrale du siRNA peuvent être remplacés par des nucléotides ADN sans modification majeure de l'activité d'interférence ARN<sup>53</sup>.



**Illustration I-4 : Modifications chimiques des siRNA.**  
**A. Au niveau des sucres et du squelette. B. Au niveau des nucléobases**  
 (Source : Gavrilov et Salzman, 2012<sup>13</sup>)

Les modifications des extrémités des siRNA peuvent être utilisées pour ajouter des propriétés pharmacocinétiques, ainsi que de nouvelles fonctionnalités aux duplexes siRNA.

L'ajout de groupements cholestérol, folate, de différents peptides, ou d'aptamères peut améliorer le transport des siRNA au travers des barrières cellulaires ou permettre de cibler des cellules ou des organes spécifiques<sup>54,55</sup>. De la même manière, des molécules fluorescentes peuvent être liées afin d'étudier la biodistribution et l'entrée cellulaire des siRNA<sup>16</sup>. Il faut toutefois prendre garde à ce que ces modifications ne modifient pas des caractéristiques indispensables aux extrémités des siRNA, notamment le groupement 5'-phosphate du brin sens, qui est nécessaire à l'inhibition d'expression génique par RNAi. L'effet des modifications de l'extrémité 3' est plus variable : l'ajout d'une biotine en 3' n'altère pas l'inhibition d'expression génique, contrairement à l'ajout de phosphate 3'-2-hydroxyethyl, qui l'abolit<sup>56</sup>.

Les siRNA présentant une extrémité 3' sortante dinucléotide mimant les produits de clivage de Dicer sont généralement plus stables et plus efficaces que les autres ; c'est pourquoi la majorité des siRNA synthétiques utilisés possèdent une telle extrémité. Il a également été remarqué que le choix des bases de l'extrémité sortante 3' est important<sup>57</sup>. De plus, il a été démontré que, *in vivo*, pour des siRNA dirigés contre une même cible, la séquence du siRNA en elle-même est importante pour la durée de l'inhibition d'expression génique, même si leur activité *in vitro* est identique<sup>57</sup>.

L'efficacité de siRNA est également fortement séquence-dépendante. Ainsi, le moindre écart de séquence dans le duplex siRNA peut potentiellement annuler le clivage de l'ARN cible<sup>58</sup>. Voici quelques caractéristiques empiriques permettant l'obtention de siRNA efficaces qui devraient être prises en compte lors du « design » des siRNA<sup>58-61</sup> :

- ❖ Pour éviter la formation de quartets de G, il est important de conserver un ratio de G/C situé entre 30 et 52 %.
- ❖ Une faible stabilité interne des siRNA à l'extrémité 5' du brin antisens est requise pour obtenir une inhibition d'expression génique efficace. Des répétitions internes ou des palindromes dans les séquences risquent de former des boucles internes, délétères pour l'efficacité d'interférence ARN, et pouvant également réduire la concentration réelle en siRNA.
- ❖ L'efficacité de l'inhibition d'expression génique est inversement proportionnelle à la forte stabilité des répétitions internes.
- ❖ Le brin sens présente un A aux positions 3 et 19
- ❖ Le brin sens présente un U à la position 10
- ❖ Le brin sens ne présente pas de G ou de C à la position 19
- ❖ Le brin sens ne présente pas de G à la position 13.

## **7. Transport des siRNA**

Les stratégies utilisées pour le transport de siRNA sont très diverses, des plus « simples » aux plus élaborées : injection hydrodynamique de siRNA nus ou conjugués<sup>62</sup>, électroporation<sup>63</sup>, etc. il y a même eu des travaux concernant la production intracellulaires de siRNA (sur le même principe que les techniques de shRNA)<sup>64</sup>.

Outres ces stratégies utilisant les siRNA sous leur forme simple, ces dernières années ont vu se développer de très nombreuses stratégies de vectorisation plus complexes. La seconde partie de mon introduction s'attachera à lister et à comparer les différents types de vecteurs existants.

## II. Vectorisation des siRNA

### 1. Administration des siRNA

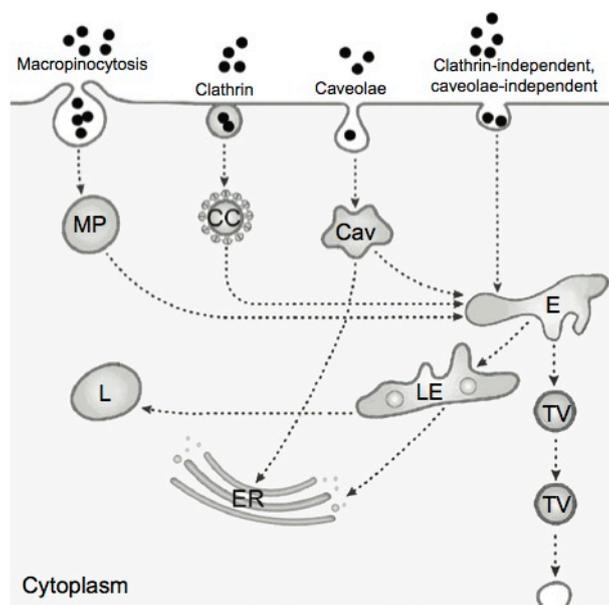
Le choix du mode d'administration des siRNA est très important lors de la mise en place d'un protocole thérapeutique. Ce point peut tout d'abord paraître secondaire, il est aussi indispensable à prendre en compte que le choix du vecteur lui-même. En effet, la voie d'administration va affecter la dose totale nécessaire, la distribution tissulaire, les effets secondaires potentiels, et va aider à déterminer la nécessité de modifier chimiquement les siRNA, ainsi que le choix du vecteur<sup>15</sup>.

L'administration par voie intraveineuse (i.v.) est souvent considérée comme permettant la distribution tissulaire la plus large. D'autres voies doivent cependant être prises en compte, comme les injections intra-péritonéales (i.p.) ou sous-cutanées (s.c.). En fonction du type de pathologie traitée, il est également important de considérer d'autres modes d'administration. Ainsi, l'administration locale, dans le cadre de tumeurs ou de pathologies « mono-organiques » permet d'apporter de manière sûre la plus grande concentration de siRNA au niveau du site ciblé, en limitant la dose totale injectée et les risques d'effets secondaires systémiques<sup>15</sup>. L'administration peut alors être faite par injection directe (dans la tumeur, l'organe, dans une articulation, etc.), ou encore par application topique sur une surface (absorption transépithéliale par les muqueuses ou par la peau par exemple). En fonction de la zone ciblée et du vecteur, les voies orale, intra-nasale ou en inhalation pourront également éventuellement être prises en considération.

## 2. Entrée des particules dans les cellules

L'entrée des vecteurs dans les cellules est influencée par différents paramètres, comme la taille, la forme, le matériau, la charge et l'hydrophobicité de surface. Ainsi, les nanoparticules le plus facilement prises par les cellules non phagocytes sont celles qui ont un diamètre de 20 à 50 nm<sup>65,66</sup>. De la même manière, de façon générale, les particules chargées positivement entrent plus aisément dans les cellules non phagocytes que les particules négatives, que ce soient des particules d'or, d'argent, d'hydroxyapatite, de silice, etc<sup>67-69</sup>.

La majorité des nanoparticules entrent dans les cellules par endocytose. L'endocytose est un processus permettant aux cellules d'absorber des molécules de la matrice extracellulaire par invagination de la membrane plasmique et formation de vésicules intracellulaires. Plusieurs types d'endocytose ont été mis en évidence, divisés de façon simplifiée en quatre voies : endocytose médiée par clathrine (la première découverte), endocytose médiée par cavéole, macropinocytose, et voie clathrine- et cavéole-indépendante<sup>70-72</sup>.



**Illustration II-1 : Représentation de l'entrée des nanoparticules dans les cellules non-phagocytes.** L'entrée des nanoparticules (•) se fait principalement suivant quatre voies : Macropinocytose, par le macropinosome (MP) ; voie médiée par la clathrine, par les vésicules à clathrine (CC), incluant l'endocytose en phase fluide ; voie médiée par les cavéoles, par les cavéosomes (Cav) ; endocytoses clathrine- cavéole-indépendantes, regroupées ici en une voie. Toutes les voies libèrent leur contenu dans les endosomes (E), puis endosomes tardifs (LE), puis lysosomes (L). Le contenu des cavéosomes peut également être libéré dans le réticulum endoplasmique (ER). Il existe également une voie de transport vésiculaire à travers la cellule passant par les vésicules transcytotiques (Tv). (Source : Fröhlich, 2012<sup>69</sup>)

Toutes ces voies sont très efficaces et médiées par un récepteur. L'endocytose en phase fluide – anciennement pinocytose –, quant à elle, permet le transport de substances non différenciées. La plupart des voies passent par les lysosomes, dans lesquels un grand nombre de macromolécules sont dégradées. Cependant, dans le cas de l'endocytose médiée par cavéoline, les substances sont transférées directement dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, évitant alors la dégradation lysosomale<sup>73</sup>.

Parmi les différentes études de l'entrée des particules dans les cellules, il ne semble pas se dégager de règle claire pour l'instant concernant la voie empruntée en fonction du type de particules. En effet, en fonction des conditions d'étude (inhibiteurs de certaines voies d'endocytose), des types de particules et des types cellulaires, les résultats observés sont variables. Il semble de plus que toutes les cellules ne présentent pas les mêmes proportions des différentes voies. Ainsi, les cellules des muscles lisses, les fibroblastes, les adipocytes, ainsi que les cellules endothéliales présentent des quantités surprenantes de cavéoles<sup>74</sup>, et utilisent donc préférentiellement cette voie.

L'évaluation de la voie choisie majoritairement en fonction du type de particules et du type de cellules est un paramètre important à prendre en compte lors de la mise en place d'une expérience ou d'un traitement. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, les molécules issues des différentes voies n'ont pas forcément la même destination finale. De plus, toutes les voies n'ont pas la même vitesse d'internalisation des particules<sup>75</sup>, entraînant une accumulation plus ou moins rapide des particules dans les cellules.

### 3. Quels sont les paramètres importants à prendre en compte lors du choix du vecteur ?

Tous les vecteurs ne sont pas appropriés à la vectorisation de siRNA. En effet, lors du choix d'un vecteur, il est important de prendre en compte sa charge finale, afin d'anticiper au maximum ses interactions avec les molécules de l'organisme. De la même façon, sa taille joue un rôle important dans sa biodistribution : ainsi, tous les complexes ou particules n'accéderont pas forcément aux mêmes organes, et n'y séjourneront pas non plus pendant la même durée. D'autres paramètres rentrent également en ligne de compte, comme la géométrie des vecteurs, ou encore leurs propriétés physiques.

#### *Charge*

La charge des vecteurs est un paramètre important à prendre en compte lors du choix d'un mode de transport de molécules. Il a ainsi été démontré le bénéfice d'une charge positive, jouant différents rôles, par exemple lors de l'acheminement de drogues anticancéreuses<sup>76</sup>. En effet, les nanoparticules cationiques ont la propriété de passer les barrières physiques, comme le montre leur capacité à pénétrer les tissus tumoraux<sup>77,78</sup>. De plus, celles-ci interagissant de manière électrostatique avec les membranes plasmiques, elles induisent également des effets anticancéreux<sup>79-81</sup>. Il a d'ailleurs déjà été suggéré que les nanoparticules polycationiques seules puissent jouer un rôle d'agents anticancéreux. En effet, il a été démontré que celles-ci engendrent un stress physique électrostatique de la membrane cellulaire indépendant des mécanismes de résistance biologique<sup>80</sup>. De plus, les polymères cationiques ont été remarqués comme antimicrobiens potentiels de par leur capacité à désorganiser les membranes cellulaires<sup>82</sup>.

Les matériaux présentant une forte charge positive peuvent toutefois avoir des effets indésirables, comme l'agrégation des érythrocytes et des plaquettes sanguines<sup>83</sup>. Il convient de prendre en compte cet écueil potentiel, et si possible de neutraliser ou de limiter ces effets indésirables, comme par exemple par l'ajout d'un enrobage supplémentaire anionique.

#### *Taille*

Le choix de la taille du vecteur en fonction de son rôle est également un paramètre important. Il existe en effet différents mécanismes permettant aux vecteurs de passer les barrières physiques, et ce en fonction de leur taille. Ainsi, les particules de taille inférieure à 50 nm peuvent passer la voie paracellulaire, celles de taille inférieure à 500 nm pénètrent dans les cellules par endocytose<sup>84</sup>.

Lorsque les nanoparticules sont administrées oralement, il a été montré que celles de moins de 500 nm peuvent passer au travers des plaques de Peyer de l'intestin et entrer dans le système lymphatique, évitant ainsi le métabolisme hépatique pré-systémique, et améliorant la biodisponibilité des drogues<sup>84,85</sup>.

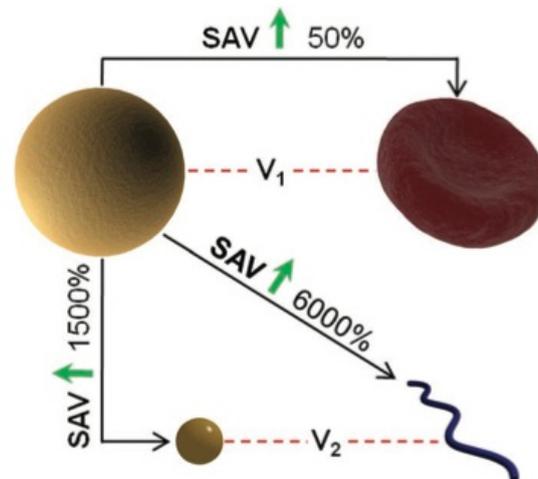
En cas d'administration i.v. par contre, les particules de taille supérieure à 200 nm peuvent activer les systèmes du complément chez l'Homme, et ainsi être repérées et éliminées par les cellules de Kupffer. Les particules de moins de 200 nm de diamètre présentent un taux de clairance inférieur, et ont ainsi la possibilité de circuler dans l'organisme plus longtemps que les précédentes. Cela peut peut-être s'expliquer par le fait que les particules de plus petite taille ont une surface présentant un petit rayon de courbure, empêchant la fixation efficace des opsonines<sup>86</sup>. Il a cependant également été observé que les drogues véhiculées par des nanoparticules magnétiques de moins de 100 nm étaient supprimées rapidement par le RES<sup>87</sup>.

Dans tous les cas, la clairance de la majorité des particules complique l'évaluation de la réelle quantité de vecteur qui atteint la cible. Il existe cependant des façons d'augmenter le temps de circulation des nanoparticules quelle que soit leur taille, par exemple en utilisant des éléments hydrophiles ou amphiphiles permettant de modifier leurs caractéristiques de surface<sup>87</sup>. Le choix de la taille adéquate des vecteurs peut également favoriser leur circulation en réduisant l'excrétion rénale par une diminution de la filtration glomérulaire<sup>88</sup>. Enfin, les nanoparticules polymériques de moins de 200 nm présentent une circulation accrue dans le sang, et donc un meilleur ciblage<sup>89</sup>.

Outre les voies d'entrée des particules et leur clairance, leur taille joue également un rôle important dans leur reconnaissance ou non par le système immunitaire inné. Cela n'est pas sans conséquence au niveau de la cytotoxicité et des effets secondaires.

### *Géométrie des particules*

La taille n'est pas l'unique paramètre physique important pour la durée de vie, la dynamique de circulation dans le sang, la biodistribution, les interactions cellulaires, et l'entrée des particules dans les cellules. En effet, il a été montré que la géométrie, l'élasticité, et la déformabilité des particules jouent également un rôle très important, notamment dans la réponse biologique aux particules<sup>90</sup>. Ces caractéristiques de taille, forme, et surface affectant la biodistribution et l'entrée cellulaire de manière interdépendante, il est possible d'utiliser un paramètre intégratif pour analyser les vecteurs, à savoir le rapport surface/volume (Surface-Area to Volume Ratio). Celui-ci augmente lorsque la taille de la particule diminue, et lorsque la géométrie se complexifie (Illustration II-2).



**Illustration II-2 : Impact de la géométrie des particules sur le ratio surface/volume.**  
 Une sphère de 5.5  $\mu\text{m}$  de diamètre (en haut à gauche) présente un SAV réduit par rapport à un érythrocyte biconcave (en haut à droite), tandis que le volume interne  $V_1$  est constant. Lorsque la taille de la particule diminue (sphère de 350 nm de diamètre, en bas à gauche), le SAV augmente de façon très importante ( $\times 1500$ ). Le SAV augmente encore plus ( $\times 6000$ ) lorsqu'on passe d'une sphère à un filomicelle (en bas à droite) de même volume interne ( $V_2$ ). (Source : Best *et al.*, 2012<sup>91</sup>)

Il a été constaté dans la littérature que la diminution logarithmique de la phagocytose des particules était associée à l'augmentation du SAV, alors que l'entrée dans les cellules cibles augmente de façon logarithmique grâce à l'amélioration de l'interaction de surface<sup>91</sup>. Ainsi, si l'on suit cette tendance, il serait donc plus intéressant d'utiliser, si ce n'est des particules de forme non sphérique, tout du moins des particules de la plus petite taille possible afin d'améliorer au maximum les capacités des particules choisies. Il a également été démontré, pour des nanoparticules de tailles inférieures à 100 nm, que les sphères ont un avantage par rapport aux tiges<sup>65,92</sup>. Si peu d'études se sont intéressées aux nanoparticules non-sphériques, il semblerait que leurs interactions avec les cellules soient plus complexes<sup>93</sup> : contrairement aux sphères, les nanoparticules longilignes ont la possibilité de présenter deux axes différents aux cellules, et interagissent alors de façon différente. En effet, l'axe long va interagir avec davantage de récepteurs cellulaires<sup>94</sup>. Dans le cas d'une structure irrégulière, étoilée, les interactions entre les nanoparticules vont se faire différemment selon que groupements servant de ligands soient situés sur les extrémités ou entre celles-ci<sup>95</sup>.

Les ligands ou groupements fonctionnels utilisés pour envelopper les nanomatériaux peuvent également affecter les réponses biologiques. Ainsi, l'entrée et la cytotoxicité de nanoparticules varient de manière significative lorsque celles-ci sont enrobées avec deux protéines différentes ciblant le même récepteur<sup>96</sup>. Nous verrons dans la partie suivante quelles sont les différentes possibilités d'enrobage des nanoparticules.

## 4. Fonctionnalisation

Les fonctionnalisations de surface, obtenues grâce à diverses conjugaisons chimiques, ont des objectifs variés. En effet, il peut s'agir à la fois de protéger les particules contre les enzymes environnantes, de les faire passer inaperçues auprès du système immunitaire, d'améliorer leur durée de circulation, etc., mais également – de manière très intéressante – de permettre leur suivi dans l'organisme. Il est toutefois important de porter une grande attention au choix des fonctionnalisations. En effet, certains groupements pourront avoir un impact bénéfique sur un point, comme par exemple l'entrée cellulaire, mais augmenter la reconnaissance des particules par le système immunitaire inné ou la cytotoxicité. Voici à présent un tour d'horizon succinct des fonctionnalisations possibles, de leurs avantages et de leurs inconvénients.

### *Echappement immunitaire*

La surface des nanoparticules est la plupart du temps leur seul point d'interaction avec le corps. Ainsi, si le corps reconnaît la surface comme étant potentiellement dangereuse, le vecteur va rapidement être éliminé par le système immunitaire<sup>97</sup>. En effet celui-ci semble posséder un ancien système d'alarme repérant les motifs associés aux pathogènes et entraînant une alerte du système immunitaire : cette alarme s'enclenche notamment lorsque des parties hydrophobes des cellules sont exposées ; il semble que ce soit un signal universel de danger permettant l'enclenchement d'une réponse immunitaire innée. La question qui se pose alors est de savoir si les particules dont la surface est hydrophobe engendrent le même type de réaction. Cependant l'adsorption des protéines du sérum notamment par les particules remet en cause cette théorie. C'est le concept de bio-couronne<sup>98</sup>.

Outre les protéines du sérum, il est important que l'ajout de molécules de fonctionnalisation en surface puisse protéger les nanoparticules, leur permettant d'accéder à leur cible et de remplir leur mission. Il est ainsi nécessaire d'éviter notamment l'opsonisation et la phagocytose des particules, diminuant le temps de circulation du vecteur, et l'empêchant de libérer son contenu<sup>97</sup>. Le poly(éthylène glycol) (PEG) est souvent employé pour éviter les adsorptions non spécifiques, et ainsi améliorer le temps de circulation : le PEG attire trois molécules d'eau par résidu, jouant le rôle de camouflage et de bouclier stérique<sup>99</sup>. Il est cependant nécessaire de modifier le PEG, et d'utiliser par exemple un dérivé phospholipidique car seul, le PEG n'interagit pas fortement avec d'autres molécules ou surfaces<sup>100</sup>

### *Amélioration de la stabilité*

La stabilité et la résistance des nanoparticules à la dégradation et à la clairance systémique sont également des paramètres importants à améliorer. Là encore, le greffage de PEG en surface est une solution intéressante pour sa versatilité et sa biocompatibilité, et sa capacité à protéger les nanoparticules de la dégradation par des RNases<sup>101</sup>. D'autres polymères présentant les mêmes propriétés hydrophiles que le PEG, tels que le poly(acrylamide) et le poly(vinyl pyrrolidane), peuvent également servir à renforcer la stabilité des nanoparticules<sup>102</sup>.

### *Ciblage tissulaire et cellulaire*

Lors de l'utilisation de nanoparticules en cancérologie, une certaine quantité de ciblage passif a été constaté, résultant en une accumulation préférentielle des particules dans les tumeurs. Ceci est dû notamment à l'amélioration de la perméabilité et de la rétention des macromolécules dans les tissus tumoraux (effet EPR), généralement expliquée par la production importante de vaisseaux sanguins dans les tumeurs afin de permettre leur croissance rapide. Ces vaisseaux néoformés sont généralement de mauvaise qualité, sans couche de muscle lisse, ni innervation, et engendrent des mouvements fluidiques et moléculaires anormaux<sup>103</sup>, ce qui va permettre le passage plus facile notamment des nanoparticules vers les cellules tumorales.

Ce ciblage passif n'est cependant pas suffisant, une quantité significative de nanoparticules accédant tout de même aux organes sains. De plus, dans les thérapies dirigées contre d'autres pathologies que les cancers, le ciblage passif n'existe pas, les organes ne présentant alors généralement pas de particularités vasculaires pouvant engendrer un effet EPR.

De nombreuses équipes se sont alors penchées sur le ciblage actif, et présentent régulièrement de nouveaux résultats de groupements ou de molécules permettant de diriger les nanoparticules vers leur cible<sup>104</sup>. Ces molécules peuvent cibler des récepteurs surexprimés dans certaines tumeurs, ou dans certains organes, comme le folate, présentant une très forte affinité pour le récepteur à l'acide folique, surexprimé plus de 100 fois dans certaines tumeurs<sup>105</sup>. De la même manière, le cholestérol permet d'augmenter la durée de circulation des nanoparticules ainsi que d'augmenter leur distribution passive au foie et au jéjunum *in vivo*<sup>106</sup>.

D'autres molécules, telles que les anticorps ou les aptamères sont également utilisées afin de permettre une liaison par des récepteurs spécifiques aux cellules ciblées. Il n'existe cependant pas pour l'instant d'anticorps efficaces disponibles pour toutes les cibles. Les aptamères, quant à eux, sont des séquences d'acides nucléiques présentant une structure tertiaire pouvant interagir spécifiquement avec une protéine ou une petite molécule. Leur avantage est qu'ils peuvent être créés et modifiés de façon à se lier à leur cible de façon le plus spécifique possible. De plus, le développement des techniques de screening et la création de

bibliothèques de séquences vont permettre rapidement de découvrir de nouvelles séquences d'aptamères dirigés vers des récepteurs cellulaires spécifiques<sup>101</sup>. Cela pourrait améliorer grandement l'efficacité de ciblage siRNA, donc de diminuer les quantités de nanoparticules délivrées, et ainsi de diminuer les effets off-target.

### *Entrée cellulaire et libération des siRNA*

Une fois les particules arrivées au niveau de leur cible tissulaire et cellulaire, il leur faut encore parvenir à traverser la membrane cellulaire. Cette étape n'est pas forcément la plus aisée du parcours, comme nous l'avons vu précédemment. Pour faciliter ce passage, il est possible d'améliorer les nanoparticules en y associant diverses molécules, comme les peptides de pénétration cellulaire (cell-penetrating peptides, CPP), penetratin ou transportin par exemple. Les CPP peuvent être issus des domaines de transduction protéique de certains virus, copiant leur capacité à traverser la membrane cellulaire, ou synthétisés suivant les caractéristiques des séquences des CPP naturels<sup>101</sup>.

D'autres molécules, nécessitant un stimulus environnemental, peuvent faciliter la libération des siRNA dans les cellules. En effet, un changement de température, de luminosité, ou encore de pH peut engendrer des modifications au niveau des nanoparticules<sup>101</sup>. Ainsi, l'environnement extracellulaire des tumeurs solides et des sites inflammatoires, mais également les endosomes, ont un pH significativement plus bas que les tissus avoisinants, ou le cytosol<sup>107,108</sup>. Cette caractéristique peut être utilisée pour permettre une libération volontairement déclenchée des siRNA grâce à l'utilisation de polymères synthétiques sensibles au pH comme le chitosan ou encore le poly(éthylène imine) (PEI)<sup>109</sup>.

Les PEI sont par ailleurs connus depuis des années pour leur relativement grande efficacité de transfection génique, initialement prouvée avec de l'ADN<sup>110,111</sup>. Ce sont des polymères hydrosolubles possédant une haute densité de charge cationique à pH physiologique grâce à leurs groupements amino- toutes les trois positions<sup>112,113</sup>. Dans des conditions physiologiques, environ 20 % des azotes du PEI sont protonés, lui permettant de s'associer de façon non covalente avec les acides nucléiques<sup>113</sup>. Une fois internalisés, les complexes PEI permettent une haute efficacité de transfection grâce à leur libération aisée des endosomes due à l'effet « d'éponge à proton »<sup>114,115</sup>.

### *Imagerie, suivi de la biodistribution*

Différents agents d'imagerie peuvent être utilisés pour fonctionnaliser les nanoparticules. Ces agents peuvent être insérés au cœur de la particule lors de sa synthèse, ou être ajoutés à sa surface par la suite. Il peut s'agir<sup>116</sup> :

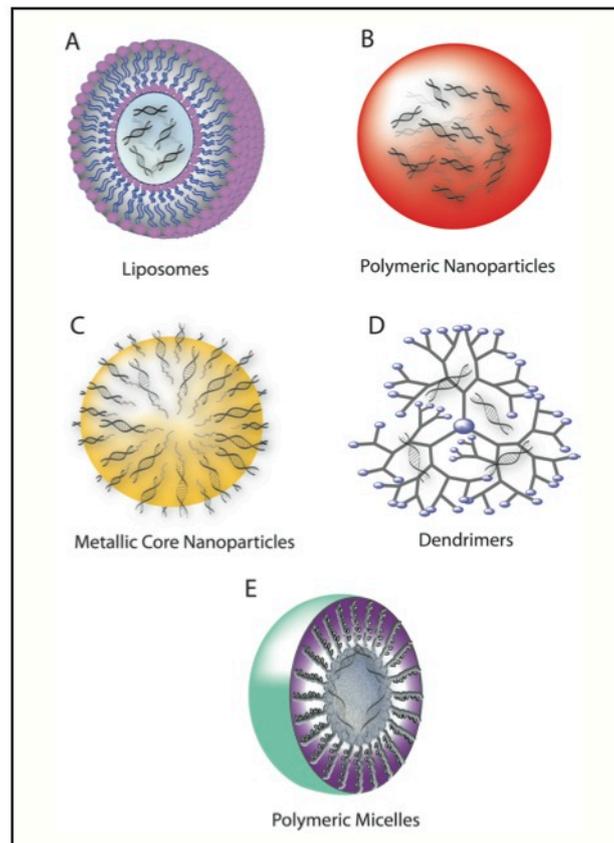
- ❖ d'agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), comme le Gadolinium (Gd) chélaté ou le Manganèse (Mn),
- ❖ de marqueurs fluorescents pour l'imagerie optique, tels que le vert d'indocyanine (ICG), ou l'Alizarine Complexone,
- ❖ d'éléments lourds pouvant être utilisés en tomographie (CT), comme l'Iode
- ❖ de radionucléides servant à la gamma scintigraphie (PET ou SPECT), comme F-18, In-111, ou Cu-64

Si le développement d'agents « théranostiques », associant des fonctions thérapeutiques et des fonctions diagnostiques en imagerie, est très à la mode, ces particules ne sont cependant pas forcément les mieux adaptées à toutes les situations. En effet, avoir la possibilité de suivre aisément le devenir des nanoparticules dans l'organisme est sans conteste très important et très intéressant, particulièrement lors de la mise en place de thérapies systémiques. Il faut néanmoins tenir compte du fait que ces agents hybrides peuvent perdre en efficacité en imagerie et en thérapie<sup>117</sup>.

Il a ainsi été montré que des liposomes marqués au Gd présentent en moyenne plusieurs centaines à plusieurs milliers de Gd par nanoparticules, contre des dizaines à des centaines de milliers de Gd par particule pour un agent de contraste « pur », soit seulement 1 %<sup>118,119</sup>. De la même manière, la liaison de petites molécules anti-cancéreuses telles que la doxorubicine sur des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) ne permet l'incorporation que de moins de 4 % vol/vol de molécules<sup>120</sup>, contre 30 à 70 % vol/vol dans le cas de vecteur dédié à la thérapeutique<sup>121</sup>.

## 5. Différents types de vecteurs : avantages et inconvénients

Au cours des dernières décennies, le développement des biomatériaux et l'essor des nanotechnologies a permis la multiplication des possibilités de transport de molécules (protéines, acides nucléiques, drogues, etc.). En effet, grâce à l'imagination sans borne des chercheurs, des vecteurs ont pu être créés à partir de matériaux aussi variés et intéressants que les lipides, les métaux, le verre, le diamant, et même les algues et la soie !



**Illustration II-3 : Différents types de vecteurs de siRNA**  
**A. Liposomes. B. Nanoparticules polymériques. C. Nanoparticules à cœur métallique.**  
**D. Dendrimères. E. Micelles polymériques (Source : Gavrillov et Salzman, 2012<sup>13</sup>)**

Chaque type de vecteur possède des caractéristiques de taille, de forme, de charge, etc. qui lui sont propres, offrant ainsi à chacun des avantages et des inconvénients à leur utilisation pour le transport de siRNA. Si chaque vecteur est différent, il existe toutefois un certain nombre de paramètres que tous doivent respecter. Ainsi, les vecteurs optimaux devraient être biocompatible, si possible biodégradable, et non-immunogène. Ils devraient également offrir un transport efficace des siRNA vers les cellules ou tissus ciblés, et les protéger contre les nucléases. Dans le cas d'une administration systémique, et afin d'éviter une clairance hépatique et rénale rapide, les vecteurs devraient idéalement être capables de cibler précisément le tissu ou les

cellules visés. Enfin, il est évidemment indispensable que les vecteurs soient capables de libérer les siRNA une fois dans les cellules.

### Qu'est-ce qu'une nanoparticule ?

Jusqu'à présent, aucun consensus n'a été trouvé concernant la définition d'une nanoparticule. Ainsi, d'un point de vue médical, le préfixe « nano- » s'applique à des matériaux ou des surfaces ayant été modifiées ou manipulées intentionnellement à l'échelle nanométrique dans le but de leur octroyer de nouvelles propriétés<sup>122</sup>.

Pour d'autres, une nanoparticule est une particule solide colloïdale mesurant de 1 nm à 1  $\mu\text{m}$ <sup>123</sup>. Les nanoparticules peuvent ainsi présenter des différences relativement importantes en taille, mais également en forme et en composition chimique (Table 1). Une troisième définition décrit les nanoparticules comme des particules de tout type de matériau présentant au moins une dimension égale ou inférieure à 100 nm<sup>124</sup>.

**Table 1 : Classification des vecteurs de taille nanométrique par composé chimique et par forme. (Modifié à partir de : Prijic and Sersa, 2011<sup>125</sup>)**

Composés chimiques		Exemples	Forme		
Organiques	Naturels	Lipides	Phosphatidylcholine d'œuf (EPC),	Liposomes	
		Protéines	Albumine sérique humaine (HSA), gélatine	Nanoparticules	
		Hydrates de C	Chitosan, alginate	Nanoparticules	
	Synthétiques	Lipides	Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), dimyristoyl phosphatidylglycérol (DMPG), Cholestérol (Ch)	Liposomes	
			Tricaprin, trilaurin, trimylistin, cétyl palmitate, acide stéarique	Nanoparticules lipidiques solides	
		Polymères	<b>Homopolymères :</b> poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (pHEMA), alcool polyvinylique (PVA), acide polyacrylique (PAA) <b>Copolymères :</b> poly(lactid acid)-co-poly(glycolic acid) (PLGA), poly(L,L-lactide-co-L- aspartic acid), poly(ethylene-co-vinyl acetate) (PEVA)	Dendrimères Nanoparticules Nanocomposites Nanobrosses Nanotubes Micelles Nanogels	
			Surfactants	<b>Cationiques :</b> Sodium dodécyl sulfate (SDS) <b>Anioniques :</b> Cétyl triméthylammonium bromide (CTAB) <b>Non-ioniques :</b> Copolymères d'oxyde de polyéthylène et d'oxyde de polypropylène	Micelles
			Lipides	DPPC/Ch/ $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Liposomes magnétiques
		Organiques et inorganiques	Polymères	Ni-Zn-ferrite/SiO <sub>2</sub> , Fe-Ni/polymère	Nanocomposites
Inorganiques	Magnétiques	Composés	Ni-Fe/SiO <sub>2</sub> , Co/SiO <sub>2</sub> , Fe-Co/SiO <sub>2</sub>	Nanocomposites	
		Composés	Iron : $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Nanoparticules	
			MgFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , FePt, NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Nanoparticules Nanotiges	
			<b>Nickel :</b> NiO, NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
			<b>Cobalt:</b> Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
			<b>Manganèse :</b> Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , MnO <sub>2</sub>		
		Non magnétiques	CdSe/ZnS	Nanocristaux	
	ZnO, Au, Ag, Cu, CdSe/ZnS, GaN, TiO <sub>2</sub> , C, TiC		Nanotiges Nanoparticules		
	<b>Calcium phosphate</b>		Nanocomposites		
	Eléments	C	Fullerènes Nanotubes		

Si beaucoup de types de nanoparticules peuvent servir de vecteurs moléculaires, notamment pour les siRNA, tous n'y sont cependant pas adaptés. Voici à présent un tour d'horizon des différents types de vecteurs régulièrement employés pour la vectorisation de siRNA.

### *Liposomes*

Les liposomes en tant que vecteurs thérapeutiques intéressent les chercheurs depuis plus de 40 ans, que ce soit pour le transport de drogues anti-cancéreuses, antifongiques, analgésiques, ou encore de vaccins.

Les liposomes sont des structures nanométriques à micrométriques composées d'une bicouche de phospholipides entourant un compartiment interne aqueux. Ce dernier va permettre l'encapsulation d'une grande variété de molécules hydrophiles, dont des siRNA<sup>104</sup>. La bicouche, quant à elle, va pouvoir renfermer des molécules liposolubles. Ses caractéristiques vont lui permettre de fusionner avec la membrane cellulaire, et ainsi libérer les siRNA dans le cytosol des cellules cibles par neutralisation. La voie des endosomes étant ainsi court-circuitée, les risques de destruction des siRNA qui y sont associés sont écartés. Les liposomes vont également protéger les siRNA des nucléases et en diminuer l'immunogénicité<sup>126</sup>. Le choix de lipides cationiques, contrairement aux lipides neutres, permet d'augmenter l'efficacité de transfection, relativement basse dans le cas contraire. Ceux-ci ont également la propriété de réduire la clairance rénale, et de présenter une toxicité relativement faible lorsqu'ils sont utilisés en petites quantités<sup>127</sup>. Il est cependant important de tenir compte des effets inflammatoires que les polycations engendrent *in vivo*, ainsi que des interactions non souhaitées avec les protéines du sérum chargées négativement, qui peuvent entraîner l'opsonisation et la clairance des complexes<sup>13</sup>.

Outre leurs propriétés intéressantes, les liposomes ont également la caractéristique d'être faciles à préparer. En effet, l'une des méthodes les plus simples et efficace est de mélanger simplement les liposomes cationiques avec les siRNA anioniques, entraînant la formation de complexes électrostatiques<sup>128</sup>. Un autre avantage des liposomes est que, quelles que soient les molécules transportées, la surface reste libre pour lier des ligands de ciblage ou des agents biocompatibles (PEG, chitosan, etc.)<sup>129</sup>.

Les liposomes cationiques possèdent un nombre d'avantages important (biocompatibilité, biodégradabilité, facilité de synthèse et de stockage), mais engendrent de la toxicité lorsqu'ils sont utilisés en grandes quantités comme cela est nécessaire pour les siRNA.

### *Micelles*

Les micelles polymériques, formées par association de blocs amphiphiles de copolymères, présentent une coque hydrophile, associée à un cœur hydrophobe permettant de stabiliser l'ensemble, et de protéger les molécules transportées. La greffe d'amines, ou l'utilisation de ponts disulfures, permet la complexation ou la conjugaison des siRNA<sup>13</sup>.

Au cours des dernières années, différents résultats ont d'ores et déjà été publiés, validant la capacité des micelles polymériques à transférer des siRNA. Ainsi, Matsumoto *et al.* ont montré qu'il était possible de transférer efficacement des siRNA dans des cellules de carcinome hépatocellulaire Huh7 à l'aide de micelles composées de PEG-bloc-poly(L-lysine) modifiées par iminothiolane [PEG-b-poly(L-lysine)]<sup>130</sup>. Les travaux de Benoit *et al.* ont également prouvé les capacités de ces nanovecteurs sur un modèle de cellules cancéreuses ovariennes résistantes aux traitements<sup>131</sup>. En effet, l'utilisation de micelles sensibles au pH a permis de rendre ces cellules sensibles à la doxorubicine grâce à l'inhibition partielle de l'expression génique de polo-like kinase 1 (plk1). Ces résultats montrent également l'intérêt de la combinaison de différents types de thérapies pour améliorer les effets des traitements.

### *Dendrimères et dendrosomes*

Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques, arborescentes, sphériques et monodisperses présentant une structure nanométrique tridimensionnelle. Elles sont synthétisées par des étapes de séquences réactionnelles itératives produisant une structure branchée précise et unique. Leur structure unique, associée à un poids moléculaire contrôlable, un grand nombre de groupes fonctionnels terminaux accessibles pour l'ajout de molécules de ciblage, de groupements de solubilisation ou autres, et la capacité d'encapsuler des molécules hôtes dans leurs cavités internes, font des dendrimères un choix intéressant pour le transport de drogues, et de siRNA en particulier<sup>132</sup>. Alors que leur taille nanométrique leur permet d'échapper au RES, l'augmentation du nombre de branchements est également associée à un temps de circulation plus grand avant excrétion par les urines<sup>133</sup>. Les dendrosomes présentent cependant une toxicité importante envers les systèmes biologiques. En effet, leurs charges positives interagissent avec les surfaces des cellules et des tissus chargées négativement, entraînant une toxicité hématologique.

Les dendrimères, associés aux siRNA, peuvent également être encapsulés dans une coque lipophile, formant alors des dendrosomes. Ceux-ci présentent une toxicité négligeable dans le sang, et une efficacité de transfection supérieure aux dendrimères. Ils sont également mieux tolérés *in vivo* que les dendrimères.

### *Polyplexes*

Les polyplexes, qui sont des complexes nanométriques de polymères cationiques (polycations) et d'acides nucléiques, sont des vecteurs de taille nanométrique ou micrométrique destinés à un transport systémique de siRNA ou d'ADN. Ceux-ci, facilement préparés par simple mélange, protègent les acides nucléiques des activités enzymatiques et de l'adsorption de protéines cationiques et facilitent l'entrée cellulaire<sup>134</sup>.

Le PEI est l'un des polycations les plus fréquemment utilisés, notamment en transfection *in vitro* et *in vivo* depuis 1995<sup>110</sup>. Il existe sous différentes formes, branché ou linéaire, et de différentes longueurs. Il présente une quantité importante de charges positives puisqu'environ 30 % des atomes sont de l'azote, pouvant être protoné à pH physiologique (à pH = 7,4, 20 % des amines sont protonées) et à pH acide (à pH = 5, il y a 45 % d'amines protonées)<sup>135</sup>. Ceci lui permet de s'échapper de l'endosome par un phénomène de d'absorption de protons (« *proton sponge* ») : l'ATPase présente sur les endosomes provoque une acidification de ceux-ci par sa fonction de pompe à protons. Ces protons vont charger le PEI, empêchant l'acidification des endosomes, et provoquant l'entrée de protons en grandes quantités pour atteindre le pH désiré. Pour compenser, un influx d'ions Cl<sup>-</sup> va se mettre en place, créant un choc osmotique aboutissant à la rupture des endosomes et à la libération de leur contenu dans le cytosol<sup>136</sup>. Ainsi, contrairement à d'autres types de polymères ou de nanoparticules, l'utilisation de PEI évite l'ajout d'agents endosomolytiques pour favoriser l'échappement endosomal.

Ce polymère présente cependant une certaine cytotoxicité lorsqu'il est de haut poids moléculaire. Pour y remédier, différents vecteurs ont été suggérés, utilisant des variantes de PEI tels que des conjugués PEI-PEG, ou des PEI dégradables<sup>137,138</sup>. Ceux-ci ont cependant, du fait de leurs propriétés intrinsèques, un temps de rétention très court de par leur dispersion aisée, limitant d'autant l'efficacité de potentielles thérapies. De plus, puisqu'ils sont administrés de manière systémique, les polyplexes peuvent également induire des transfactions non-spécifiques, ou encore, comme les siRNA seuls, des réponses immunitaires systémiques.

### *Hydrogels*

Si la plupart des techniques de vectorisation utilisées actuellement sont envisagées dans le cadre du transport systémique des siRNA, quelques-unes se fondent plutôt sur une libération locale. En effet, dans le cas où l'organe ou la tumeur à traiter est accessible facilement, un vecteur local pourrait fournir de grandes concentrations de siRNA directement au niveau du site cible pendant une période suffisante. Même si ces techniques ne sont pas applicables dans toutes les configurations, elles permettraient de s'affranchir des inconvénients associés aux vecteurs

systemiques (temps de rétention court, dispersion dans tout l'organisme, atteinte d'organes non-spécifiques, réaction immunitaire, inflammation, etc.).

Parmi ces vecteurs, les hydrogels injectables possédant une transition sol/gel stimuli-dépendante présentent des avantages intéressants. Ainsi, ceux-ci ne sont que peu invasifs, permettent un traitement local, et la libération prolongée des siRNA contenus. Ils peuvent être composés de matériaux divers, tels que l'alginate polymérisé par le calcium, alginate photopolymérisé, le chitosan, ou encore le collagène<sup>139,140</sup>. L'inconvénient de ces vecteurs est que les siRNA doivent être chargés dans le gel, puis libérés sous leur forme nue, ce qui réduit considérablement leur durée de vie, mais également l'efficacité d'interférence ARN, le gel ne possédant pas de fonctions permettant de livrer les siRNA aux cellules<sup>134</sup>.

Pour surmonter cet obstacle, ainsi que les inconvénients des polyplexes, des hydrogels de polyplexes ont été formulés. Ceux-ci sont composés d'un complexe de siRNA et d'un polymère cationique présentant une transition sol/gel température dépendante, permettant de libérer des polyplexes nanométriques sur une longue durée et avec une grande efficacité d'interférence ARN. Cela est possible grâce à l'ajout de groupements capables de retenir les siRNA en les complexant, puis de les libérer<sup>134</sup>.

### *Nanotubes de carbone*

Les nanotubes de carbones (CNT) présentent des caractéristiques intéressantes pour les applications biomédicales, notamment la vectorisation de molécules. Les CNT et leurs dérivés fonctionnalisés ont montré sont compatibles avec un environnement aqueux, et ne sont pas toxiques pour les tissus et les cellules mammifères<sup>128</sup>. Les nanotubes peuvent posséder une (singlewalled carbon nanotubes) ou plusieurs (multiwalled carbon nanotubes) épaisseurs, et peuvent être modifiés à l'aide de biomolécules chargées positivement, tels que des groupements ammonium ou des acides aminés cationiques (Lysine), assurant la complexation avec les siRNA<sup>141</sup>. Cette association nanotubes-polymères cationiques semble d'ailleurs pouvoir diminuer la toxicité des polymères nus (polyamidoamine, PAA ; PEI)<sup>142</sup>. De la même manière, les CNT fonctionnalisés avec PAA ou PEI ont une meilleure efficacité de transfection que ces derniers seuls.

Malgré ces propriétés intéressantes, les CNT ne sont pas biodégradables, et posent de ce fait le problème de leur déposition dans les organes, et de la cytotoxicité associée<sup>143</sup>. Le peu de données actuellement disponibles concernant la préparation des échantillons, la caractérisation des CNT, ainsi que le nombre de paramètres et de contrôles internes effectués font qu'il est nécessaire de compléter les connaissances sur les CNT avant de pouvoir envisager leur utilisation pour le transport de siRNA chez l'Homme<sup>128</sup>.

### *Nanoparticules d'or (AuNP)*

Les AuNP sont au centre de l'attention, que ce soit dans le domaine du biodiagnostic, de la bioimagerie, ou encore dans celui du transport d'acides nucléiques pour diverses thérapies. En effet, les propriétés optiques de l'or, telles que la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR), font des AuNP un outil intéressant, pour le diagnostic notamment<sup>144</sup>. Outre leurs caractéristiques optiques particulières, les AuNP présentent également une surface aisément fonctionnalisable, permettant une conjugaison sans agrégation de biomolécules. De plus, leurs taille et forme sont facilement contrôlables lors de leur synthèse aisée, rendant ces populations monodisperses prometteuses pour l'utilisation en thérapie<sup>128</sup>.

De manière conventionnelle, les siRNA sont immobilisés en surface des AuNP, formant des conjugués siRNA-AuNP possédant une meilleure demi-vie dans le sérum et une capacité d'interférence ARN augmentée<sup>145</sup>. Les AuNP peuvent également être recouvertes de polymères cationiques pour renforcer l'activité d'interférence<sup>146</sup>. La structure des particules permet également leur enrobage couche par couche avec, par exemple, du PEI et les siRNA, formant un complexe PEI/siRNA/PEI-AuNP stable<sup>147</sup>. La grande stabilité de l'ensemble retarde cependant la libération des siRNA dans le cytoplasme. Cet inconvénient peut être supprimé par l'ajout d'un copolymère à réversion de charge : celui-ci subit une conversion de charge dans l'environnement acide de l'endosome ou du lysosome, entraînant la rupture des vésicules et la libération des siRNA<sup>148</sup>. Enfin, il a été montré que la toxicité des AuNP est minime. Malgré tous ces avantages, reste l'inconvénient non-négligeable de la non-dégradabilité et de la rémanence des particules bien après le traitement, comme pour les nanotubes de carbone.

### *Nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN)*

Les MSN possèdent des propriétés structurales et fonctionnelles uniques, en faisant d'intéressant vecteurs de siRNA. En effet, leur structure mésoporeuse stable et leur grande surface parfaitement définie chimiquement, ainsi que la possibilité de choisir la taille des porosités et d'encapsuler de petites molécules en font des systèmes de transports très attractifs<sup>146</sup>. Ces particules sont également biocompatibles, et leur synthèse facile permet de jongler avec leur taille, forme et surface aisément<sup>149,150</sup>. La première utilisation de MSN pour le transport de siRNA a été publiée en 2009. Il a alors été fait usage de PEI adsorbé de façon non covalente à la surface des MSN afin de favoriser l'inhibition d'expression génique du gène ciblé<sup>151</sup>.

La possibilité d'encapsuler de petites molécules dans les pores des particules en addition de la liaison de siRNA à leur surface pourrait faire des MSN un vecteur de siRNA très intéressant, notamment dans le cadre de thérapies multiples, associant par exemple drogue et siRNA. Il est

également possible d'y additionner une grande diversité de groupements fonctionnels en surface, afin d'augmenter la biocompatibilité, et de diriger les particules vers un tissu ou des cellules cibles, par exemple. Si les particularités des MSN sont intéressantes et permettent d'envisager de nombreuses possibilités de traitement, la taille de ces particules est cependant généralement bien supérieure à 100 nm, ce qui est à prendre en compte pour la biodistribution des particules, comme nous le verrons ultérieurement.

### *Quantum dots*

Les quantum dots (points quantiques) sont des particules de très petite taille (1 à 10 nm) possédant des caractéristiques optiques en faisant d'excellents outils d'imagerie, surpassant les sondes fluorescentes<sup>152</sup>. Celles-ci sont cependant toxiques pour les cellules mammifères. En effet, ces vecteurs sont constitués de métaux lourds pouvant subir un lessivage dans un environnement biologique. Cet obstacle peut toutefois être surmonté en modifiant la surface des quantum dots avec différents ligands, permettant d'une part d'en supprimer la toxicité, et d'autre part de les rendre aptes au transport de siRNA : les modifications de surface peuvent permettre aux quantum dots de protéger les siRNA, de faciliter la pénétration cellulaire, la protection endosomale, ou encore la libération et le transport intracellulaire<sup>153</sup>. Si les modifications de surface des particules les rendent momentanément biocompatibles, le cœur de métaux lourds n'en est pas moins intact, et sera libéré dans le système lors de la dégradation des quantum dots, posant alors les mêmes problèmes de toxicité que les quantum dots nus. Cet écueil empêche malheureusement de profiter de l'important potentiel de ce vecteur en thérapie, c'est pourquoi des recherches sont en cours pour développer des quantum dots non toxiques dépourvus de métaux lourds.

Une nouvelle stratégie sonochimique a d'ailleurs été développée récemment pour synthétiser des quantum dots biocompatibles  $Zn_xS-Ag_yIn_{1-y}S_2$  (ZAIS). Ceux-ci pourraient être utilisés comme nanoparticules multifonctionnelles, permettant simultanément d'imager et de libérer des siRNA au niveau, par exemple, de cellules de tumeurs cérébrales, et ce avec une cytotoxicité négligeable<sup>154</sup>. Si cet ajout d'un enrobage épais biocompatible possède de nombreux avantages, il a cependant l'inconvénient de potentiellement modifier les propriétés des quantum dots vecteurs de siRNA en altérant leur taille<sup>128</sup>.

### *Nanoparticules magnétiques*

Les nanoparticules magnétiques ont à l'origine été développées pour une utilisation comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Récemment, de nouvelles méthodes de synthèse et de modification de surface en ont fait des nanovecteurs efficaces. En effet, des biomolécules peuvent y être liées en surface à l'aide de connecteurs

clivables, ou par interactions électrostatiques<sup>155</sup>. Le concept de ciblage et de livraison d'acides nucléiques par des particules magnétiques (ou magnétofection) est relativement simple et efficace : les nanoparticules magnétiques contenant les siRNA ou autres acides nucléiques, injectées par voie sanguine, peuvent être dirigées vers les tissus ciblés par l'application d'un champ magnétique<sup>125</sup>.

Les nanoparticules magnétiques sont généralement enveloppées dans un polymère ou une capsule métallique, ou dispersées dans une matrice polymérique (silice, dextran, etc.), permettant d'augmenter leur stabilité et de conjuguer aisément les siRNA par l'intermédiaire de groupements carboxyle, d'anticorps, etc<sup>128</sup>.

Si les nanoparticules magnétiques semblent être prometteuses tant en matière de diagnostic que pour la vectorisation, notamment de siRNA, certains inconvénients sont encore à résoudre. En effet, comme beaucoup d'autres nanovecteurs, les nanoparticules magnétiques présentent un potentiel cytotoxique conséquent : l'ionisation du fer des particules entraîne la production de radicaux hydroxyles par réaction de Fenton avec le peroxyde d'hydrogène<sup>128</sup>.

### *Nanoparticules composites de phosphate de calcium (CPnp)*

Le phosphate de calcium, élément central des dents et des os, est un matériau biodégradable et biocompatible de grand intérêt à la fois pour les applications dentaires et osseuses, mais également dans le domaine des nanoparticules. En effet, les différentes propriétés du phosphate de calcium en font un matériau des plus intéressants pour le domaine de la vectorisation. Ainsi, différentes études ont été menées dans des buts thérapeutiques et d'imagerie, utilisant des phosphosilicates de calcium, de l'hydroxyapatite, ou encore des composites de phosphate de calcium et de polymères ou de lipides. Si la structure de base de ces composés est proche, la façon de les employer dans les nanoparticules diffère cependant<sup>156</sup>.

En effet, alors que les CPnp « classiques » permettent principalement une fonctionnalisation de surface, les nanoparticules de phosphosilicate de calcium peuvent encapsuler des marqueurs ou molécules thérapeutiques, les protégeant ainsi lors de la circulation des particules dans l'organisme<sup>157</sup>. Les nanoparticules d'hydroxyapatite, quant à elles, du fait de leur structure cristalline, sont plus fluorescentes en présence de lanthanides que les CPnp amorphes<sup>158</sup>. Enfin, les nanoparticules composites associant aux CPnp des lipides et des polymères semblent prometteurs à la fois pour la vectorisation de marqueurs hydrophobes, et de nucléotides<sup>159</sup>.

## 6. Un vecteur de choix : les nanoparticules de phosphate de calcium enrobées

Comme mentionné précédemment, les nanoparticules de phosphate de calcium sont des candidats très intéressants pour l'utilisation *in vivo* grâce à leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. De plus, leur mode de synthèse aisé permet l'insertion au sein des phosphates de calcium de diverses molécules, telles que des agents d'imagerie, comme l'Alizarin complexone ou l'ICG. Malgré ces qualités, l'ajout d'un agent de transfection efficace est toutefois nécessaire pour compléter ce vecteur prometteur.

Il a été montré précédemment que l'ajout d'une couche de PEI à la surface des CPnp permet d'améliorer grandement l'efficacité de transfection d'ADN de l'ensemble par rapport à l'efficacité des différents éléments séparément<sup>160,161</sup>. Les complexes PEI/siRNA, quant à eux, sont cependant très instables. En effet, les liaisons PEI/siRNA sont trop faibles pour maintenir une cohésion au sein du polyplexe. L'ajout d'acides aminés hydrophobes a alors été proposé afin de rendre le PEI auto-agrégant et augmenter la cohésion du polyplexe PEI/siRNA. C'est pourquoi des polymères tels que le PEI-tyrosine et le PEI-pyridine ont été synthétisés, permettant d'obtenir une interférence génique efficace *in vitro*<sup>162,163</sup>.

L'effet de ces complexes ne dépasse cependant pas plus de quelques jours. Il nous est alors paru intéressant de combiner les propriétés de ces complexes de dérivés de PEI/siRNA avec celles des CPnp. Cette idée a été exploitée dans ce travail, engendrant des CPnp enrobées de couches alternées de PEI-tyrosine ou PEI-pyridine et de siRNA stabilisées grâce aux inversions de charges.

### III. Modèles utilisés

#### 1. Modèle d'infection in vitro : virus de l'hépatite C

##### *Origine du virus et transmission*

Le virus de l'hépatite C (HCV) est le seul virus du genre *Hepacivirus*, et appartient à la famille des Flaviviridae<sup>164</sup>. Ses variants sont divisés en 7 géotypes et différents sous-types ciblant des groupes de risques et des régions géographiques distincts<sup>165</sup>. Il a été découvert en 1989<sup>166</sup>, suite aux interrogations croissantes des cliniciens et des épidémiologistes face aux cas toujours plus nombreux d'hépatites chroniques non-A, non-B liées aux transfusions sanguines et à l'utilisation de dérivés sanguins en thérapie<sup>167,168</sup>.

Le HCV infecte environ 170 millions de personnes dans le monde de manière chronique, soit 3 % de la population, et il semble qu'il y ait entre 3 et 4 millions de nouveaux cas par an<sup>169</sup>. Cette infection, qui a débuté dans les années 1960, s'est vraisemblablement propagé non seulement par les transfusions sanguines et l'utilisation médicale de seringues non stériles, mais également par le partage de seringues chez les consommateurs de drogues<sup>170</sup>. Grâce à la mise en place de contrôles du sang lors des transfusions, ainsi qu'aux campagnes de prévention des infections par échanges de seringues, la croissance de la population infectée est heureusement ralentie. Contrairement aux idées reçues, la transmission par voie sexuelle ou mère-enfant est inefficace et relativement rare<sup>171</sup>.

Si la source des infections par le HCV chez l'Homme n'est pas encore connue, l'hypothèse d'une origine primate, selon le modèle du HIV-1 est tentante. L'accroc dans cette théorie est l'absence de cas de HCV ou d'homologues découverts chez les singes. De manière assez surprenante, des virus similaires ont cependant été retrouvés chez le chien et chez le cheval<sup>172,173</sup>.

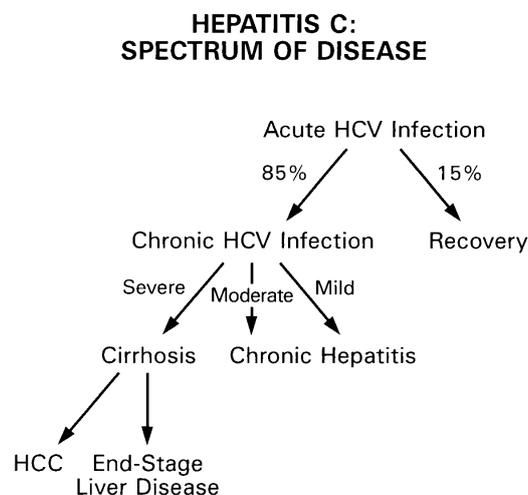
##### *Infection par le HCV*

La phase aiguë de l'infection par le HCV est généralement asymptomatique, ou associée à des symptômes non spécifiques, apparaissant entre 2 semaines et 6 mois après l'infection. En effet, seul un quart des patients infectés présente une jaunisse, et 10 à 20 % souffrent de symptômes aspécifiques tels que l'anorexie, des malaises, de la fatigue, ou encore des douleurs abdominales<sup>174</sup>. La phase aiguë de l'infection, dans de très rares cas (1 %), peut se transformer en hépatite fulminante mortelle à très court terme.

Dans environ 20 % des cas, la clairance virale est observée après cette phase initiale de l'infection, probablement grâce à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. En effet, une réponse cellulaire, grâce à la multiplication de lymphocytes T spécifiques du HCV, et une réponse humorale, par la production d'anticorps neutralisants (nAb), surviennent généralement quelques mois après l'infection<sup>175,176</sup>. Cependant, comme le montrent les statistiques, ces réponses ne sont dans la grande majorité des cas pas suffisantes pour supprimer l'infection, qui évolue alors vers une phase d'infection chronique<sup>177</sup>.

Dans les pays développés, le HCV est la cause principale d'hépatite virale chronique. Celle-ci est insidieuse, et les symptômes sont généralement inexistantes ou minimes. De ce fait, l'hépatite n'est souvent détectée que par la constatation d'un fonctionnement anormal du foie (niveaux élevés de transaminases hépatiques) au détour d'un examen de contrôle. Elle est considérée comme chronique lorsque la présence d'ARN du HCV est détectable 6 mois après l'infection.

Du fait de la variabilité de son développement, et de l'absence de signes énonciateurs, il est relativement difficile de déterminer précisément l'histoire naturelle de l'hépatite C. En effet, les issues sont diverses, allant de la lente progression de la maladie sur 50 ans au développement rapide d'une cirrhose en 5 ans. Il est de ce fait difficile de définir et de prédire la répartition statistique des patients entre ces deux extrêmes et toutes les éventualités intermédiaires. On considère que 20 à 30 % des patients infectés développeront à terme une pathologie hépatique (fibrose, ascite, cirrhose, etc.), et 2,5 % souffriront d'un carcinome hépatocellulaire (HCC)<sup>178</sup>, un des cancers les plus fréquents et les plus mortels<sup>179</sup>. En Europe, il y a 10 fois plus de cas d'infection par le HCV que par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), et environ 1 % de la population française serait porteuse, soit 600 000 personnes.



**Illustration III-1 : Diagramme de l'évolution de l'hépatite C.**  
(Source : Hoofnagle, 1997<sup>180</sup>)

### *Traitements de l'hépatite C présents et futurs*

Malgré l'intérêt bien présent des équipes de recherches, aucun vaccin ciblant le HCV n'a pu être développé pour l'instant, notamment du fait de sa grande variabilité génétique. En effet, non seulement l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus ne possède pas d'activité correctrice exonucléasique, mais le HCV est également un virus à grande vitesse de réplication *in vivo* ( $10^{10}$  à  $10^{12}$  virions/jour)<sup>181</sup>.

Si la suppression totale de l'infection est avérée chez certains individus traités, cet événement est rare, et les patients nécessitent souvent une transplantation hépatique. Cette indication engendre d'ailleurs le plus grand nombre de transplantations : en effet, 40 à 50% des transplantations réalisées et des patients sur liste d'attente concernent des cas d'infection par le HCV<sup>182</sup>. La greffe n'est cependant qu'une solution provisoire, malheureusement, puisqu'une réinfection du greffon est observée dans 100 % des cas, et la maladie progresse alors plus rapidement que précédemment<sup>183</sup>.

Il existe un certain nombre d'obstacles à l'efficacité du traitement (SOC, standard of care) proposé actuellement aux patients. En effet, outre une toxicité élevée, ce traitement, interféron-alpha ( $IFN\alpha$ ) et ribavirine, est onéreux, et le virus y développe rapidement une résistance<sup>184</sup>. De plus, son efficacité varie de manière importante selon le génotype viral. Ainsi, moins de la moitié des patients atteints par le génotype 1, génotype dominant retrouvé dans plus de 2/3 des infections, répondent à ce traitement, alors que 80 % des patients infectés par les génotypes 2 ou 3 développent une réponse virologique soutenue (SVR, sustained virological response)<sup>185,186</sup>.

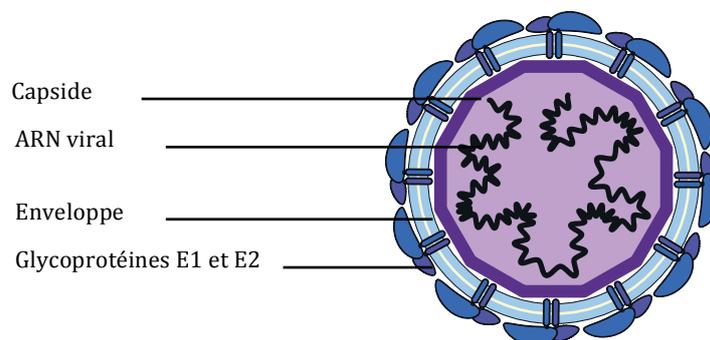
Pour pallier aux failles de ces traitements, de nouvelles molécules (DAA, direct acting antiviral), telles que le boceprevir (Merck) et le télaprévir (Vertex/Janssen), ont été élaborées. Dirigés contre les protéines du virus, ces inhibiteurs favorisent la réponse virologique, et diminuent la toxicité et les résistances au traitement<sup>187</sup>. Les deux molécules précitées ont d'ailleurs reçu l'autorisation d'utilisation en 2011 sur des patients atteints par le génotype 1. Les premiers résultats sont positifs, puisque l'ajout de ces molécules au SOC permet de diminuer le temps de traitement et d'augmenter la SVR dans de nombreux cas<sup>188</sup>. Ces anti-viraux, malgré l'amélioration considérable apportée au SOC, n'agissent pas contre tous les génotypes, et des effets secondaires néfastes ont été observés. De plus, parmi les différents variants présents chez un même patient, certains peuvent être résistants aux DAA, et se multiplier jusqu'à compenser les variants inhibés par le traitement. Enfin, bien que ces nouvelles molécules aient apporté de nombreuses améliorations aux traitements, leur efficacité n'est pour l'instant malheureusement pas suffisante pour pouvoir supprimer l' $IFN\alpha$  et ses inconvénients des thérapies<sup>189</sup>.

Outre les DAA, des recherches sont actuellement menées sur de nouvelles substances potentielles, les agents ciblant l'hôte (HTA, host targeting agent). Visant l'hôte, génétiquement stable, ces molécules prometteuses présentent l'avantage non négligeable de ne pas être sensibles aux variants ou aux différences entre génotypes. En effet, les HTA vont pouvoir être utilisés selon deux méthodes complémentaires : stimuler l'immunité innée, ou bloquer la propagation de l'infection en s'attaquant aux différents éléments de l'hôte indispensables aux étapes-clé de la prolifération du HCV<sup>190</sup>. Ces molécules agissant selon des voies différentes de celles du SOC ou des DAA, elles apportent également l'espoir de voir se développer une synergie entre ces différents traitements, permettant alors de diminuer les doses de chaque substance, et ainsi peut-être de supprimer un certain nombre d'effets secondaires.

Malgré toutes les qualités de ces nouveaux traitements potentiels, il existe une donnée qu'il est indispensable de prendre en compte. En effet, si les facteurs de l'hôte servent à la prolifération virale, leur présence chez l'hôte n'est pas innocente : chaque molécule possède une fonction initiale, bien avant d'être détournée par le virus. Il faudra donc s'assurer que la mise en place de traitements visant les facteurs de l'hôte ne se fasse pas au détriment de fonctions vitales des cellules ou des organes, ou que leur action rester très ciblée, touchant les cellules infectées uniquement.

### *Le virus*

Le HCV est un virus à ARN simple brin positif de 9.6 kb et d'environ 60 nm<sup>166,191</sup>. Son génome comporte une région codante encadrée par deux régions non traduites, 3'UTR et 5'UTR, cette dernière contenant le site d'entrée ribosomique interne (IRES, internal ribosome entry site). Cet ARN génomique est entouré d'une nucléocapside protéique, elle-même recouverte d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées des glycoprotéines.

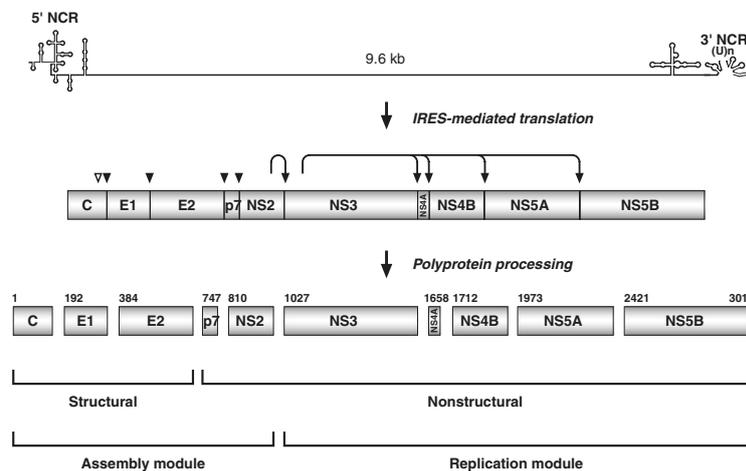


**Illustration III-2 : Représentation schématique de la particule du HCV.**  
(Source : Lindenbach, 2013<sup>192</sup>)

Dans le sang, le HCV peut se lier à différentes lipoprotéines, produisant des particules virales de densités variables (LDL, VLDL,...) contenant des triglycérides et les apolipoprotéines B

et E (ApoB et ApoE). Les particules de faible densité, nommées lipo-viro-particules (LVP), sont plus infectieuses que celles de haute densité<sup>193</sup>.

Le HCV est composé de 4 protéines structurales – la protéine de capsid (C, ou Core), la protéine p7, et les glycoprotéines d’enveloppe E1 et E2 – ainsi que de 6 protéines non structurales – NS2, NS3, NS4A et B, et NS5A et B<sup>194</sup>. Ces protéines sont codées par le génome du virus sous forme d’une polyprotéine qui sera clivée par des protéases à la fois virales et cellulaires, pendant et après la traduction. Les régions non traduites 5’ et 3’ NTR sont indispensables au virus. En effet, en 5’ se trouve l’IRES, région très structurée et conservée, indispensable à la traduction de l’ARN viral. Ces caractéristiques font de cette séquence une cible idéale pour les traitements par interférence ARN notamment. Outre son rôle dans la traduction, la région 5’UTR contiendrait également des éléments nécessaires à la réplication du virus, tout comme la région 3’UTR<sup>195</sup>.



**Illustration III-3 : Organisation génétique et protéines du HCV.**  
(Source : Moradpour et Penin, 2013<sup>196</sup>)

### *Les protéines structurales*

Comme mentionné précédemment, le HCV code 4 protéines structurales. La première, la protéine C, constitue la nucléocapside. Elle est indispensable à l’assemblage et à la libération des virions, se liant aux gouttelettes lipidiques au niveau du RE, et joue également un rôle lors de l’entrée du virus<sup>197,198</sup>.

Les protéines E1 et E2 sont des glycoprotéines transmembranaires indispensables à l’entrée du HCV<sup>199</sup>. E1 semble aider le virus à fusionner avec la membrane et à être internalisé<sup>200</sup>. E2, quant à elle, possède des zones de séquences hypervariables, mais de structure conservée – en faisant une cible privilégiée du système immunitaire –, et participe par sa variabilité à l’échappement du virus sous forme de quasi-espèces chez un même hôte<sup>177,201,202</sup>.

Les fonctions de la protéine p7, quant à elle, sont encore méconnues. Elle est assimilée aux viroporines car elle forme un canal ionique par oligomérisation, et semble nécessaire à l'infection, et à l'assemblage et à la sécrétion des virions<sup>203,204</sup>.

### *Les protéines non-structurales*<sup>196</sup>

La protéine transmembranaire NS2 participe à la production des particules virales, et est un élément indispensable du cycle du HCV. L'association NS2-NS3 forme l'autoprotéase NS2-3 qui permet de séparer NS2 de NS3. Cette dernière, associée avec NS4A, poursuit le clivage de la polyprotéine ; elle possède également une activité hélicase, et participe à la réplication de l'ARN, ainsi qu'à la formation des particules virales.

NS4B permet la formation du « complexe de réplication » à partir des membranes du RE, dans lequel se passe la réplication virale. NS5A est également associée au RE, et participe à la formation du complexe de réplication. Enfin, NS5B est une ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd). Ancrée au RE, cette protéine est indispensable à la réplication du virus. C'est également une cible d'un grand intérêt pour les antiviraux.

### *Les facteurs hôtes*

Comme la plupart des virus, le HCV exploite les facteurs de la cellule hôte pour son propre cycle, de l'entrée à l'export des virions. Ceux-ci ont toute l'attention des équipes de recherche, étant donné le potentiel de chaque facteur en tant que HTA. Voici à présent une description succincte des principaux facteurs hôte d'intérêt découverts jusqu'à présent.

#### *Les facteurs d'attachement*

Les particules virales acheminées jusqu'au foie par le sang. Les hépatocytes n'étant pas toujours en contact direct avec la circulation sanguine, les virus pourraient dans un premier temps être capturés par les cellules endothéliales et les macrophages hépatiques (cellules de Kupffer). E1 et E2 vont ensuite se lier à différents facteurs membranaires des hépatocytes, « amarrant » le virus à sa cible. Jusqu'à présent, trois catégories de facteurs d'attachement ont été mises en évidence :

- ❖ Les lectines de type C (DC-SIGN et L-SIGN) : ces molécules se lient à E2, mais ne sont pas exprimées par les hépatocytes, mais par les cellules de Kupffer, certaines cellules immunitaires (DC-SIGN), et par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (L-SIGN). Elles pourraient alors aider à l'infection en capturant les virions et en les transmettant aux hépatocytes<sup>205</sup>.

- ❖ Les glycosaminoglycanes (GAG) : ce sont des polysaccharides linéaires de surface présent sur de nombreux types cellulaires dans le corps humain. Il a été montré que les GAG, et notamment les GAG hautement sulfatés comme l'héparane sulfate (HS) interagissent avec divers virus, comme ceux de la fièvre jaune ou de la dengue<sup>206-208</sup>. Ces molécules étant ubiquitaires, leur affinité et leur spécificité de liaison au HCV – par E2 probablement – doit être limitée. Elles permettent cependant de lier la particule virale à la cellule, et rendent ainsi plus aisées les interactions avec d'autres récepteurs plus rares, mais de plus haute affinité<sup>205</sup>.
- ❖ Le récepteur aux LDL (LDLR) : comme mentionné précédemment, le HCV forme des virolipoparticules en association avec les LDL et les VLDL dans le sang, contenant notamment ApoB et ApoE, respectivement, principaux ligands de LDLR<sup>209</sup>. L'interaction des virolipoparticules, probablement par les lipoprotéines avec LDLR, pourrait jouer un rôle dans l'entrée du HCV<sup>210</sup>.

### Les facteurs d'entrée

Les facteurs d'entrée jouent un rôle très important dans l'infection par le HCV. En effet, les cellules non-hépatiques, qui ne permettent normalement pas l'entrée du HCV, deviennent permissives si les quatre récepteurs humains du HCV présentés ci-après sont co-exprimés<sup>211</sup> :

- ❖ Le récepteur scavenger de classe B de type I (SR-BI, ou CLA-1) : ce récepteur de lipoprotéines est ubiquitaire, mais présente une expression plus importante au niveau hépatique et surrénal<sup>212</sup>. Il joue un rôle dans l'attachement et le transfert lipidique en association avec HDL, LDL et VLDL, et participe au métabolisme du cholestérol<sup>213</sup>. Un réarrangement de la bicouche lipidique cellulaire a été observé suite à la liaison E2/SR-BI, permettant de rapprocher le virus des autres facteurs d'entrée<sup>214</sup>. Grâce à sa fonction d'endocytose de ses ligands, SR-BI pourrait également faciliter l'entrée du HCV<sup>215</sup>. Des anticorps anti-SR-BI sont en cours de développement, et pourraient empêcher la réinfection hépatique après transplantation, ainsi que l'échappement du HCV pendant ou suite à un traitement<sup>216</sup>.
- ❖ CD81 : cette glycoprotéine fait partie de la famille ubiquitaire des tétraspanines, qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire ou de l'adhérence, ainsi que dans d'autres voies de signalisation<sup>217</sup>. CD81 est le premier récepteur du HCV identifié, et semble jouer différents rôles dans le cycle viral, notamment au niveau de la réplication<sup>218,219</sup>. Son expression dans des cellules normalement non permissives au HCV les y rend sensibles<sup>220</sup>, tandis que les anticorps anti-CD81, en inhibant son interaction avec E2, neutralisent l'infection par le HCV de différents géotypes<sup>221</sup>. Chez des souris possédant un foie

humanisé, les anticorps anti-CD81 injectés en prophylaxie empêchent totalement l'infection par le virus, montrant que cette molécule est indispensable à l'infection<sup>222</sup>.

- ❖ La protéine jonctionnelle transmembranaire claudine-1 (CLDN1) : les hépatocytes sont des cellules polarisées, dont la partie apicale, formant la lumière des canaux biliaires, est séparée de la partie basolatérale, en contact avec le sang, par les jonctions serrées<sup>223</sup>. CLDN1 se situe au niveau de ces jonctions, et participe à l'étanchéité de celles-ci, se liant à la *zonula occludens* et au cytosquelette. Si CLDN1 est exprimée principalement dans la partie apicale des cellules, il existe aussi des molécules de CLDN1 au niveau basolatéral, de façon co-localisée avec SR-BI et CD81<sup>224</sup>. CLDN1 est le troisième récepteur du HCV, et, comme CD81, la diminution de son expression ou son blocage par des anticorps inhibe l'entrée du virus, tandis que le HCV parvient à pénétrer dans des cellules non permissives lorsque CLDN1 y est exprimée<sup>225,226</sup>. CLDN6 et CLDN9, appartenant également à la famille des Claudine, participent aussi à l'entrée du virus<sup>227</sup>.
- ❖ La protéine jonctionnelle transmembranaire occludine (OCLN) : cette molécule est le 4<sup>ème</sup> facteur d'entrée du HCV. En effet, il a été montré que la présence conjointe de SR-BI, CD81 et CLDN1, sans OCLN, n'est pas suffisante pour permettre l'infection virale, et que la diminution de l'expression d'OCLN dans des hépatocytes permissifs inhibe l'entrée du virus. De plus, l'introduction de CD81 et OCLN humaines dans des hépatocytes murins surexprimant SR-BI et CLDN1 murines permettent l'infection et la production de virions HCV<sup>228</sup>. OCLN possède les mêmes caractéristiques de localisation (jonctions serrées, principalement apicales), et d'interactions (protéines de la *zonula occludens* comme ZO-1, cytosquelette) que CLDN1<sup>229</sup>. L'activité d'OCLN est régulée par son état de phosphorylation, qui est perturbé lors de l'infection virale par HCV, déstabilisant les jonctions serrées, et favorisant l'entrée du virus dans les hépatocytes<sup>230</sup>. Les sites de phosphorylation permettent OCLN d'interagir avec différentes kinases (Src, EGFR, ERK, etc.)<sup>231</sup>.

D'autres facteurs d'entrée de moins importance ont été mis à jour au cours des dernières années, comme les RTK. Différentes kinases sont également impliquées dans l'entrée du viral en tant que co-facteurs, telles que EphA2 et EGFR<sup>232</sup>.

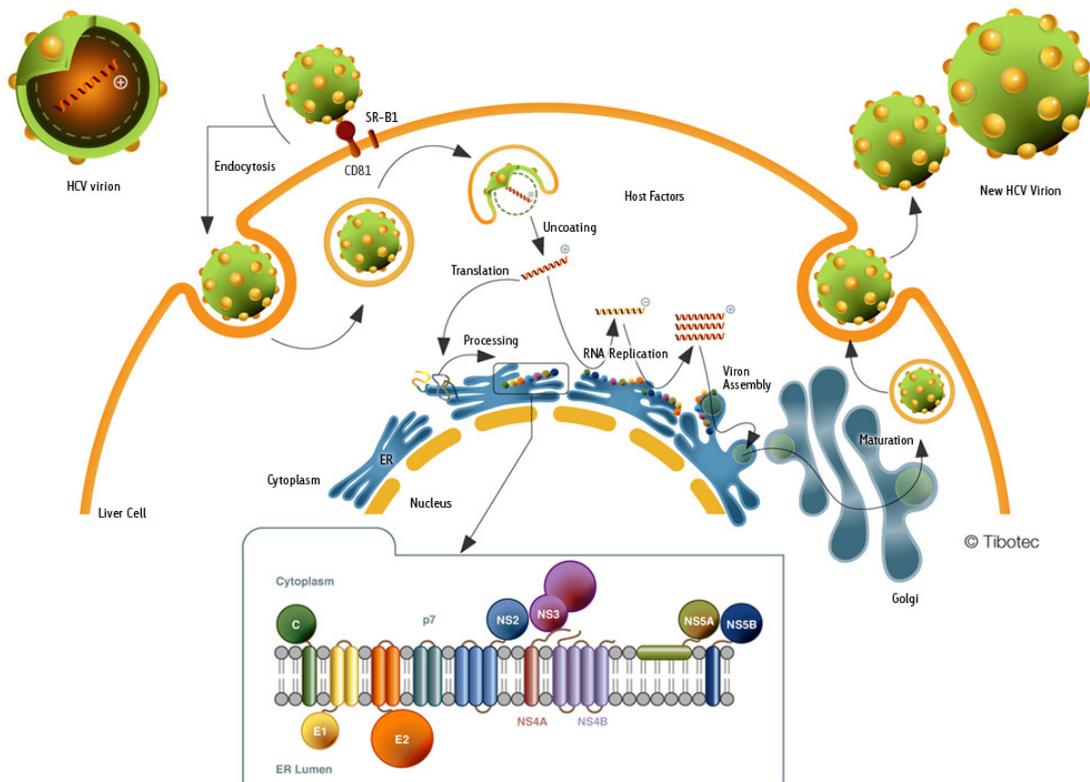
### *Le cycle viral*

#### Attachement et entrée

Comme nous l'avons vu précédemment, l'entrée du HCV se compose de différentes étapes impliquant des facteurs de l'hôte ainsi que E1 et E2. Le virus commence par se fixer aux cellules grâce à des interactions avec LDLR, HS, mais également SR-BI avec les glycoprotéines d'enveloppement, mais probablement également avec les lipoprotéines de la lipovirion.

Une fois cette première étape réalisée, le virus va pouvoir entrer dans la cellule grâce à son interaction avec SR-BI, CD81, CLDN1, et OCLN, les quatre facteurs d'entrée du HCV<sup>233</sup>. L'ordre exact et le type d'interaction avec ces facteurs ne sont pas connus précisément pour l'instant.

L'entrée à proprement parler du virus est ensuite obtenue par endocytose clathrine- et dynamine-dépendante. Le HCV se trouve alors dans les endosomes précoces. Ce processus pH-dépendant est suivi par la décapsidation du virus <sup>234</sup>.



**Illustration III-4 : Cycle viral du HCV.**  
(Source : Tibotec©)

### Traduction et répllication

Le HCV étant un virus à ARN simple brin positif, celui-ci, une fois décapsidé, peut directement être utilisé comme ARN messager et traduit. La traduction débute au niveau de l'IRES (en 5'UTR), dans le RE granuleux (REG)<sup>235</sup>. L'ARN viral est également répliqué au niveau de ces membranes, grâce au complexe de répllication composé de NS5B, la polymérase (RpRd), des protéines non-structurales du virus et de facteurs cellulaires<sup>236</sup>. Malgré l'intérêt qui leur est porté, la cinétique de répllication ainsi que le contenu exact du complexe ne sont pas connus actuellement. Il semblerait en effet que d'autres facteurs (protéines chaperonnes ou kinases), comme cRaf, PI4KIII $\alpha$  (phosphatidyl inositol 4-kinase III alpha), ou encore la cyclophiline A (CypA) puissent être impliqués<sup>237,238</sup>.

### Assemblage et sécrétion des virions

L'assemblage des virions débute par la production de la nucléocapside associant la protéine Core et de l'ARN viral par l'intermédiaire de la réplicase NS5A. Il n'est cependant pas clair actuellement si cet assemblage a lieu au niveau de la membrane du RE, ou au niveau de gouttelettes lipidiques cytosoliques.

Différentes études ont montré que les étapes suivantes de maturation et de sécrétion des virions sont étroitement associées à la voie des VLDL. La théorie principale serait que NS2, éventuellement associée avec p7, « rassemble » les différentes protéines (non-structurales et glycoprotéines d'enveloppe) à proximité des gouttelettes lipidiques, engendrant la mise en place d'interactions protéiques entre ces différents composants<sup>239</sup>. Le rôle de p7 n'est pas connu pour l'instant, mais il a été suggéré que p7 pourrait protéger les particules virales en inhibant l'acidification des compartiments intracellulaires lors des étapes de maturation et de sécrétion. Une fois ApoB et ApoE incorporées aux particules infectieuses matures – la façon dont se fait l'incorporation restant mystérieuse –, les particules suivent la voie de sécrétion des VLDL<sup>240,241</sup>.

### Transmission de cellule à cellule

Une voie d'infection alternative a également été observée. En effet, le virus peut passer d'une cellule infectée à sa voisine selon un mécanisme nécessitant les mêmes facteurs d'entrée que la voie d'infection classique (SR-BI, CD81, CLDN1, OCLN, EGFR, EphA2)<sup>242</sup>. Il semble cependant que, contrairement à la voie classique, la transmission de cellule à cellule puisse être CD81-indépendante. Cette voie permettant au HCV d'échapper aux anticorps neutralisants, permettrait d'expliquer en partie la persistance du virus<sup>221</sup>.

### *Les modèles d'étude ex vivo et in vitro*

Pendant longtemps, aucun modèle d'étude approprié n'étant disponible, retardant grandement la compréhension du HCV, et donc le développement de thérapies potentielles. Au cours des dernières années cependant, nos connaissances de ce virus ont fait un bond en avant grâce au développement de systèmes *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*.

### Le plasma dérivé de patients infectés par le HCV

Décrite dès la fin des années 1990, cette méthode a été l'une des premières tentatives pour étudier le HCV : des hépatocytes sont inoculés avec le sérum issus des patients<sup>243</sup>. Plusieurs types de cellules sont infectables : les hépatocytes primaires humains (PHH), de chimpanzés, ou de tupaïas<sup>244</sup>. La réplication du virus est cependant relativement faible dans ce système, ce qui nécessite l'utilisation de la PCR quantitative pour détecter l'ARN viral. De plus, les particules virales infectieuses sont produites en très faible quantité voire pas du tout, et, les particules

virales étant très hétérogène dans le sérum, et associé avec des lipoprotéines, il est difficile de caractériser correctement l'inoculum<sup>205</sup>.

### Les glycoprotéines d'enveloppe sous forme tronquée et soluble

L'utilisation de la glycoprotéine E2 sous forme tronquée, soluble, et recombinante (sE2) a permis d'identifier certains récepteurs du HCV (CD81 et SR-BI)<sup>214,218</sup>. Ces protéines solubles ont également permis de comprendre l'interaction entre le HCV et les HS<sup>175</sup>. De plus, l'immunisation par sE2 permet d'induire la production de nAb chez la souris et le chimpanzé, et de détecter ces derniers<sup>245,246</sup>.

Les protéines sE1 et sE2 solubles ne permettent cependant pas d'étudier l'attachement et l'entrée du virus, puisqu'elles ne peuvent adopter la conformation d'hétérodimère que présentent E1 et E2 sur l'enveloppe du HCV<sup>210,247</sup>.

### Les particules « virus-like » (VLP)

Les VLP sont des particules « vides », sans génome viral, constituées des protéines Core, E1, E2 et p7 du HCV. Ces protéines sont produites grâce à un baculovirus, et s'auto-assemblent, présentant alors toutes les caractéristiques des particules virales, mais ne pouvant pas se répliquer<sup>248</sup>. Elles ont d'ailleurs été suggérées comme vaccin « inactivé » potentiel<sup>249</sup>. Les VLP induisent en effet des réponses immunitaires adaptatives spécifiques au virus, et sont ainsi capables d'éviter une infection persistante chez le chimpanzé<sup>250</sup>.

Les VLP vont pouvoir s'attacher et entrer dans divers modèles cellulaires (lignées hépatiques, PHH, etc.) grâce à leur complexe E1-E2 identique à ceux des particules originales, et permettent ainsi l'observation, et l'analyse des interactions du virus avec son hôte<sup>251</sup>. Malgré l'intérêt de ce modèle, il est restreint notamment par l'absence de gène rapporteur ou de marqueur autre, rendant les analyses des mécanismes dépendantes de techniques fastidieuses de marquage pour la microscopie ou la cytométrie en flux.

### Les pseudoparticules (HCVpp)

Ce modèle est le premier permettant d'étudier l'attachement et l'entrée du HCV, ainsi que les propriétés de E1 et E2, de manière fiable<sup>252</sup>. Les pseudoparticules sont produites à partir de trois vecteurs d'expression transfectés dans des cellules rénales embryonnaires (HEK 293T) et codant :

- ❖ Les glycoprotéines du HCV E1 et E2, sous promoteur CMV : permettent le tropisme cellulaire.

- ❖ Les protéines de capsid (gag-pol) du HIV (vecteur lentiviral) ou du virus de la leucémie murine (MLV ; rétrovirus), sous promoteur fort du cytomégalovirus (CMV) : matrice, capsid, nucléocapsid, protéase, transcriptase inverse intégrase, ces protéines vont permettre l'encapsidation de l'ARN, l'assemblage des HCVpp et leur sécrétion.
- ❖ L'ARN du MLV ou du HIV, permettant la transcription inverse, et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, ainsi qu'un gène rapporteur (Luciférase, GFP, ou encore  $\beta$ -galactosidase)

Les HCVpp sont sécrétées dans le milieu de culture par les HEK 293T, et mises au contact de cellules telles que les Huh-7 (lignée d'hépatocarcinome humain). Le gène rapporteur sera intégré dans le génome des cellules infectées, exprimé. Cela permettra alors d'évaluer l'infectiosité des particules aisément, rapidement, et de façon fiable par quantification de l'expression du gène rapporteur<sup>252</sup>.

Ce modèle a permis d'identifier les deux autres récepteurs du HCV (CLDN1 et OCLN)<sup>225,228</sup>, et possède les mêmes caractéristiques antigéniques que le HCV. Des anticorps anti-E1 et anti-E2, ainsi que du sérum d'Homme ou de chimpanzé infecté, peuvent empêcher l'entrée des HCVpp dans les cellules<sup>177,252</sup>. La principale différence entre les particules HCV et les HCVpp est l'absence de lipoprotéines, les cellules rénales ne pouvant pas les synthétiser<sup>253</sup>.

### Les réplicons subgénomiques et génomiques

Le système d'utilisation des réplicons du HCV est le premier et unique modèle d'étude de la réplication virale et de ses inhibiteurs<sup>254</sup>. A l'opposé des HCVpp, le réplicon subgénomique contient les informations codant l'ensemble des protéines non-structurales, mais pas les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. En effet, le réplicon se compose d'un ARN bicistronique, c'est-à-dire pouvant coder deux protéines, capable de se répliquer de manière autonome. Celui-ci contient un gène de résistance à la néomycine, précédé par l'IRES du HCV, ainsi que le gène codant les protéines NS3 à NS5B du HCV, précédé par l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), le tout encadré par les régions 5' et 3'UTR du HCV.

Le réplicon est transfecté dans une lignée permissive, telle que Huh7, générant alors des lignées clonales capables de répliquer les réplicons stablement, et d'être sélectionnées grâce à leur résistance à la néomycine<sup>254</sup>. Comme pour les HCVpp, la luciférase est généralement utilisée pour faciliter la quantification de la réplication de l'ARN.

Le réplicon génomique, contrairement au réplicon subgénomique, contient également les glycoprotéines E1 et E2 du HCV. Cependant, quel que soit le type de réplicon, ils ne permettent pas la production ni la sécrétion de particules virales<sup>255</sup>.

### Les particules recombinantes adaptées en culture cellulaire

Grâce à l'ARN viral entier isolé d'un patient présentant une hépatite C fulminante, un nouveau système a été mis en place en 2005, permettant d'étudier l'intégralité du cycle du HCV *in vitro*<sup>256,257</sup>. L'ARN du patient (JFH-1, génotype 2a), électroporé dans des cellules permissives telles que les Huh7 et leurs dérivés (Huh75 et Huh751), se réplique et entraîne la production de particules virales recombinantes infectieuses (HCVcc). En effet, les virions libérés dans le surnageant, sont capables d'infecter de nouvelles cellules des lignées permissives<sup>256,257</sup>.

Il est possible de suivre la capacité de répllication et l'infectivité des HCVcc grâce à différentes techniques. Ainsi, le test de TCID<sub>50</sub>, permet de déterminer la dose de virus permettant d'infecter 50 % des cellules en culture, alors que l'insertion dans le génome viral du gène de la luciférase permet de suivre l'évolution de la quantité de virus par luminescence<sup>256,258</sup>.

A l'exception des densités des fractions virales différentes de celles retrouvées chez les patients – qui suggèrent une variation des propriétés des particules –, les HCVcc sont similaires aux virus issus du sérum. Elles permettent d'ailleurs également d'infecter les chimpanzés ou encore certains modèles murins<sup>257,259</sup>.

Cette méthode permet également de produire des particules chimériques au sein d'un même génotype ou entre plusieurs génotypes, et ainsi d'étudier la résistance des différents types de particules aux antiviraux. De plus, le système des HCVcc est le seul à permettre d'étudier toutes les étapes du cycle viral. Différents résultats obtenus par d'autres méthodes ont d'ailleurs pour être confirmés de cette manière<sup>256,260</sup>.

L'unique inconvénient de cette méthode, par ailleurs très performante, est le danger engendré par ces particules similaires à de réelles particules virales, et donc la nécessité de manipuler les HCVcc en laboratoire de haute sécurité niveau L3.

### *Les modèles d'étude in vivo*

#### Le chimpanzé (Pan troglodytes)

L'étude du HCV a longtemps été limitée par l'absence d'un petit modèle animal. En effet, le chimpanzé est le seul animal, à part l'Homme, à pouvoir être infecté de manière naturelle. C'est chez cet animal qu'ont été obtenus les premiers résultats permettant de caractériser le HCV, bien avant l'isolement du virus. En effet, en 1978, il a été montré que c'est bien un agent infectieux qui est responsable de l'hépatite non-A non-B, notamment en infectant le chimpanzé avec des sérums de patients<sup>261,262</sup>. Cet animal a également été utilisé pour étudier différents paramètres de la pathologie.

Le modèle du chimpanzé est un modèle intéressant, car la maladie est similaire à celle observée chez l'Homme, quoique moins sévère. C'est cependant également un modèle qui est coûteux, encombrant, et difficile à manipuler<sup>263</sup>. Cet animal est de plus répertorié comme espèce en voie de disparition depuis 1988, ce qui doit rendre son utilisation exceptionnelle, outre les règles éthiques<sup>264</sup>.

### Le tupaïa (*Tupaia belangeri*)

Le tupaïa est une espèce de musaraigne arboricole de l'Asie du Sud-Est. Celui-ci a été proposé comme modèle pour l'étude du HCV, étant connu comme étant sensible à plusieurs virus humains. Comme ceux du chimpanzé, les hépatocytes du tupaïa sont permissives au HCV, et produisent des particules infectieuses<sup>265</sup>.

Le tupaïa développe également des symptômes assez similaires à ceux de l'Homme, quoique plus faibles (inflammation, stéatose hépatique, cirrhose, développement de tumeurs), et son sérum est capable d'infecter des animaux naïfs<sup>266</sup>. Comme pour les facteurs d'entrée humains, ceux du tupaïa sont capables de rendre des cellules résistantes permissives aux HCVpp et aux HCVcc<sup>267</sup>.

Même si ces données font du tupaïa un modèle intéressant, notamment en alternative aux chimpanzés, le faible taux d'infection, qui est par ailleurs instable, ainsi que la virémie, montrent qu'il sera important de réaliser d'autres études afin de déterminer la valeur de ce modèle animal.

### Les souris chimériques hépatiques – Les souris immunodéprimées

Comme pour de très nombreuses études, des modèles murins ont également été développés dans le cadre de l'étude du HCV. En effet, ce type de modèle présente l'avantage d'être moins cher, mieux maîtrisé et connu, de manipulation plus aisée, et de reproduction plus rapide que les chimpanzés.

**Souris uPA-SCID<sup>268</sup>** : le foie de souris présentant une immunodéficiencia sévère combinée (SCID ; absence des lymphocytes B et T) est détruit lors de la surexpression de l'activateur de l'urokinase plasminogène (uPA) transgénique, sous la dépendance du promoteur de l'albumine, qui engendre une toxicité hépatique importante. Des PHH sont ensuite injectés aux animaux dans la rate, et migrent par les veines splénique et porte, et colonisent jusqu'à 90 % du foie. Ces souris sont alors infectables par le HCV soit en utilisant des HCVcc, soit par du sérum infecté, humain ou de chimpanzé<sup>269-271</sup>. L'infection est stable au minimum 4 mois, sans altération de la structure ni de la fonction hépatique, et la charge virale sérique est similaire à celle de l'Homme<sup>263</sup>. Ce modèle a permis de confirmer différents résultats, comme le contrôle de

l'infection virale par les anticorps neutralisants et anti-récepteurs<sup>216,270,271</sup>, et d'évaluer l'efficacité des antiviraux<sup>272</sup>. Toutefois, l'obtention des de ces souris est très complexe, nécessitant une grande expertise [les souris doivent être greffées dans leurs deux premières semaines de vie (1/3 de mortalité)], ainsi que le maintien des souris immunodéprimées en environnement stérile<sup>269</sup>.

Un second modèle a été mis au point récemment. Les hépatocytes murins sont dans ce cas détruit par ingestion de 2-(2-nitro-4-trifluoro-méthylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC). Les souris sont dans ce modèle également immodéficientes (Fah<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>IL-2Rγ<sup>-/-</sup>)<sup>273</sup>. Ce modèle est plus maniable que le précédent, notamment grâce à la possibilité de contrôler la mort des hépatocytes (en fonction du temps d'ingestion du NTBC), et à la repopulation hépatique plus rapide, et envisageable à tout âge<sup>273</sup>.

Cependant, dans un cas comme dans l'autre, les études sont réalisées sur des souris immunodéficientes, et donc loin des conditions réelles de réponse immunitaire à l'infection.

### Les souris chimériques hépatiques – Les souris immunocompétentes

Les hépatocytes murins de souris immunodéficientes Balb/c Rag2<sup>-/-</sup> γC<sup>-/-</sup> (BRG) sont détruits grâce à l'expression d'une caspase 8 fusionnée avec le domaine de liaison FK506 (FKBP), sous promoteur de l'albumine, ce domaine ayant une activité de suicide<sup>274,275</sup>. En parallèle, la cotransplantation de cellules souches hépatopoïétiques (HSC) CD34<sup>+</sup> humaines et de progéniteurs hépatocytaires humains permet le développement d'un système immunitaire (lymphocytes) et d'hépatocytes humains<sup>275</sup>. Ces souris humanisées sont ensuite infectées par le HCV afin d'étudier la réponse immunitaire.

Ce modèle n'est cependant pas totalement opérationnel en tant que tel. En effet, l'ARN viral n'est pas détecté dans le sérum murin, et seulement faiblement dans le foie. De plus, la population de lymphocytes B fonctionnels étant reconstituée de manière incomplète, aucun anticorps anti-HCV n'est détecté<sup>276</sup>.

Un second modèle immunocompétent est en cours de développement, permettant d'observer l'entrée du virus. Les facteurs d'entrée CD81 et OCLN humains, ainsi que CLDN1 et SR-BI murins sont codés par des adénovirus injectés aux souris<sup>277</sup>. Si cette transgénèse permet l'entrée des particules virales dans les hépatocytes murins, ce modèle est limité à l'étude de cette étape par l'absence de réplication suffisante du HCV. De plus, un système complexe de gène rapporteur est nécessaire.

Même si les modèles murins actuels ne sont pas encore parfaitement adaptés à l'étude du HCV, ceux-ci ont permis d'obtenir ou de confirmer un certain nombre de résultats. De plus, en

l'absence du modèle idéal, permettent d'avancer dans la connaissance et les thérapies possibles pour le HCV.

### *RNAi et HCV*

Jusqu'à présent, différentes études ont montré que la réplication du HCV est très sensible aux siRNA ciblant l'ARN viral. En effet, le génome de celui-ci étant un ARN simple brin positif jouant le rôle d'ARN messager, il constitue une cible intéressante pour le développement de thérapies basées sur l'ARN interférence<sup>278</sup>. Ainsi, différentes études ont montré que les siRNA ciblant directement différentes parties de l'ARN viral comme la région 5'UTR, la protéine Core ou les protéines non-structurales, permettaient une diminution importante de la réplication virale<sup>279</sup>. Parmi celles-ci, un résultat intéressant montre que le ciblage de l'IRES du virus grâce au siRNA siHCV331 permet d'inhiber à la fois la réplication virale et la production des différentes protéines<sup>280</sup>.

Grâce à l'existence de différents guides et algorithmes, le design et la synthèse de siRNA sont relativement aisés, contrairement aux petites molécules inhibitrices. De plus, la disponibilité de banques de séquences génomiques permet le design de siRNA très spécifiques, permettant de diminuer les effets *off-target* indésirables.

Autre avantage non négligeable, Dicer et RISC sont situés et agissent dans le cytoplasme, évitant ainsi, contrairement à d'autres techniques, la nécessité d'entrer dans le noyau. De plus, l'ARN interférence est un processus existant déjà dans les cellules. Ainsi, aucune toxicité engendrée par l'introduction d'un corps étranger n'est à déplorer.

La durée d'effet de l'ARN interférence est à la fois un avantage et un inconvénient. En effet, l'inhibition d'expression génique engendrée ne se maintient que sur une durée relativement courte, ce qui diminue les risques d'effets secondaires, contrairement à d'autres méthodes. Cette rémanence limitée entraîne cependant la nécessité de renouveler régulièrement le traitement.

De la même manière que pour différentes autres thérapies, l'un des écueils principaux à l'utilisation de RNAi est la particularité de certains virus à ARN de développer des mutations leur permettant d'échapper au traitement, grâce à l'absence de fonctions de relecture de leur polymérase. Pour limiter au maximum cet inconvénient, le choix des cibles est très important : certaines régions du génome viral, telles que l'IRES, sont des régions hautement conservées. En effet, le maintien de ces séquences est indispensable à la réplication virale. Outre le ciblage de ces régions très conservées, l'utilisation d'un pool de siRNA pour cibler simultanément différents sites est également une approche intéressante.

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, l'importance des facteurs de l'hôte dans le cycle viral permet également d'envisager de cibler ces protéines très conservées. Il est toutefois important de prendre garde à ne pas modifier des fonctions indispensables au bon fonctionnement cellulaire.

## 2. Carcinome hépatocellulaire (HCC) et autres tumeurs

Environ 80 % des cas de HCC sont dus au HCV et/ou au virus de l'hépatite B (HBV)<sup>281</sup>. Chaque année, plus de 250 000 cas de HCC sont diagnostiqués, et on estime le nombre de décès associé à 500 000 à 600 000, avec malheureusement une incidence croissante de cas. En Afrique et en Asie, 60 % des cas sont associés au HBV, celui-ci y étant endémique, 20 % au HCV, et 20 % à différents autres facteurs de risque (alcool, etc). Dans le reste du monde par contre, ces chiffres sont inversés, avec plus de 60 % de relation HCV/HCC<sup>282</sup>.

### *Pathogénèse du HCC*

#### Influence virale

Le HCC virus-induit survient dans un environnement propice au développement de dommages hépatiques chroniques (inflammation et régénération). HCV et HBV n'étant pas majoritairement cytopathiques, il est possible que la réplication virale constante soit un facteur de risque de HCC, l'inflammation pouvant conduire au développement de maladies hépatiques chroniques (CLD, chronic liver diseases)<sup>283</sup>. En effet, les virus produisent des protéines qui vont émousser la mise en place de réactions immunitaires contre ces infections chroniques : de nombreuses cellules immunitaires non-spécifiques (cellules NK, NKT, polynucléaires) sont retrouvées dans les lésions, celles-ci sont incapables d'engendrer une clairance virale<sup>281</sup>. De la même façon, le déséquilibre cytokinique pourrait également ralentir l'élimination du virus.

Outre le ralentissement de la réponse immunitaire, les protéines virales vont également modifier l'expression génique et le phénotype cellulaire de l'hôte, événements caractéristiques des cancers. Les cellules vont alors proliférer de façon indépendante des facteurs de croissance, et sans obéir aux signaux inhibant la croissance, modifier leur métabolisme énergétique, devenir métastatiques et envahir les tissus alentours. De même, les cellules vont devenir résistantes à l'apoptose et insensibles aux attaques du système immunitaires ou de tout traitement<sup>284</sup>.

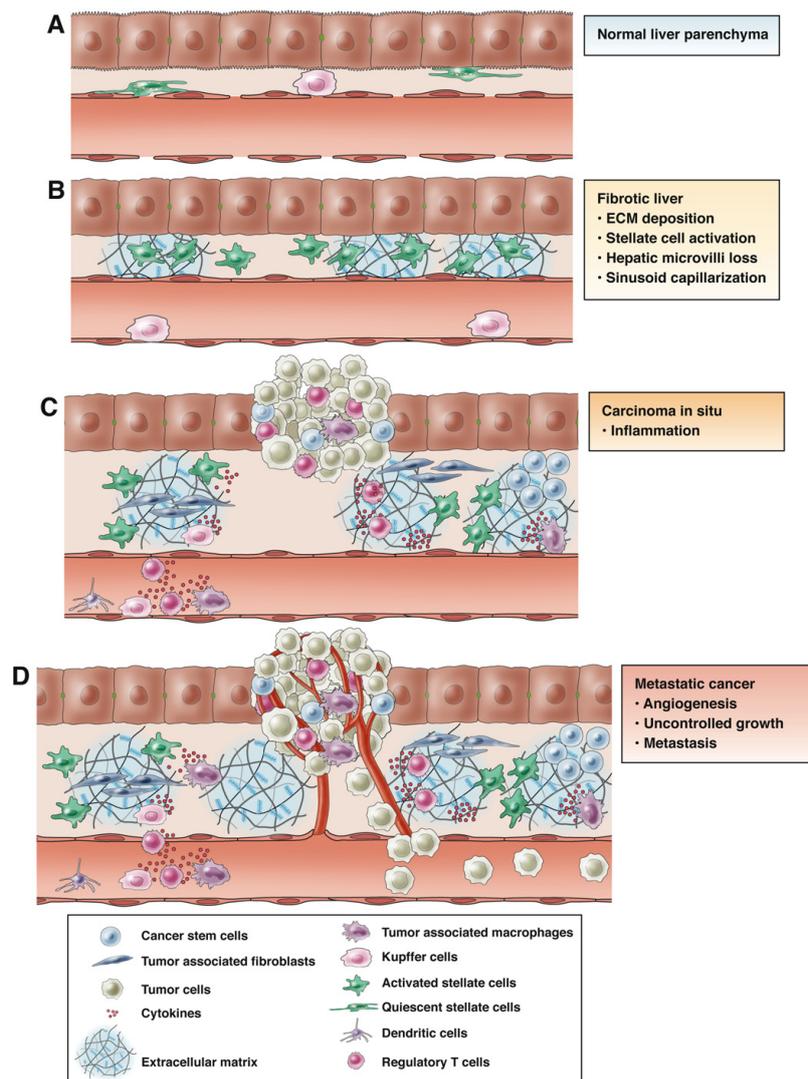
#### Modifications anatomiques et cellulaires conduisant au développement du HCC<sup>285</sup>

Lors du développement du HCC, différentes étapes peuvent être observées :

- ❖ **Parenchyme hépatique sain.** Hépatocytes présentant des microvillosités, et cellules endothéliales sinusoidales dont les fenestrations favorisent les échanges métaboliques. Quelques cellules étoilées hépatiques (cellules de Ito), contenant des gouttelettes lipidiques se situent dans l'espace de Disse (péricapillaire)(Illustration III-5A).
- ❖ **Foie fibrotique.** En cas de CLD, les hépatocytes perdent leurs microvillosités, les cellules endothéliales sinusoidales perdent leurs fenestrations, tandis que les cellules étoilées

hépatiques sont activées, perdent leurs gouttelettes lipidiques, et sécrètent de la matrice extracellulaire (ECM)(Illustration III-5B).

- ❖ **HCC.** Les hépatocytes deviennent malins, leur croissance n'est plus contrôlée. Infiltration de cellules inflammatoires et de cytokines ; fibrose importante, et recrutement de fibroblastes associés aux tumeurs (TAF) et de cellules souches cancéreuses (CSC)(Illustration III-5C).
- ❖ Développement de nouveaux vaisseaux sanguins (néoangiogénèse) et métastases (Illustration III-5D).



**Illustration III-5 : Modifications anatomiques et cellulaires conduisant au HCC.**  
 (Source : Hernandez-Gea, 2013<sup>285</sup>)

### Traitements du HCC

Si des traitements existent, la plupart ne sont pas adaptés, et la mortalité est élevée. Les tumeurs les plus petites et isolées sont retirées chirurgicalement, mais les récives sont courantes<sup>286</sup>. Les chimiothérapies et radiothérapies n'ont qu'un succès limité, car ils ne sont pas

suffisamment spécifiques, et certaines voies stimulant la croissance tumorale en compensent les effets.

L'utilisation de l'inhibiteur multi-kinases Sorafenib a permis de prolonger la survie des patients d'environ un trimestre : c'est la première fois que le ciblage d'une voie moléculaire du HCC permet d'augmenter la survie des patients<sup>281</sup>. D'autres thérapies ciblant des voies spécifiques du HCC sont en cours d'études<sup>287</sup>. Il faudra cependant encore un certain temps avant que ces thérapies puissent être utilisées en clinique.

L'une des principales difficultés pour le développement de thérapie ciblant les biomarqueurs du HCC vient de la mauvaise connaissance de la pathogenèse de la tumeur, et de l'extrême variabilité des marqueurs parmi les patients. Ainsi, plus de 50 drogues et environ 200 essais cliniques sont en cours d'étude, mais les voies moléculaires utilisées lors du développement du HCC, notamment pour le HCC HCV-induit, ne sont pas clairement déterminées pour l'instant. C'est pourquoi, pour l'instant, il est important de cibler des voies généralement impliquées dans le développement oncogénique de manière générale.

Etant donné l'hétérogénéité du HCC, en fonction des différents sous-groupes de patients et selon leur profil de biomarqueurs, il sera probablement nécessaire d'utiliser des traitements sous forme de cocktails, ciblant conjointement différentes voies. Dans ce contexte, l'utilisation de l'interférence ARN semble être une alternative pour le moins intéressante.

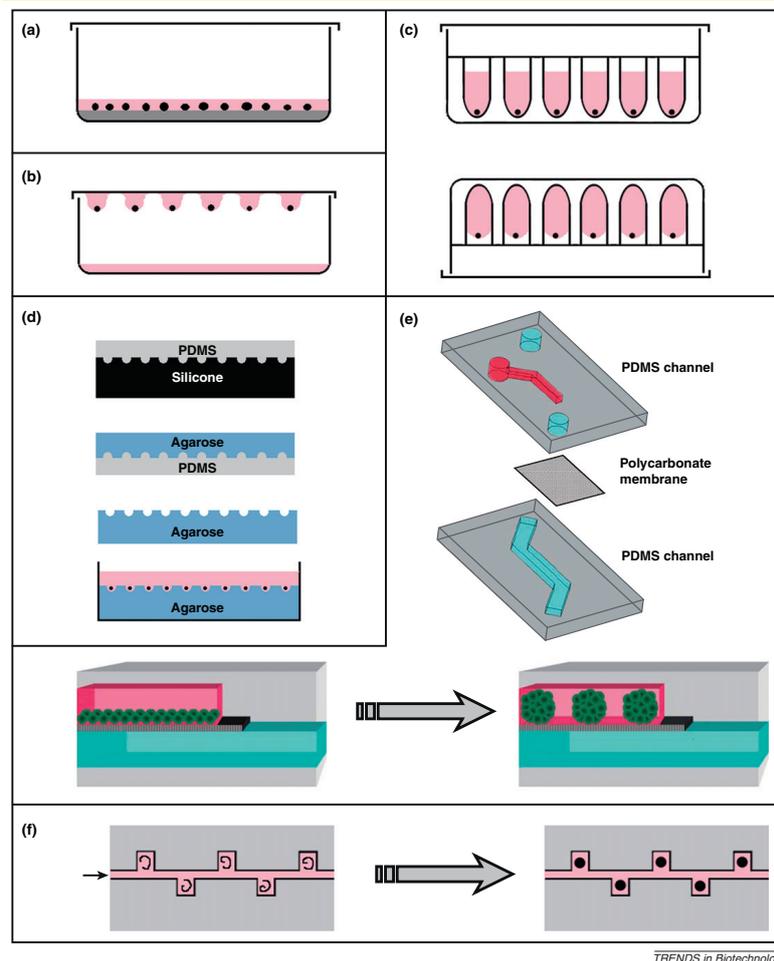
### ***Modèles d'étude des tumeurs in vitro : sphéroïdes***

#### **Avantages des sphéroïdes comparés aux cultures en 2D**

La majorité des cultures de cellules et des expériences *in vitro* sont réalisées en « monocouche » sur du polystyrène compatible, modèle très éloigné de la réalité physiologique. En effet, dans le corps, les cellules sont soit en contact direct avec d'autres cellules de lignées identique ou différentes, soit en contact avec la matrice extracellulaire (ECM). Si cette approche présente de nombreux avantages (contrôle de l'environnement, manipulation aisée, etc.), elle ne peut cependant pas être considérée comme présentant un microenvironnement naturel pour les cellules, contrairement aux cultures 3D<sup>288</sup>. En effet, dans cette configuration, les cellules sont cultivées sur des matériaux de soutien en 3D<sup>289</sup>, en inclusion dans des gels<sup>290</sup>, ou encore sous forme d'agrégats (nommés mammosphères<sup>291</sup>, micromasses<sup>292</sup>, tissus microfabriqués<sup>293</sup>, ou encore sphéroïdes<sup>294</sup>). Nous avons choisi d'utiliser le terme de sphéroïdes car il nous semble plus imagé et exprimant mieux l'absence de tout substrat de culture.

Les cellules cultivées dans un environnement 3D se comportent de manière fondamentalement différente des cellules cultivées en « monocouche ». Par exemple, le

phénotype naturel des hépatocytes va rapidement disparaître une fois sortis de l'organisme et mis en culture « traditionnelle »<sup>295</sup>. La plupart des modifications observées sont principalement dues à la différence entre les interactions cellules-cellules et cellules-matrice selon le système de culture.



**Illustration III-6 : Production de sphéroïdes.**  
(Source : Fennema *et al.*, 2013<sup>288</sup>)

Il existe différentes méthodes pour produire des sphéroïdes :

- ❖ Culture de cellules en suspension/recouvrement liquide : les agrégats cellulaires se forment en suspension en brassant de grands volumes de milieu de culture. C'est une solution intéressante pour une production de masse, mais elle ne permet pas pour l'instant de contrôle précis de la taille des agrégats (Illustration III-6a)<sup>296</sup>.
- ❖ Culture en gouttes suspendue : les cellules, une fois mises en suspension dans une goutte suspendue à une plaque retournée, forment un agrégat de manière spontanée (Illustration III-6b). C'est la première technique à avoir été répertoriée<sup>297</sup>. De nouvelles plateformes en 96 et 384 puits permettent de former des agrégats plus petits et de taille mieux contrôlée (Illustration III-6c)<sup>298</sup>.

- ❖ Technique en micropuits : les agrégats se forment dans des plaques 96-puits à fond rond non-adhérentes. Il existe également de nouvelles plateformes avec davantage de puits à l'échelle micrométrique, ou encore des tampons permettant d'imprimer aisément en routine des puits dans de l'agarose (Illustration III-6d)<sup>299,300</sup>.
- ❖ Microfluidique : des canaux microfluidiques permettent la formation d'agrégats cellulaires. Grâce à cette méthode, une production en continu d'agrégats de taille contrôlée pourrait être mise en place (Illustration III-6e,f)<sup>301</sup>.

### *Modèles d'étude in vivo*

#### Modèles murins transgéniques – HCV

Différents modèles murins basés sur la structure du génome du HCV ont été développés. Actuellement, il existe des souris transgéniques exprimant les protéines structurales du virus (Core, E1, E2 et p7) ou non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) de manière individuelle ou en combinaison<sup>264</sup>. Ces protéines sont conçues de façon à être exprimées de manière constitutive et sous le contrôle de promoteurs spécifiques du foie. Il existe, de la même manière, différents modèles murins basés cette fois sur la structure du génome du HBV.

#### Modèles tumoraux

D'autres modèles plus « simples » sont également utilisables. En effet, il est possible, au lieu de déclencher le développement du HCC suite à l'évolution d'une hépatite virale, de travailler directement sur des tumeurs hépatiques.

Deux possibilités s'offrent alors : les tumeurs orthotopiques, ou les xénogreffes sous-cutanées. Le premier modèle est largement supérieur au second au niveau de la reproduction du microenvironnement tumoral, et de la sélectivité d'organe du HCC. Ce système est cependant également beaucoup plus complexe techniquement que le modèle sous-cutané.

Plusieurs techniques peuvent être envisagées pour l'obtention d'une tumeur orthotopique hépatique : injection hépatique, ou injection splénique (grâce à la migration des cellules vers le foie par la veine splénique puis par la veine porte) de fragments tumoraux ou de cellules de lignées tumorales isolées. Il existe cependant un risque d'engendrer le développement de tumeurs sur le trajet de l'aiguille, ou encore dans d'autres organes par passage de cellules tumorales dans le flux sanguin. Pour pouvoir assurer le développement tumoral, les souris utilisées sont généralement immunodéficientes, comme les BRG, ou encore des Nude (pas de lymphocytes T) ou des SCID-Beige (SCID : pas de lymphocytes T ni B ; Beige : pas de cellules NK).

---

# Objectifs

---

Malgré les progrès de la médecine, de nombreuses pathologies sont encore à la recherche d'un traitement adapté et efficace. Grâce aux avancées scientifiques, de nouvelles techniques, comme l'ARN interférence ou les nanoparticules, s'offrent à nous afin de faire reculer la maladie tous les jours davantage. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il existe des techniques potentiellement très intéressantes, mais dont l'utilisation isolée présente de nombreux inconvénients. C'est le cas de l'ARN interférence : en effet, l'emploi des siRNA, bien que théoriquement très efficaces pour inhiber toute expression génique, est limité notamment par leur sensibilité aux enzymes sanguines, et leur transfection malaisée. De la même manière, les nanoparticules sont une technique très intéressante, permettant le transport et la protection de différents types de molécules, et présentant des possibilités de fonctionnalisation qui ne sont quasiment limitées que par notre imagination.

Ainsi, il a semblé évident pour le laboratoire d'unir ces deux techniques pour le moins complémentaire : un type de molécules thérapeutiques puissant, les siRNA, et un vecteur pour le moins avantageux, les nanoparticules de phosphate de calcium enrobées, associées à un polymère cationique dont l'efficacité a déjà été démontrée, le PEI. Ces travaux font suite à de précédentes recherches, démontrant les propriétés de films polyélectrolytes multicouches, composés de complexes PEI-siRNA en alternance avec des couches de chitosan-acide hyaluronique<sup>302</sup>. En effet, ces films permettent la libération prolongée et efficace des siRNA. Un nouvel outil a été développé afin de conserver l'efficacité de ces assemblages en terme de vectorisation, tout en s'affranchissant de la nécessité de travailler en deux dimensions grâce à l'utilisation de nanoparticules-supports. Le choix du matériau s'est porté sur des nanoparticules de phosphate de calcium (CPnp), intéressantes notamment pour leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. Ces nanoparticules ont ensuite été enrobées par des couches alternées de PEI modifié (PEI-tyrosine ; PEI-Tyr, ou PEI-pyridine ; PEI-Pyr), et de siRNA, formant des composés de formule CPnp(PEI/siRNA)<sub>2,5</sub>.

Lors de ma thèse, en tant que biologiste, mon travail a consisté à réaliser la preuve de concept de l'intérêt et de l'efficacité de ces nanoparticules sur différents modèles.

En effet, une première partie de ce manuscrit sera consacré à la caractérisation des nanoparticules CPnp(PEI-Tyr/siRNA)<sub>2,5</sub> d'un point de vue physicochimique, mais également biologique à la fois sur des modèles *in vitro*, et *in vivo* chez la souris (**publication n°1 : Potent calcium phosphate nanoparticle surface coating for in vitro and in vivo siRNA delivery: a step toward multifunctional nanovectors.** Thirunavukkarasu Devarasu, **Roxane Saad**, Ali Ouadi,

Benoit Frisch, Eric Robinet, Patrice Laquerrière, Jean-Claude Voegel, Thomas Baumert, Joelle Ogier and Florent Meyer).

La deuxième partie des travaux a consisté en la réalisation de l'étude d'un type de nanoparticules légèrement différent. En effet, pour des raisons de moindre toxicité notamment, il a été décidé de modifier le système particulaire afin de passer aux CPnp(PEI-Pyr/siRNA)<sub>2,5</sub>. Ainsi, la seconde partie de ce manuscrit portera sur la preuve de concept de l'efficacité de ces nouvelles particules sur le modèle du HCV *in vitro* selon différents angles d'approche (manuscrit en préparation).

Enfin, la troisième partie de mon travail a permis d'évaluer plus avant l'efficacité des CPnp(PEI-Pyr/siRNA)<sub>2,5</sub> grâce à un nouveau modèle. En effet, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'effet des nanoparticules sur la prolifération de cellules cancéreuses grâce à l'utilisation d'un système de culture cellulaire en trois dimensions, les sphéroïdes. Dans une seconde sous-partie, nous avons étudié la biodistribution de ces nanoparticules *in vivo*, étape préliminaire à l'évaluation du potentiel thérapeutique.

# Matériel et méthodes

## I. Matériel

### 1. Polyéthylènimine (PEI)

Les différents PEI (PEI Tyrosine = PEIY<sup>162</sup> ; PEI Tyrosine Galactose = PEIY-Gal ; PEI Pyridine = PEIPyr ou πPEI<sup>303</sup>) ont été synthétisés dans le laboratoire de Guy Zuber et Benoît Frisch (Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, équipe de Biovectorologie UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg. Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, 67400 ILLKIRCH) à partir de PEI 25 kDa branché. Tous les résidus greffés au PEI (Tyrosine, Galactose, et Pyridine), sont greffés sur les amines primaires.

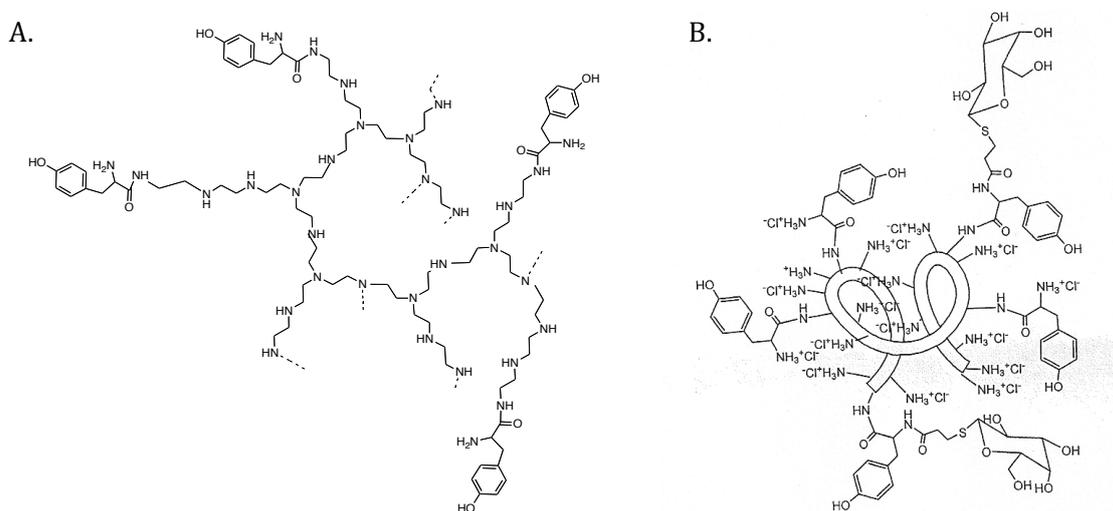


Illustration I-1 : Structure du PEI Tyrosine (A) et du PEI Tyrosine-Galactose (B)

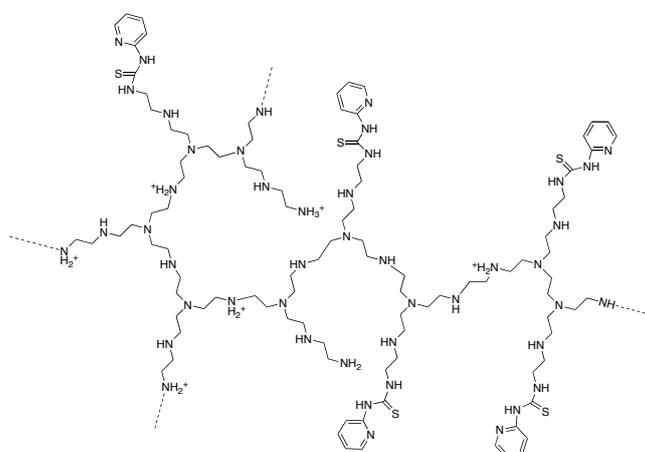


Illustration I-2 : Structure du PEI Pyridine

Le pourcentage de greffage en fonction des résidus a été établi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (*proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*,  $^1\text{H}$  NMR). Ainsi, le PEIY et le PEIPyr présentent 30 % de greffage de tyrosine et de pyridine, respectivement. Le PEIY-Gal présente 10 % de greffage de galactose, également sur les amines primaires.

## 2. siRNA

Les siRNA siLuc, siHCV331, siCLDN1, siCTRL, siGLOGreen et siCD81 ont été fournis par Thermo Scientific Dharmacon :

- ❖ **siLuc** (5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3') est un siRNA généré sur demande ciblant l'ARNm de la luciférase GL3.
- ❖ **siHCV331** (5'-GGUCUCGUAGACCGUGCACTT-3') ciblant l'IRES du HCV a été synthétisé selon Yokota *et al.*<sup>280</sup>.
- ❖ **siCLDN1** est un mélange de trois siRNA (5'-UGAAGUGUAUGAAGUGCUU [525]; 5'-CACCAAGGCCCUAUCCAAA [804]; 5'-UAACAUUAGGACCUUAGAA [921]) ciblant la protéine CLDN1 humaine (NM\_021101).
- ❖ **siCTRL**, utilisé comme contrôle non-ciblant, correspond au siGENOME non-targeting siRNA #1 (réf. D-001210-01-05, Dharmacon).
- ❖ **siGLO Green** (réf. D-001630-01-05, Dharmacon) est un siRNA marqué au 6-FAM, permettant la visualisation de ce dernier en fluorescence verte (Absorbance/Emission Max : 494/520 nm).
- ❖ **siCD81** est un mélange commercial de siRNA ciblant la protéine CD81 humaine (NM\_004356) (réf. L-017257-00-0005, Dharmacon).

Les siRNA antitumoraux siMYC, siPIK3CA, siEGFR, siE2F1, siCTNNB1, siKRAS ont été fournis par Qiagen.

## 3. Plasmides

Les plasmides pGL623en, pGL503en, pGL447en, pGL503 et pGL300 ont été fournis par l'équipe de T. Mazzone. Ils ont été produits à partir du plasmide pGL3, contenant le gène rapporteur de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*), dans lequel a été introduit l'amplificateur du gène humain apoE (ME1, downstream enhancer) entier ou fragmenté<sup>304</sup>.

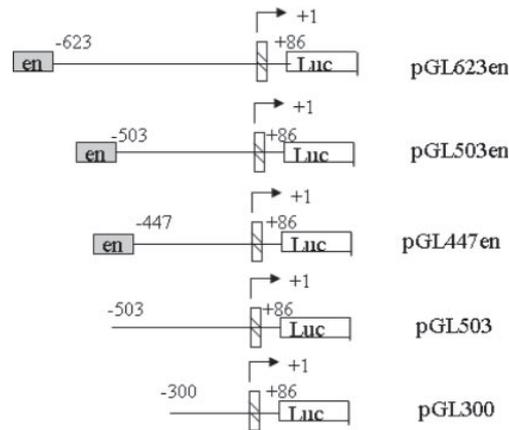


Illustration I-3 : Structure des plasmides pGL623en, pGL503en, pGL447en, pGL503 et pGL300 (Source : Yue *et al.*, 2008<sup>304</sup>)

#### 4. Lignées cellulaires

##### *Huh7, Huh7Luc, et Huh751*

Les cellules Huh7, cellules d'hépatocarcinome humain<sup>305</sup>, sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 10 % de sérum fœtal de veau (Fœtal Calf Serum, FCS) (PAN Biotech), 50 µg.mL<sup>-1</sup> gentamicine (Gibco), 0,1 mM acides aminés non essentiels (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco) et 1 mM sodium pyruvate (Gibco).

Les cellules Huh751, dérivées des Huh7, sont cultivées de la même manière.

Les cellules Huh7Luc sont des cellules Huh7 transformées de façon stable afin d'exprimer le gène de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) sous le promoteur du SV40 à partir du plasmide pGL3.

##### *HeLaLuc*

Cette lignée cellulaire est issue d'un adénocarcinome humain du col de l'utérus (n° ATCC : CCL-2). Les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM à 10 % FCS (PAN Biotech), 2 mM de Glutamax (Gibco) et 50 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamicine (Gibco).

Comme les Huh7Luc, les HeLaLuc ont été transformées de façon stable afin d'exprimer le gène de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) sous le promoteur du SV40 à partir du plasmide pGL3.

##### *A549 et A549Luc*

Les cellules A549 sont issues d'un carcinome pulmonaire humain (n° ATCC : CCL-185). Elles sont cultivées dans un milieu RPMI contenant 10 % de FCS (PAN Biotech) et 100 U.mL<sup>-1</sup> pénicilline (Gibco), 100 mg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine (Gibco), et 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> de généticine (Gibco).

De la même manière que les cellules Huh7Luc et HeLaLuc, les cellules A549Luc ont été transformées de façon stable afin d'exprimer le gène de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) sous le promoteur du SV40 à partir du plasmide pGL3.

### **PHH**

Les hépatocytes primaires utilisés pour les expériences de qRT-PCR sont isolés à partir de résections hépatiques de patients des Hopitaux Universitaires de Strasbourg avec l'accord du Comité d'Evaluation Ethique de l'INSERM/Institutional Review Board. Brièvement, les échantillons de foie sont perfusés à 37 °C à l'aide d'un tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique sans calcium contenant 0,5 mM d'acide tétraacétique éthylène glycol (Fluka), puis par un tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique contenant 0,075 % de CaCl<sub>2</sub> et 0,05 % de collagénase (Sigma).

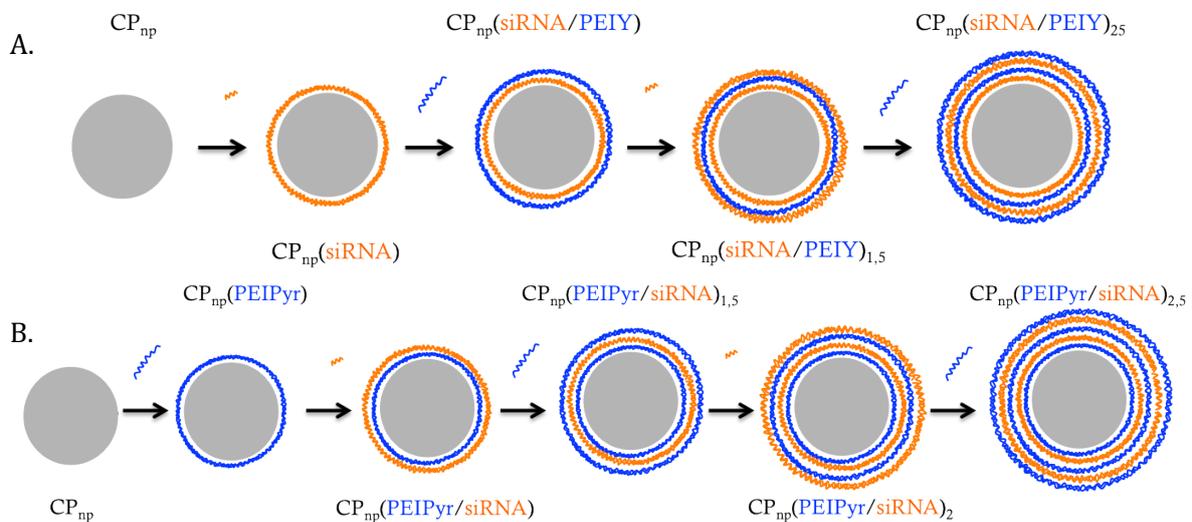
Après lavage des cellules avec un tampon phosphate salin (PBS), et élimination des cellules mortes par gradient de centrifugation Percoll (Sigma), les hépatocytes isolés sont mis en plaque 48 puits recouvertes de collagène (Biocoat, BD Biosciences) à raison de 1,5.10<sup>5</sup> cellules par puits dans un milieu William's E (Sigma-Aldrich) contenant 1 % de Glutamax (Gibco), 0,15 % d'albumine de bœuf sérique (Bovine serum albumin, BSA) (Sigma), 1 % de solution d'insuline, transferrine, et sélénium (Gibco), 10 % de FCS (PAN Biotec) et 10<sup>-7</sup> M de dexaméthasone (Sigma).

## II. Méthodes

Toutes les expériences réalisées et présentées dans ce manuscrit ont été produites en plusieurs exemplaires, et les échantillons au sein de chaque expérience ont été répétés sous forme de triplicats au minimum. Tous les résultats présentés sont considérés comme significatifs.

### 1. Préparation des nanoparticules

#### Préparation du cœur de phosphate de calcium



**Illustration II-1 : Représentation schématique de la production et enrobage des CPnp.**  
A. CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub>. B. CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub>.

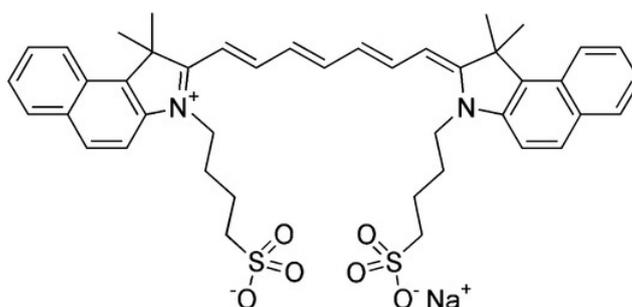
Les CPnp sont préparées par un processus chimique humide par précipitation d'acétate de calcium (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca (Aldrich), et de dihydrogénophosphate de sodium NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Aldrich) : 50 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 2 mM sont ajoutés à 60 mL de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca à 2 mM en goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique dans les conditions suivantes : agitation constante, 60 ± 2 °C, pH = 5,15 (pH ajusté à l'aide d'acétate de sodium 5 mM et d'acide acétique), 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. La suspension de CPnp est ensuite refroidie à 4 °C jusqu'à son utilisation.

#### Fonctionnalisation des CPnp pour l'imagerie

Afin de pouvoir suivre les CPnp, *in vitro* ou *in vivo*, ces dernières peuvent être fonctionnalisées grâce à l'incorporation de différents agents d'imagerie. Ainsi, lors des premières expériences, la biodistribution des CPnp a été suivie *in vivo* chez la souris par radiomarquage du cœur de phosphate de calcium des particules au technétium (Tc). Pour cela, du TcO<sub>4</sub> dilué dans une solution de NaCl 0,9 % a été ajouté à la solution de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour obtenir

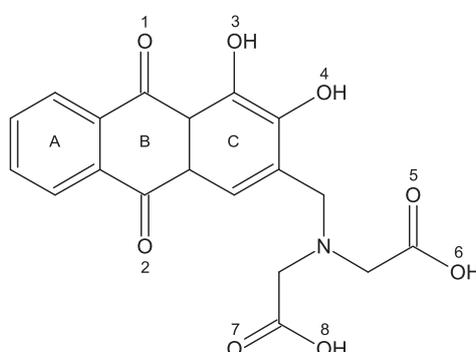
une concentration de 2  $\mu\text{M}$ . La précipitation du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et du  $(\text{CH}_3\text{COO}_2)\text{Ca}$  a ensuite été réalisée comme précédemment.

Les expériences suivantes de biodistribution ont été réalisées à l'aide de vert d'indocyanine (indocyanine green, ICG), un fluorophore non-spécifique excité entre 760 et 785 nm et émettant dans le proche infra-rouge (820-840 nm) (near infrared, NIR). L'ICG est une tricarbocyanine utilisée médicalement depuis plus de 50 ans grâce à sa couleur verte pour tester la clairance hépatique et la fonction cardiovasculaire, ainsi que pour les angiographies de la rétine<sup>306</sup>. En 2011, l'ICG était le seul fluorochrome NIR autorisé par la Food and Drug Administration américaine (FDA)<sup>307</sup>. Sa fluorescence est cependant relativement faible en comparaison avec d'autres fluorophores NIR, et l'ICG doit être mis en solution peu de temps avant utilisation du fait de son instabilité. L'ICG est incorporé au cœur de phosphate de calcium grâce à sa capacité à chélater le calcium<sup>308</sup>. Ainsi, l'ICG est ajouté à la solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pour obtenir une concentration de 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La précipitation du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et du  $(\text{CH}_3\text{COO}_2)\text{Ca}$  a ensuite été réalisée comme précédemment.



**Illustration II-2 : Structure du vert d'indocyanine.**

Lors des expériences de microscopie confocale, les CPnp ont été suivies grâce à l'incorporation d'alizarine complexone au cœur de phosphate de calcium. Ce fluorophore de la famille des anthraquinones, est utilisé depuis les années 1970 pour le marquage des os, des dents et de tissus calcifiés grâce à sa capacité à chélater le calcium<sup>309</sup>.



**Illustration II-3 : Structure de l'alizarine complexone (Source : Ding *et al.*, 2012).**

L'**alzarine complexone** est mise en solution dans de l'eau bidistillée et ajoutée à la solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pour obtenir une concentration de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . La précipitation du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et du  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$  a ensuite été réalisée comme précédemment. Les CPnp sont dialysées 24 h à  $4^\circ\text{C}$  sous agitation contre de l'eau bidistillée à l'aide d'une membrane présentant un cut-off de 50 kDa afin d'éliminer l'alzarine complexone non précipitée.

### *Enrobage multicouche siRNA et PEI des CPnp*

Les CPnp sont enrobées selon le principe de fabrication des multicouches polyélectrolytes<sup>310</sup> par ajout alternatif de 11 mL de PEI (PEIY, PEIY-Gal, ou PEIPyr à 10 mM N) et de  $1,3 \mu\text{g}$  de siRNA par mL de solution de CPnp dans les conditions suivantes : agitation constante,  $4^\circ\text{C}$ , 1 h d'enrobage par couche, vérification du pH à 5,15 avant le début de l'enrobage. Les étapes sont réalisées dans l'ordre adéquat afin d'obtenir des  $\text{CPnp}(\text{siRNA}/\text{PEIY})_2$ , des  $\text{CPnp}(\text{siRNA}/\text{PEIY-Gal})_2$ , ou des  $\text{CPnp}(\text{PEIPyr}/\text{siRNA})_{2,5}$ , contenant toutes  $2,6 \mu\text{g}$  de siRNA par mL de CPnp préparées. Les CPnp enrobées sont conservés à  $4^\circ\text{C}$  avant utilisation.

### *Concentration des CPnp et doses utilisées*

Les particules sont concentrées 20 fois à l'aide d'unités de filtration par centrifugation présentant un cut-off de 50 kDa (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, Merck-Millipore).

La dose utilisée de manière majoritaire dans les expériences, nommée **Dose 1**, correspond à une dose sélectionnée pour son efficacité et sa moindre toxicité. En partant du principe que tous les siRNA sont adsorbés aux CPnp lors de l'enrobage, la dose 1 correspond à :

- ❖ L'ajout de 160 ng de siRNA par puits dans une plaque 96 puits pour une mise en culture de  $10^5$  cellules
- ❖ L'ajout de 400 ng de siRNA par puits dans une plaque 48 puits pour une mise en culture de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules
- ❖ L'ajout de 800 ng de siRNA par puits dans une plaque 24 puits pour une mise en culture de  $5 \cdot 10^5$  cellules

## 2. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

### *Mesures de la taille et du potentiel zêta des CPnp par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS)*

#### Mesure de taille des CPnp

La taille apparente des CPnp a été évaluée par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, DLS). Cette technique permet de mesurer des molécules ou des particules possédant des dimensions allant de moins d'un nanomètre à quelques microns. En solution, toute molécule est agitée par le mouvement Brownien, induit par le choc des molécules entre elles et des molécules du solvant, en mouvement du fait de leur énergie thermique. Plus les particules sont petites, plus elles se déplacent vite et loin dans le solvant. L'analyse de ces fluctuations d'intensité lumineuse, indiquant la vitesse du mouvement Brownien, et donc la taille des particules, est réalisée à l'aide de la relation de Stokes-Einstein. Elle permet de calculer le coefficient de diffusion  $D$  d'un objet sphérique possédant un rayon hydrodynamique  $R_H$  dans un milieu dont la viscosité est désignée comme  $\eta$  à une température précise  $T$ , en fonction de la constante de Boltzmann  $k_B$  :

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_H}$$

Le dispositif de mesure utilisé, le Zetasizer NanoZS (Malvern instruments), comprend un laser monochromatique HeNe, émettant à 633 nm, une cellule de mesure et un photomultiplicateur. Ce dernier est capable de mesurer des variations de faible intensité de lumière diffusée par des particules ou des molécules de taille réduite. Après traitement numérique, une fonction d'autocorrélation du signal est obtenue, permettant de déduire, grâce à la relation de Stokes-Einstein, le coefficient de diffusion ou le rayon des particules ou molécules. En effet, cette fonction correspond à la probabilité qu'une particule soit au même point au temps  $t$  et au temps  $t + \tau$ . Ainsi, plus les particules sont petites, plus elles se déplacent vite, et plus cette probabilité est faible. La fonction d'autocorrélation ( $G$ ), dans le cas d'une population homogène de particules, est représentée par une exponentielle décroissante en fonction du temps. Dans le cas contraire, un traitement mathématique est réalisé, afin d'obtenir une approximation de la répartition des tailles des CPnp de la population. Ce traitement n'est cependant réalisable que dans une certaine limite de polydispersité, de grandes particules en petite quantité pouvant masquer une population importante de petites particules, de par leur impact sur l'intensité de diffusion. Pour analyser nos expériences, nous avons choisi un mode d'analyse monomodal décrivant la décroissance de la fonction pour une population homogène de particules sphérique

tout en incluant les faibles variations par l'ajout d'un coefficient de polydispersité (méthode des cumulants)<sup>311</sup>.

Pour mesurer la taille des CPnp, 1 mL de la suspension non concentrée est placé dans une cuve de spectrométrie. Celle-ci est traversée par le laser à un angle fixe de 173°, et à 25 °C. Les mesures ont été réalisées pendant 90 s, selon les paramètres suivants :

- ❖ index de réfraction du milieu : 1,3402
- ❖ index de réfraction des particules : 1,67
- ❖ viscosité du milieu : 1,145 cP

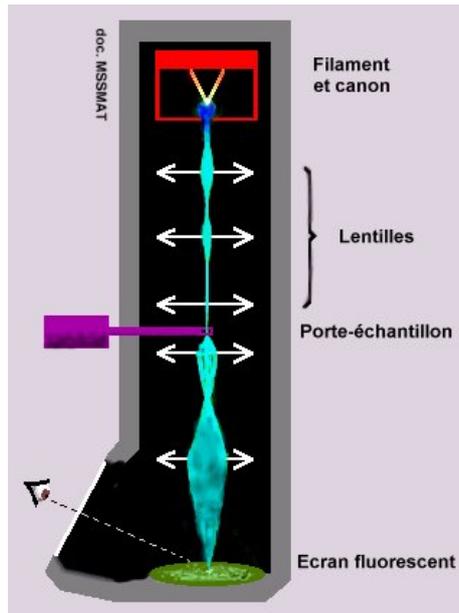
### Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta correspond à la mesure du potentiel de surface des particules, conditionnant leurs interactions, permettant de déterminer l'intensité d'attraction ou de répulsion électrique ou électrostatique des CPnp en fonction de leur environnement. Les mesures sont réalisées à l'aide du Zetasizer nanoZS en utilisant un champ électrique traversant l'échantillon à 25 °C, selon les paramètres suivants :

- ❖ viscosité : 0,8872 cP
- ❖ constante diélectrique : 78,5

### *Imagerie électronique en transmission (TEM)*

Les CPnp sont imagées par microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*, TEM). Cette technique est basée sur l'interaction entre un faisceau d'électrons à haute tension et un échantillon très mince (10-100 nm), permettant l'obtention d'une image de très importante résolution (jusqu'à 80 pm).



**Illustration II-4 : Microscopie électronique en transmission.**  
(Source : MSSMAT)

Le faisceau est extrait d'un filament de métal chauffé à une température proche de son point de fusion, et accéléré fortement par un canon à électrons (tension de  $5 \cdot 10^5$  à  $3 \cdot 10^6$  V), puis focalisé en une image qui est agrandie grâce à l'utilisation de lentilles électromagnétiques, puis projetée sur une plaque photographique, un capteur ou un écran fluorescent.

Les échantillons sont préparés par dépôt d'une goutte de  $10 \mu\text{L}$  de CPnp en suspension sur une grille de cuivre 100 mesh couverte de Formvar® et enrobée de carbone (Electron Microscopy Sciences). Une fois la solution évaporée naturellement, les particules sont marquées par une solution éthanolique à 50 % à 2 % d'acétate d'uranyle (10 min), puis par du citrate de plomb 4 % (5 min).

Les images ont été réalisées sur un microscope Philips CM12 (FEI Company, Eindhoven, Pays-Bas), possédant un dispositif anti-contamination refroidi à l'azote, et utilisant un voltage d'accélération de 80 kV. Les micrographies ont été acquises avec un appareil photo digital avec un agrandissement entre 400 et 3400 x.

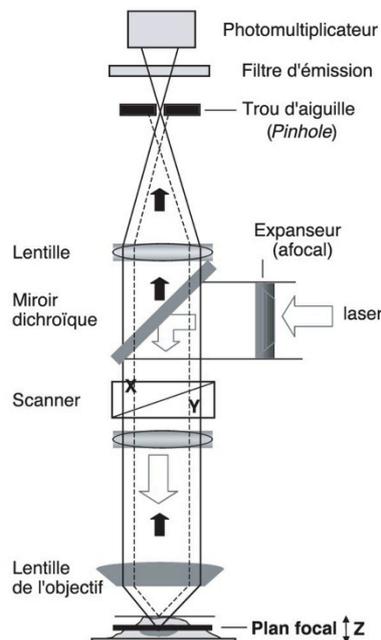
### *Electromobilité en gel d'agarose*

La stabilité des CPnp dans le sérum est vérifiée par test de décalage par électromobilité (electromobility shift assay, EMSA). Les siRNA libres, chargés négativement et de faible encombrement, vont être attirés par le pôle positif du dispositif et migrer dans le gel, tandis que la charge des siRNA enrobés sur les CPnp est masquée par celle du PEI. Les siRNA libres ou les CPnp sont incubées dans de l'eau ou du sérum, et soumis à une électrophorèse en gel d'agarose

1 % pendant 1 h à 77 V. Après marquage des acides nucléiques au BET, les gels sont observés sous lampe UV (Geldoc 2000, Biorad).

### *Microscopie confocale*

Le microscope confocal, décrit par Minsky en 1957, est un microscope optique permettant de réaliser de découper un échantillon en sections optiques, ou plans focaux de faible profondeur de champ ( $\approx 400$  nm). Il permet de recomposer une image 3D de l'objet, mais également de déterminer la colocalisation d'éléments de l'échantillon, c'est-à-dire présents au même emplacement dans un plan focal. Pour cela, une source lumineuse, généralement un laser, est dirigé vers un point précis de l'échantillon (point focal) grâce à un microscope à épifluorescence. La fluorescence parasite générée lors du trajet optique hors plan focal est éliminée grâce à l'utilisation d'un orifice (pinhole) situé en amont du photomultiplicateur ou du détecteur. Ainsi, seule la lumière issue du point focal est détectée, permettant de limiter fortement le bruit de fond. Pour obtenir une image de l'ensemble du plan focal, ce dernier est balayé en XY par le laser grâce à des miroirs motorisés placés sur le trajet optique. Les différentes sections optiques sont obtenues grâce à un balayage en Z de l'échantillon suite au déplacement de l'objectif.



**Illustration II-5 : Microscope confocal.**

**Le laser est condensé au point focal grâce au miroir dichroïque, et à l'objectif. La fluorescence est récupérée par un photomultiplicateur après suppression de la fluorescence non spécifique (représentée en pointillés) du point focal grâce au pinhole. (Source : L'apport de la microscopie et de l'imagerie en génomique, S. Brown *et al.*, 2004<sup>312</sup>)**

L'imagerie des cellules et des CPnp a été réalisée à l'aide du système Zeiss LSM 510, possédant des lasers HeNE et Ar, un objectif à immersion à huile x 40/1,4, et d'intervalles de section z de 0,4  $\mu\text{m}$ .

Les cellules ont été cultivées 24 h à raison de  $10^4$  cellules par puits en plaques 48 puits sur une lamelle en verre, ou en Lab-Tek® (Nunc®) 8 puits en verre de manière non confluyente, afin de pouvoir observer des cellules isolées, et transfectées avec les CPnp.

Les cellules présentant un marquage ont été fixées au paraformaldéhyde (3,7 % PFA), puis perméabilisées au Triton (0,1 %). Une fois les puits saturés à la BSA (PBS 3 % BSA p/v), les cellules ont subi un marquage indirect avec un anticorps primaire dirigé contre EEA1 (1/500<sup>e</sup>), une protéine des endosomes précoces, puis avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé au fluorochrome Alexa530-545 (1/5000<sup>e</sup>). Après lavage, les cellules ont ensuite été montées entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage commercial Vectashield® comprenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), une molécule capable de se lier fortement aux adénines et aux thymines, permettant de marquer les noyaux. Les cellules non marquées ont été fixées au PFA 3,7 %, puis, après lavage au PBS, montées entre lame et lamelle à l'aide du Vectashield®.

Le marquage des endosomes est détecté après excitation à 488 nm à l'aide d'un filtre de bande passante 514-543 nm (jaune). La présence d'alizarine complexone est détectée détecté après excitation à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-haut à 610 nm (rouge). L'utilisation de siGLO Green est détectée après excitation à 488 nm à l'aide d'un filtre de bande passante 505-530 nm (vert).

### **3. Evaluation de la cytotoxicité des CPnp**

#### *Test MTT*

Les effets cytotoxiques des CPnp ont été évalués en triplicats par l'analyse de la métabolisation du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Après ajout de MTT (0,6 g.L<sup>-1</sup> dans du PBS) (Sigma) sur les cellules, celles-ci sont incubées 12 h à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Les cristaux de formazan produits par la métabolisation du MTT sont alors solubilisés dans une solution d'acide et d'isopropanol (100 µL de HCl 0,04 N dans de l'isopropanol) après retrait du milieu. Une fois les cristaux dissous, les plaques sont lues à 570 nm (longueur d'onde de référence à 630 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithras LB 940, Berthold).

#### *Test Alamar Blue*

Les effets cytotoxiques des CPnp ont été évalués en triplicats par l'analyse de la métabolisation de l'Alamar Blue. Le milieu de culture est retiré des cellules, et du milieu frais additionné de 10 % d'Alamar Blue (Promega) est ajouté. Les cellules sont incubées plusieurs heures (2-3 h pour les A549Luc, 4-5 h pour les Huh7Luc, 12 h pour les Huh751) à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

En parallèle sont incubés des puits contrôles sans cellules contenant du milieu seul ou du milieu additionné de 10 % d'Alamar Blue. Les surnageants sont analysés par lecture de l'absorbance à 570 nm (longueur d'onde de référence à 630 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithras LB 940, Berthold). Il est également possible de mesurer la fluorescence à 590 nm. Dans ce cas, l'incubation des cellules est fortement réduite.

### *CyQuant*

Les effets cytotoxiques des CPnp ont été évalués en triplicats par l'analyse de la fixation du colorant CyQUANT® GR sur les acides nucléiques. Le surnageant est retiré des puits, les cellules sont rincées au PBS, puis congelées à sec. Elles sont ensuite décongelées à température ambiante, et lysées dans 200 µL tampon de lyse cellulaire contenant le colorant CyQUANT® GR sont ajoutés (Préparation du réactif : Dilution au 1/20<sup>e</sup> de la solution stock de tampon de lyse dans de l'eau distillée, puis dilution de la solution stock de CyQUANT® GR au 1/400<sup>e</sup> dans le tampon de lyse 1X. La fluorescence est ensuite mesurée à 520 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithras LB 940, Berthold).

### *Cristal violet*

Les effets cytotoxiques des CPnp ont été évalués en triplicats par l'analyse de la fixation du cristal violet sur les acides nucléiques. Le surnageant est retiré des puits, les cellules sont rincées au PBS, puis 100 µL de solution de cristal violet est ajoutée (en plaques 48 puits). Après 10 min d'incubation à température ambiante sous agitation, la plaque est lavée deux fois par immersion dans un récipient d'eau, puis mise à sécher. Une solution à 1 % de SDS est ensuite ajoutée pour solubiliser les cristaux (300 µL en plaques 48 puits). La plaque est mise sur un agitateur orbital jusqu'à ce que la couleur des puits soit homogène. L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

## **4. Préparation des particules virales HCVcc**

### *Synthèse de l'ARN Jc1Luc*

L'ARN viral Jc1Luc est transcrit à partir du plasmide pFK-Luc-Jc1. Celui-ci code les polyprotéines d'un HCV chimérique composé des codons 1 à 846 du virus J6/CF (GenBank accession number AF177036), et des codons 847 à 3033 du virus JFH1 (GenBank accession number AB047639). Ainsi, les protéines core, E1, E2, p7, et les 33 acides aminés de la partie N-terminale de NS2 sont dérivés de J6CF, tandis que la partie C-terminale, ainsi que les autres protéines sont issues de JFH1<sup>258</sup>. Cette région codant pour la polyprotéine HCV est située dans le deuxième cistron, et exprimé à l'aide de l'IRES dérivé du EMCV. Le premier cistron contient le gène rapporteur de la luciférase (*Photinus pyralis*), en fusion avec la région 5'UTR de J6CF par

un site AscI. Pour s'assurer de la production de transcrits ARN possédant des extrémités 5' et 3' fidèles à la réalité, les régions UTR sont flanquées respectivement par un promoteur T7 et par un ribozyme génomique du virus de l'hépatite delta<sup>258</sup>.

L'ADN plasmidique est obtenu en quantité suffisante par transformation bactérienne. Les bactéries sont incubées 15 min sur glace dans 40 µL avec 1 à 10 ng d'ADN, puis subissent un choc thermique permettant la transformation à 42 °C pendant 30 à 45 s. Après 5 min d'incubation sur glace, les bactéries sont incubées 1 h à 37 °C après ajout de 950 µL de milieu LB, puis étalées sur une boîte de culture, et mises à incuber toute la nuit à 37 °C. Le lendemain, une colonie est repiquée et diluée dans environ 3 mL de milieu LB et est incubée à 37 °C sous agitation douce pendant environ 8 h. Une partie de cette préculture est ajoutée à 100 mL de milieu LB incubé à 37 °C sous agitation toute la nuit. Le lendemain, l'ADN plasmidique est isolé à l'aide du kit Plasmid *Plus* Maxi kit (Qiagen), quantifié au Nanodrop (Thermoscientific), et conservé par 5 µg à -80 °C jusqu'à utilisation.

L'ARN viral est dans un premier temps transcrit à l'aide du kit MEGAscript® T7 (Ambion®). Tous les produits, en particulier l'ARN polymérase, sont conservés sur glace, et associés dans l'ordre suivant pour réaliser la réaction de transcription :

H <sub>2</sub> O nuclease-free	qsp 100 µL
ATP	10 µL
CTP	10 µL
GTP	10 µL
UTP	10 µL
Tampon de réaction 10X	10 µL
Plasmide pFK-Luc-Jc1	5 µg
ARN polymérase	10 µL

Après mélange à la pipette et centrifugation brève, l'ensemble est incubé à 37 °C pendant 4 à 6 h. En fin de réaction, l'ARN est traité à la DNase I afin de supprimer l'ADN plasmidique restant : 5 µL de DNase I sont ajoutés au 100 µL de réaction, et l'ensemble est incubé à 37 °C pendant 15 min. L'ARN est ensuite précipité à l'aide de chlorure de lithium : 150 µL de LiCl et 150 µL d'eau nuclease-free sont ajoutés à la réaction, et le tout est incubé au minimum 2 h à -20 °C. La transcription est ensuite centrifugée 15 min à 15000 rpm à 4 °C afin de culotter l'ARN. Le surnageant est éliminé, et remplacé par 1 mL d'éthanol pur. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 15000 rpm à 4 °C, l'éthanol est éliminé et remplacé par de l'eau nuclease-free (maximum 500 µL). L'ARN obtenu est alors quantifié au Nanodrop (Thermoscientific), et conservé par 10 µg à -80 °C jusqu'à utilisation.

### ***Electroporation des cellules Huh751***

Les cellules Huh751 sont cultivées de manière quasiment à confluence le jour de l'électroporation. Les cellules sont lavées au PBS et trypsinées, puis resuspendues dans du

milieu complet, centrifugées (5 min, 1000 g) et reprises dans 10 mL de PBS, filtrées à l'aide d'un tamis cellulaire, centrifugées et comptées dans du PBS froid, et diluées à  $7,5 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>.

400 µL de suspension cellulaire ( $3 \cdot 10^6$  cellules) sont mélangées à 10 µg d'ARN par aspirations-refoulements, puis transvasés dans une cuvette d'électroporation. Les cellules sont électroporées (5 pulses, 99 µs par pulse, 820 V), laissées incuber 10 min à température ambiante, puis transvasées dans deux flasques de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup> dans 12 mL et mises à l'incubateur.

Au bout de 4 h, les flasques sont transférées au laboratoire de niveau de sécurité P3, et le milieu est changé pour éliminer les cellules mortes et l'ARN non transfecté. Le surnageant est récolté, filtré (0,45 µ) et le milieu est changé tous les 2 à 3 jours en fonction de l'aspect des cellules. Une fois à confluence, les cellules peuvent éventuellement être divisées, et la récolte du surnageant poursuivie.

### *Test de l'infectivité des surnageants viraux*

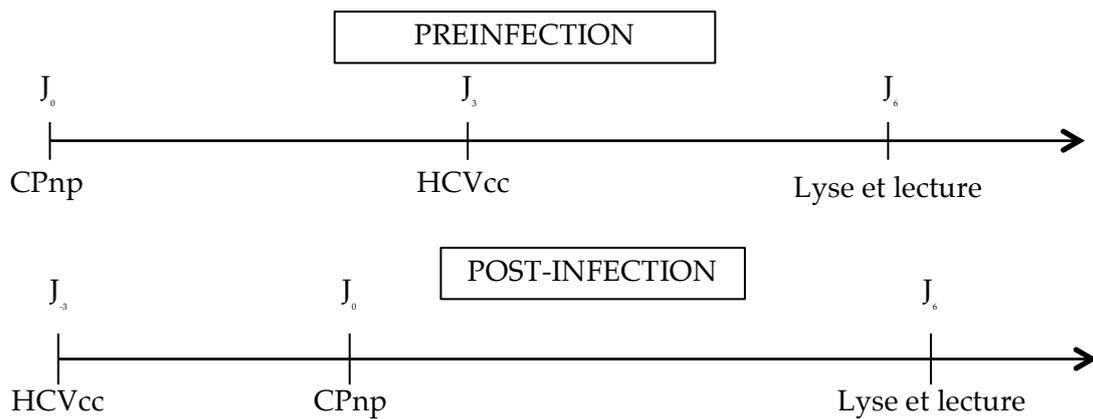
Des cellules sont mises en culture en plaques 96 puits à raison de  $10^4$  cellules par puits dans 100 µL de milieu complet. Le lendemain, au laboratoire P3, le milieu est retiré, et remplacé par 50 µL de surnageant viral et 100 µL de milieu frais (éventuellement rajouté seulement 4 h après). Après 3 jours d'incubation, les cellules sont lysées à l'aide de 50 µL de Glo Lysis Buffer (Promega) après retrait du milieu. 25 µL des lysats sont transférés dans une plaque propre, apte à sortir du laboratoire P3, puis additionnés de 25 µL de Bright Glo™ (Promega), et la luminescence associée à la présence du gène luciférase dans le génome viral est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithras LB 940, Berthold).

## **5. Expérimentations *in vitro* « classiques »**

Dans toutes les expériences utilisant des cellules, les incubations sont réalisées dans un incubateur à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>, sauf indication différente.

### *Infection virale par HCVcc Jc1Luc*

Les infections par les HCVcc Jc1Luc sont réalisées de la même manière que lors du test des surnageants viraux. Les expériences sont cependant réalisées en plaques 48 puits, les cellules sont mises en plaques à  $2,5 \cdot 10^4$  cellules par puits, et l'infection est réalisée avec 125 µL de virus.



**Illustration II-6 : Modèles d'infection virale et de transfection en pré- et en post-infection.**

En fonction du modèle d'infection utilisé (pré- ou post-infection), l'infection virale est initiée soit le lendemain de la mise en culture des cellules ( $J_{-3}$ ), soit 3 jours après ( $J_3$ ).

### ***Transfection de CPnp***

Les cellules (A549Luc, Huh7Luc ou Huh751) sont mises en culture en plaques 48 puits à raison de  $2,5 \cdot 10^4$  cellules par puits dans 250  $\mu\text{L}$  de milieu complet. Le lendemain, les CPnp sont diluées dans du milieu selon la dose choisie (cf Concentration des CPnp et doses utilisées), et le milieu de culture est remplacé. Dans le cas d'une expérience de post-infection, les CPnp sont déposées sur les cellules après 3 jours d'infection.

### ***Transfection de complexes PEIPyr/siRNA***

La transfection de complexes PEIPyr/siRNA est réalisée dans les mêmes conditions que les expériences de transfusions avec les CPnp. Les complexes sont préparés en mélangeant 80 ng de siRNA dans 75  $\mu\text{L}$  de milieu sans sérum et 12 nmol de PEIPyr dans 75  $\mu\text{L}$  de milieu sans sérum. La solution de PEI est ajoutée dans la solution de siRNA, et l'ensemble est vortexé 10 à 20 s, puis incubé à température ambiante 30 min, et déposé sur les cellules.

### ***Transfection DharmaFECT 4***

La transfection de siRNA avec DharmaFECT 4 (Thermoscientific) est réalisée dans les mêmes conditions que les expériences de transfusions avec les CPnp. La transfection est préparée en mélangeant 80 ng de siRNA dans 25  $\mu\text{L}$  de milieu sans sérum et 0,5  $\mu\text{L}$  de DharmaFECT 4 dans 25  $\mu\text{L}$  de milieu sans sérum. La solution de siRNA est ajoutée dans la solution de DharmaFECT 4, et l'ensemble est mélangé, puis incubé à température ambiante 20 min, et déposé sur les cellules.

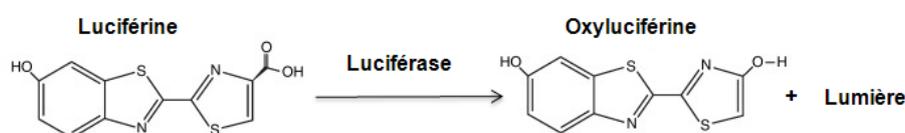
### *Transfection plasmidique*

10  $\mu\text{L}$  de lipofectamine et 100  $\mu\text{L}$  d'optiMEM sont mélangés et incubés pendant 30 min à température ambiante. En parallèle, 5  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique sont ajoutés à un mélange de 100  $\mu\text{L}$  d'optiMEM et de 10  $\mu\text{L}$  de Plus Reagent (Invitrogen), un réactif qui permet d'augmenter l'efficacité de transfection pour cette lignée cellulaire. Les contenus des deux tubes sont ensuite mélangés et laissés à température ambiante pendant 30 min, puis déposés dans les puits de culture cellulaire vides.  $2,5 \cdot 10^4$  cellules sont ensuite ajoutées dans les puits dans 250  $\mu\text{L}$  de milieu sans sérum. Le tout est incubé 12 h avant ajout de  $\text{TNF}\alpha$  et/ou de CPnp.

## 6. Techniques d'analyse

### *Activité luciférase*

Les cellules sont lysées pendant 5 à 10 min par ajout de 50  $\mu\text{L}$  de Glo Lysis Buffer (Promega) après retrait du milieu. 25  $\mu\text{L}$  des lysats sont transférés dans une nouvelle plaque, puis additionnés de 25  $\mu\text{L}$  de Bright Glo™ (Promega). La luminescence, associée à la transformation de la luciférine, présente dans le Bright Glo™, en oxyluciférine et en lumière, en présence de luciférase, est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithras LB 940, Berthold).



La quantité de protéine est dosée dans chaque échantillon analysé (cf § suivant). Les valeurs d'intensité lumineuse (RLU) sont normalisées par la quantité de protéine de chaque échantillon.

### *Quantités protéiques*

Les quantités protéiques des lysats sont mesurées par colorimétrie à l'aide du Kit DC Protein Assay (Biorad). Suite à la complexation des acides aminés présents par une solution de cuivre (solution A), puis par la réaction des protéines cuivriques avec un réactif phosphomolybdique (solution B), une coloration proportionnelle à la quantité protéique est obtenue. Pour cela, 25  $\mu\text{L}$  de solution A' (A' = A + 2 %S, un détergent) ainsi que 200  $\mu\text{L}$  de solution B sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque 96 puits à 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon. L'ensemble est incubé 15 min à l'obscurité et à température ambiante, puis lu à 670 nm à l'aide d'un lecteur de plaques. Les quantités sont calculées grâce à l'équation de la régression linéaire d'une gamme étalon de BSA (de 0 à 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans le tampon de lyse.

### *PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)*

#### Principe

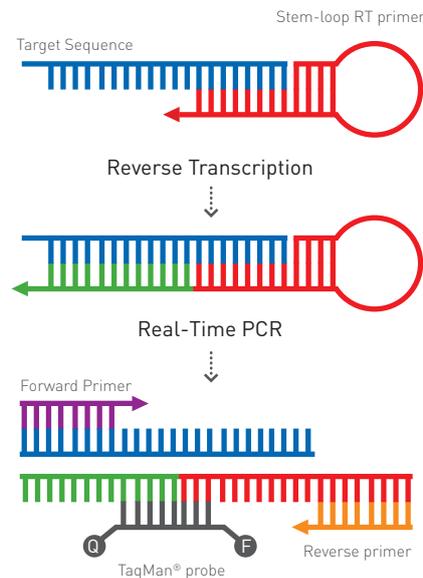
La réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction, PCR) quantitative en temps réel (qRT-PCR) est une technique utilisée depuis plus de 20 ans pour évaluer une quantité d'ADN ou d'ARN, si la qRT-PCR est précédée par une transcription réverse, afin d'obtenir l'ADN complémentaire. Comme lors d'une PCR classique, le double brin d'ADN est séparé par augmentation de la température, permettant, lors de la diminution de celle-ci la fixation de primers complémentaires sur l'ADN, et la synthèse des brins complémentaires grâce à une ADN-polymérase. La spécificité de la qRT-PCR est la fixation dans le même temps d'une sonde ADN complémentaire d'une séquence située entre les deux primers. Cette sonde comporte à une extrémité un fluorophore, et à l'autre extrémité un « quencher », absorbant l'énergie lumineuse émise par le fluorophore lorsque celui-ci est à proximité. Lors de la synthèse du brin complémentaire, la polymérase, grâce à son activité exonucléasique, détruit la sonde, éloignant le fluorophore du quencher, et lui permettant de fluorescer en présence d'une source lumineuse. Chaque cycle de PCR va permettre la production d'un nouveau brin d'ADN, et donc la libération d'un fluorophore supplémentaire, et ce de manière exponentielle, chaque brin d'ADN servant ensuite de guide pour la synthèse du brin suivant. Ainsi, la quantité d'ADN, de même que la fluorescence, double à chaque cycle.

L'appareil de qRT-PCR détermine un seuil de détection de la fluorescence. Le dépassement de ce seuil par la fluorescence d'un échantillon donne accès au nombre de cycles ayant permis d'atteindre celui-ci, ce qui permet ainsi de déterminer la quantité initiale d'ADN à l'aide d'une courbe étalon, réalisée en effectuant en parallèle à l'expérience une qRT-PCR sur une série de dilutions connues. A partir de ces données, l'appareil de qRT-PCR peut calculer la quantité initiale d'ADN présente dans chaque échantillon.

#### La qRT-PCR sur siRNA

L'utilisation de l'ARN interférence, ainsi que la recherche de nouveaux vecteurs de siRNA dans les cellules, ont engendré le besoin de trouver une technique capable de déterminer la quantité de siRNA réellement présente dans les cellules, et donc l'efficacité du vecteur et de la transfection des siRNA. Parmi d'autres méthodes, la qRT-PCR est apparue comme une technique des plus intéressantes, notamment de par sa sensibilité et sa fiabilité<sup>313</sup>. Son utilisation dans le domaine de l'ARN interférence est en constante augmentation depuis ses débuts, il y a 5 ans. La qRT-PCR sur petits ARN fonctionne sur le même principe que la qRT-PCR classique, mais avec des primers créés spécifiquement pour ce type de molécules, notamment un primer de

transcription réverse présentant une structure en épingle à cheveux, particulièrement efficace avec les petits ARN<sup>314</sup>.



**Illustration II-7 : qRT-PCR.**  
(Source : life technologies)

#### Déroulement d'une expérience

Les PHH sont mises en plaque 48 puits à raison de  $2.10^5$  cellules par puits. Le milieu de culture est changé après 24 h. Environ 36 h après la mise en plaque, des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> sont ajoutées dans le milieu de culture, enrobées avec siLuc ou siCTRL. A différents temps, le milieu de culture est retiré, les PHH sont lavés au PBS, et lysés par ajout de 350  $\mu$ L de QIAzol Lysis Reagent, et congelées.

L'ARN est ensuite extrait du lysat des PHH à l'aide du kit miRNeasy Mini (Qiagen). Les lysats sont incubés 5 min à température ambiante, puis additionnés de 70  $\mu$ L de chloroforme et vortexés 15 s. Après 3 min supplémentaires d'incubation, les lysats sont centrifugés 15 min à 12000 g et à 4 °C afin de séparer la phase supérieure aqueuse contenant le chloroforme, et l'ARN, de la phase contenant le phénol du tampon de lyse. La phase aqueuse est récoltée, et transférée dans un nouveau tube, et 1,5 volume d'éthanol pur y est ajouté pour précipiter l'ARN. Après homogénéisation, le mélange est transféré sur une colonne RNeasy Mini afin de purifier l'ARN. Ce dernier est lavé en trois étapes avec les tampons fournis par le kit, entrecoupées par de brèves centrifugations (15 s à une vitesse supérieure à 8000 g), puis élué dans 30  $\mu$ L d'eau RNase-free par centrifugation 1 min à une vitesse supérieure à 8000 g. L'ARN est ensuite quantifié au Nanodrop, puis congelé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

L'ADN complémentaire est ensuite obtenu par transcription réverse à l'aide du kit TaqMan® Small RNA assays (life technologies) et d'un primer commercial spécifique au siLuc.

L'ARN est tout d'abord dénaturé afin de séparer les doubles brins des siRNA, et permettre la fixation du primer. Pour cela, 5 µL d'ARN, contenant 1 à 10 ng d'ARN total sont mélangés à 3 µL de RT primer, et incubés 5 min à 85 °C, puis 5 min à 60 °C. Les échantillons sont conservés sur glace, et additionnés de 7 µL de master mix contenant :

Volumes	Produits
0,15 µL	100 mM dNTPs
1,00 µL	Réverse Transcriptase MultiScribe™, 50 U.µL <sup>-1</sup>
1,50 µL	Tampon de transcription réverse 10 ×
0,19 µL	Inhibiteur de RNase, 20 U.µL <sup>-1</sup>
4,16 µL	Eau Nuclease-free

Après avoir mélangé et centrifugé les solutions, elles sont incubées sur glace 5 min, puis insérées dans le thermocycleur afin de réaliser la transcription réverse selon le programme suivant :

Temps	Température
30 min	16 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C
+∞	4 °C

Les échantillons peuvent à nouveau être congelés à -20 °C avant utilisation, ou utilisés directement pour la qRT-PCR, en triplicats : 1 µL du produit de transcription réverse est transféré dans trois nouveaux tubes, et additionné de 18 µL de master mix composé de :

Volumes	Produits
1 µL	TaqMan® Small RNA Assay (20 ×)
10 µL	TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2 ×), no UNG
8 µL	Eau Nuclease-free

Après avoir mélangé et centrifugé les solutions, elles sont placées dans le système de détection Rotor Gene 6000 (Corbett) afin de réaliser la qRT-PCR selon le programme suivant :

	Temps	Température
	10 min	95 °C
40 cycles	15 s	95 °C
	60 s	60 °C

Pour pouvoir analyser les résultats de la qRT-PCR, la transcription réverse ainsi que la qRT-PCR sont réalisées en parallèle des échantillons sur une gamme 0,1 pg à 10 ng de siLuc seul. Trois contrôles négatifs sont également effectués : l'ensemble des manipulations sur 10 ng siCTRL seul, la transcription réverse ainsi que la qRT-PCR sur de l'eau nuclease-free, et la qRT-PCR sur de l'eau nuclease-free, afin de s'assurer qu'il n'y a eu de contamination à aucune étape.

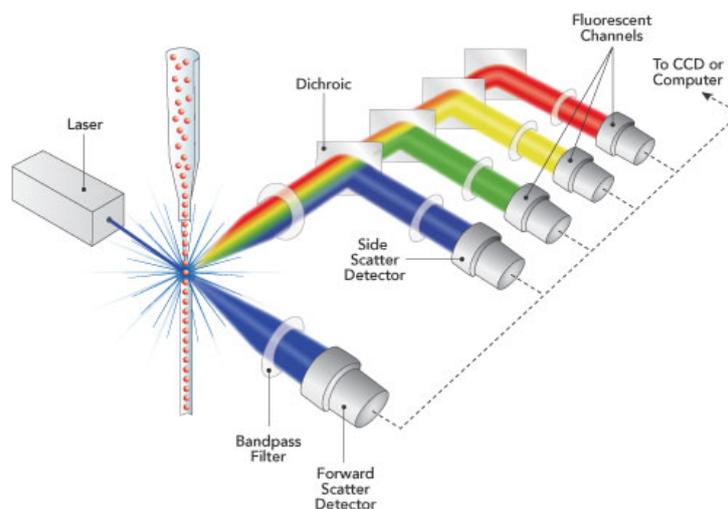
Grâce à la gamme étalon, le logiciel du système de détection va pouvoir établir une relation entre les seuils de détections obtenus et les quantités de siLuc de chaque point de la gamme. L'équation de la droite de régression obtenue permet de retrouver les quantités de siLuc présentes dans chaque échantillon.

### *Cytométrie en flux*

La cytométrie en flux permet de mesurer les caractéristiques (taille, granularité, etc.) de chaque élément d'une suspension (bactérie, cellules, etc.), ainsi que tout paramètre pouvant être détecté par fluorescence. Les éléments à analyser sont en suspension dans un flux liquide dans un capillaire, afin de ne permettre le passage que d'un élément à la fois.

Un laser passe à travers ce flux, et les signaux émis par chaque particule sont captés par des détecteurs :

- ❖ La taille des éléments est évaluée par un détecteur aligné avec le laser (Forward Scatter, FSC)
- ❖ Les éléments fluorescents situés dans les cellules ou attachés à leur surface, excités par le laser, ainsi que la granularité des cellules sont analysés par différents détecteurs (Side Scatter, SSC)



**Illustration II-8 : Cytométrie en flux.**  
(Source : Semrock).

L'association des différents paramètres récoltés par les détecteurs, ainsi que l'analyse des variations de chaque pic de fluorescence permettent d'obtenir diverses informations concernant les éléments analysés. Les données obtenues sont alors représentées sous forme statistiques ou sous forme graphique.

#### Evaluation de l'expression de CD81

Afin de déterminer l'impact des CPnp(PEIPyr/siCD81)<sub>2,5</sub> sur les cellules Huh751, celles-ci ont été transfectées avec les nanoparticules. L'expression de la protéine CD81 a été observée à différents temps, dans les cellules transfectées et des cellules contrôles non transfectées.

Pour cela, les cellules des deux conditions ont été détachées à 3, 5, 7, et 9 jours après transfection, à l'aide de trypsine, après retrait du milieu et lavage au PBS pour éliminer le reste de sérum du milieu, ce dernier pouvant inhiber la trypsine. Les cellules ont ensuite été récoltées dans du milieu, les trois puits de chaque condition étant regroupés, et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, comptées, et resuspendues dans du PBS à environ  $2,5 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>. 100 µL de chaque suspension ont été déposés dans une plaque 96 puits à fond en V, permettant de culotter aisément les cellules par centrifugation et d'éliminer le surnageant en retournant la plaque. Les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, et après retrait du surnageant, et les cellules ont été resuspendues dans 50 µL de PBS seul ou de PBS contenant des anticorps murins spécifiques anti-CD81 (5A6) (Santa Cruz) dilués au 1/30<sup>e</sup>, et incubées 1 h à 25 °C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et centrifugées, afin d'éliminer tous les anticorps primaires non fixés. Elles subissent ensuite un marquage par des anticorps secondaires spécifiques des anticorps de souris, conjugués avec de la phycoérythrine (PE) et dilués au 1/100<sup>e</sup> dans du PBS, et sont incubées 45 min à 4 °C à l'abri de la lumière. Cette seconde incubation est réalisée à 4 °C afin de ralentir les mouvements dans les membranes cellulaires, et éviter ainsi l'internalisation des complexes CD81-anticorps formés. Les cellules sont ensuite lavées au PBS, centrifugées, puis resuspendues dans du PBS 2 % PFA afin de fixer le marquage. Les marquages doivent être réalisés de manière à obtenir :

- ❖ Les cellules transfectées avec les CPnp et marquées avec l'anticorps CD81 et l'anticorps secondaire.
- ❖ Les cellules non transfectées et marquées avec l'anticorps CD81 et l'anticorps secondaire ; cette population constitue un contrôle positif, permettant d'évaluer le niveau d'expression normal de CD81.
- ❖ Les cellules transfectées avec les CPnp et l'anticorps secondaire (permettant de vérifier que ce dernier ne peut se lier seul aux cellules de manière non spécifique) ; c'est un contrôle négatif.
- ❖ Les cellules non transfectées (CD81) et l'anticorps secondaire (permettant de vérifier que ce dernier ne peut se lier seul aux cellules de manière non spécifique) ; c'est un contrôle négatif.

Les cellules sont ensuite passées au cytomètre MACSQuant Analyser (Miltenyi). Ce dernier est d'abord calibré à l'aide des populations de contrôles négatifs, afin de positionner le « 0 », c'est-à-dire le niveau de fluorescence considéré comme non spécifique, donc l'absence de CD81. Il est important de régler ce niveau car les cellules possèdent un certain niveau d'autofluorescence, qui, s'il n'est pas pris en compte de cette manière, pourrait indiquer à tort la présence de fluorescence spécifique, ici de CD81. La population de cellules non transfectées

marquées, le contrôle positif, est ensuite analysé. Cette population permet de mettre en place, dans notre cas, la valeur pour laquelle l'expression de CD81 est considérée comme étant de 100 %, une fois le seuil « 0 » (du marquage non spécifique) soustrait. Enfin, les cellules transfectées et marquées sont analysées, et le niveau de fluorescence de celles-ci, après soustraction du seuil « 0 », est rapporté à la valeur des cellules non transfectées afin de déterminer le pourcentage d'expression de CD81 dans cette population.

### **7. Expérimentation *in vitro* en 3D et analyse**

#### *Production de sphéroïdes*

Les plaques 96 puits utilisées pour la culture des sphéroïdes sont recouvertes de 50 µL de polyhydroxyéthylméthacrylate (polyHEMA) en suspension dans de l'alcool, puis laissées sécher 12 h dans une étuve sèche à 50 °C.

Les sphéroïdes sont produites par mise en culture de 80 cellules Huh751 dans une goutte de 15 µL de milieu complet suspendue au couvercle d'une plaque 96 puits pendant 3 jours à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Passé ce délai, du milieu de culture contenant des CPnp est déposé dans les puits recouverts de polyHEMA. L'ensemble plaque-couvercle est alors centrifugé une minute à 500 rpm afin de faire descendre les sphéroïdes formés dans les gouttes dans le milieu. La culture peut alors se poursuivre jusqu'à plus de 10 jours.

#### *Analyse*

L'analyse de la taille des sphéroïdes est réalisée à partir de photographies de ces derniers en microscopie optique. Celles-ci étant considérées comme des sphères, l'aire de la projection des sphéroïdes correspond à la plus grande surface. Celle-ci est alors mesurée à l'aide du logiciel libre ImageJ, puis normalisée par l'aire au jour 1 du même sphéroïde, permettant d'évaluer sa croissance.

Les images de microscopie confocale ont été réalisées après marquage des sphéroïdes avec le Kit PKH26 Fluorescent Cell Linker (Sigma), permettant le marquage cellulaire par incorporation d'un acide gras marqué dans les membranes.

### **8. Expérimentation *in vivo***

Les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément aux normes établies par la législation française et européenne concernant l'expérimentation animale. Le projet a reçu le 7/11/2012 l'autorisation n° AL/33/40/02/13 du CREMEAS (comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg

### *Productions de tumeurs in vivo*

#### Tumeurs sous-cutanées

10<sup>8</sup> cellules A549Luc ou Huh7Luc ont été injectées de manière sous-cutanée respectivement dans les flancs gauche et droit de souris Nude (NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>, Janvier) femelles de 8 à 12 semaines, ou dans le flanc gauche de souris BRG (Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup>, Janvier) femelles adultes. La croissance tumorale est suivie par bioluminescence après injection de luciférine à l'aide du système d'imagerie Ivis 50 (Xenogen-Caliper).

#### Tumeurs hépatiques

10<sup>8</sup> cellules Huh7Luc ont été injectées dans la rate de souris Nude femelles de 8 à 12 semaines. Celles-ci ont ensuite migré vers le foie par la veine splénique et la veine porte hépatique. La croissance tumorale est suivie par bioluminescence (BLI) après injection intra-péritonéale de 2 mg de D-luciférine (Xenogen-Caliper) à l'aide du système d'imagerie Ivis 50 (Xenogen-Caliper) (1 min d'acquisition 10 à 20 min après l'injection de D-luciférine). Pendant les injections comme pour l'imagerie, les souris sont maintenues sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane.

### *Efficacité de transfection in vivo*

#### Dans les tumeurs sous-cutanées A549Luc

L'ensemble des tumeurs a été réparti de manière égale et aléatoire en trois groupes, auxquels ont été injectés de la solution saline, des CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub>, ou des CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub>, les CPnp représentant à chaque fois 25  $\mu$ g de siRNA. Les injections ont été répétées tous les deux jours sur 14 jours, tandis que des BLI ont été réalisées tous les trois jours pour mesurer l'expression de la luciférase dans les tumeurs. Pour chaque tumeur, nous avons retenu le temps d'acquisition permettant d'obtenir la valeur de BLI la plus haute. A chaque point après initiation du traitement, la valeur de l'activité luciférase, exprimée en photons par seconde par cm<sup>2</sup> par radian carré (p.s<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>.sr<sup>-1</sup>), est normalisée par la valeur obtenue à jour 0 (avant le début des injections), le résultat est alors exprimé en bioluminescence relative.

#### Dans les tumeurs sous-cutanées Huh7Luc

L'ensemble des tumeurs a été réparti de manière égale et aléatoire en trois groupes, auxquels ont été injectés des CPnp(PEIPyr/siLuc)<sub>2.5</sub> représentant 1, 10 ou 100  $\mu$ g de siRNA. Des BLI ont été réalisées toutes les 24 h à partir de l'injection de CPnp pendant trois jours pour mesurer l'expression de la luciférase dans les tumeurs. Les données ont été normalisées comme indiqué ci-dessus.

### *Analyse la biodistribution in vivo par suivi de la radioactivité*

Les souris ont été divisées en deux groupes, le premier ayant reçu une injection de 200  $\mu\text{L}$  de suspension de clodrosome par voie i.p. 24 h avant l'expérience (5  $\text{g.L}^{-1}$  de clodronate, Encapsula Nanosciences LLC, Nashville, USA), permettant la déplétion des macrophages, et donc des cellules de Kupffer. Les souris ont reçu une injection i.v. dans la veine caudale de 200  $\mu\text{L}$  de particules marquées au technétium (15 MBq de  $^{99\text{m}}\text{Tc-CPnp}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc-CPnp}(\text{siCont/PEIY})_2$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc-CPnp}(\text{siCont/PEIY-Gal})_2$ ). Le technétium 99 (Tc) est un marqueur radioactif permettant de suivre un produit, ici les CPnp, dans l'organisme, par tomographie ou scintigraphie

Une première image de tomodensitométrie (CT) a été réalisée pour chaque souris, afin de pouvoir reconnaître les différents organes grâce à une reconstruction 3D de l'animal. Toutes les mesures ont été réalisées à l'aide de la plateforme AMISSA, un système d'imagerie multimodal « maison » pour petits animaux, combinant différents appareils de mesure. Les souris ont été anesthésiées avant l'expérience par injection i.p. d'une solution à 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de hydrochloride de kétamine à 10 % et de xylazine à 5 %. Les images en tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou micro Single Photon Emission Computed Tomography,  $\mu\text{SPECT}$ ) permettant de détecter les rayons gamma du technétium, ont été réalisées 4 min après l'injection des CPnp.

Une heure après injection, les animaux ont été sacrifiés, et les organes principaux (cœur, reins, poumons, rate, intestins et estomac) ont été disséqués, pesés et leur radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur Geiger détectant les rayons gamma (IsoMed 2000 Nuclear Medizine technik Dresden, Germany). Ces résultats ont permis de calculer la radioactivité relative pour chaque organe.

---

# Résultats

---

## I. Caractérisation des nanoparticules de phosphate de calcium de formulation CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub>

**Publication :** Potent calcium phosphate nanoparticle surface coating for in vitro and in vivo siRNA delivery: a step toward multifunctional nanovectors.

Thirunavukkarasu Devarasu, **Roxane Saad**, Ali Ouadi, Benoit Frisch, Eric Robinet, Patrice Laquerrière, Jean-Claude Voegel, Thomas Baumert, Joelle Ogier and Florent Meyer

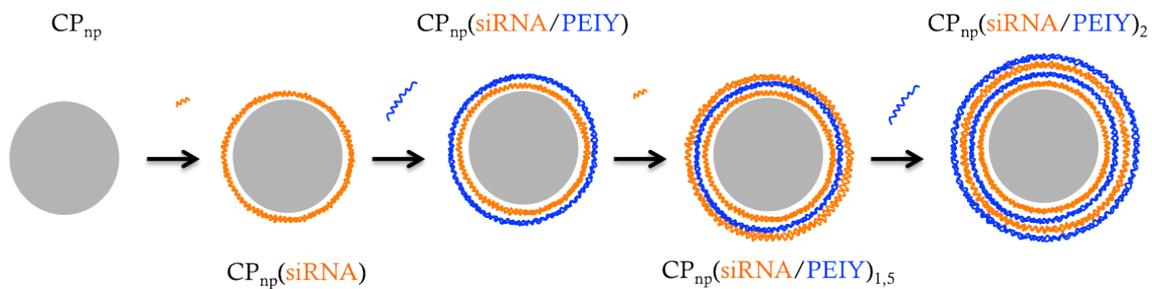
DOI: 10.1039/c3tb20557f

Les nanoparticules utilisées au cours de ce travail sont l'association d'un matériau biocompatible et biodégradable (le cœur de phosphate de calcium), à un agent de transfection puissant (PEI), et à un type de molécule à très haut potentiel thérapeutique (siRNA).

L'étude présentée ici a pour but d'évaluer les capacités de ce nouveau type de formulation en tant que vecteur de siRNA. Le choix de cette formulation se base notamment sur les connaissances issues d'études précédentes réalisées par notre laboratoire concernant le recouvrement de surface par des complexes PEI/ADN plasmidique ou PEI/siRNA<sup>302,315,316</sup>. Le polymère choisi, le PEI est utilisé ici sous deux formes modifiées : le PEI greffé avec des molécules de tyrosine (PEIY), ainsi que le PEIY greffé avec du galactose (PEIY-Gal), ce dernier ayant pour fonction de cibler les récepteurs aux asialoglycoprotéines exprimés de façon spécifique par les hépatocytes<sup>317,318</sup>.

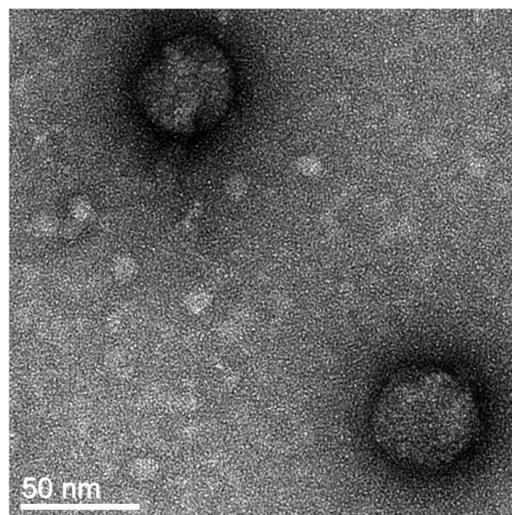
### 1. Production et caractérisation des CPnp (siRNA/PEIY)<sub>2</sub>

La production des nanoparticules est réalisée en deux étapes. La première consiste en la formation du cœur de phosphate de calcium en milieu aqueux, suivi par l'enrobage par les siRNA et le PEIY ou PEIY-Gal en alternance (Illustration II-1A). L'adsorption maximale de siRNA sur les CPnp a été déterminée par incubation de 10 mg de siRNA dans 1 mL de suspension des particules pendant 1 h à 4 °C sous agitation. Après filtration des CPnp enrobées, la concentration de siRNA restante dans le filtrat a permis de déterminer qu'une quantité de  $2,35 \pm 0,25$  mg de siRNA peuvent être adsorbés sur les nanoparticules pour 1 mL. Nous avons choisi d'utiliser la moitié de cette quantité pour l'enrobage de chaque couche de siRNA, soit 1,3 mg pour 1 mL. La concentration de PEI utilisée a été déterminée de façon à obtenir un ratio N/P = 3.



**Illustration II-1 : Représentation schématique de la production et enrobage des CPnp.**

En fin de production, les particules présentent une charge positive (24-30 mV), ainsi qu'une taille d'environ  $58 \pm 2$  nm, mesurées par DLS, et confirmées par TEM (Figure I-1).



**Figure I-1 : Micrographie représentative des CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> après coloration à l'acétate d'uranyle (TEM).**

Les mesures de taille ont été réitérées pendant 6 jours par DLS, confirmant l'absence de formation d'agrégats, ceci étant généralement une limitation majeure à l'utilisation des particules de phosphate de calcium. Ces résultats montrent la capacité des multicouches de polyelectrolytes à stabiliser les particules, confirmant les données d'autres groupes pour des formulations contenant de l'ADN plasmidique<sup>160,161</sup>.

## 2. Efficacité d'interférence ARN *in vitro*

L'efficacité d'interférence ARN des CPnp a été évaluée *in vitro* : des siRNA ciblant la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) ont été générés (siLuc), afin d'observer l'inhibition d'expression de ce gène rapporteur, exprimé de manière stable dans la lignée cellulaire pulmonaire A549Luc. Après 48 à 72 h d'incubation des cellules avec les CPnp comportant soit les siLuc, soit des siRNA contrôles (siCont) – dont le design est tel qu'ils ne présentent pas de cible cellulaire humaine –, l'activité luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires.

Quel que soit le polymère (PEIY ou PEIY-Gal), les CPnp montrent une inhibition spectaculaire de l'expression de la luciférase dans les cellules A549Luc, à savoir respectivement 95 et 98 % d'inhibition à 48h. Cet effet est maintenu au moins 3 jours, l'inhibition étant alors de 95 et 86 %, respectivement (Figure I-2). Ces résultats montrent que l'ajout de galactose ne modifie pas l'efficacité de libération des siRNA.

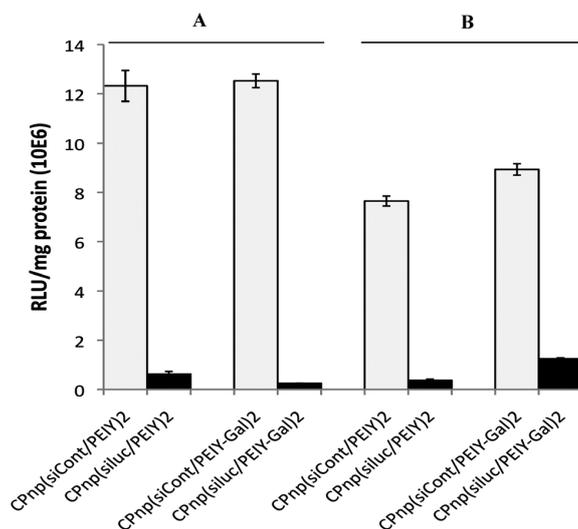


Figure I-2 : Efficacité d'interférence ARN *in vitro* par CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> et CPnp(siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> sur des cellules A549Luc. Des cellules A549Luc (carcinome pulmonaire humain), exprimant de manière stable le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* à partir du plasmide pGL3 (Clontech, CA), ont été transfectés avec une suspension des deux types de CPnp contenant l'équivalent de 1 mg de siLuc, ciblant le gène GL3, diluée dans le milieu de culture. Des CPnp enrobées avec un siRNA non ciblant (siCont) ont été utilisés comme contrôle négatif. Mesure de l'activité luciférase à 48 h (a) et 72 h (b).

### 3. Efficacité d'interférence ARN *in vivo*

Suite à ces résultats positifs, nous avons évalué l'efficacité d'interférence ARN des CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> *in vivo* grâce à un modèle murin de xéno greffes contra-latérales, développé par injection sous-cutanée de cellules A549Luc. Les tumeurs ayant atteint une taille suffisante, des CPnp ont été injectées directement dans celles-ci, en quantités correspondant à 5 ou 25 µg de siRNA. Après mesure de la bioluminescence engendrée par les cellules A549Luc, directement associée à la taille de la tumeur, il a été déterminé que cette seule injection, quelle que soit la dose, n'était pas suffisante.

L'expérience a alors été renouvelée avec la dose 25 µg de manière itérative (8 injections, une injection toutes les 48 h). La mesure de la bioluminescence relative au jour 0 du groupe contrôle montre une augmentation de celle-ci, corrélée à la croissance tumorale normale. Dans le groupe siLuc, par contre, la bioluminescence relative, restant stable, indique la diminution générale de l'expression de la luciférase dans la tumeur en croissance (Figure I-3). Ces résultats confirment la capacité des CPnp d'inhiber l'expression d'un gène spécifique *in vivo*.

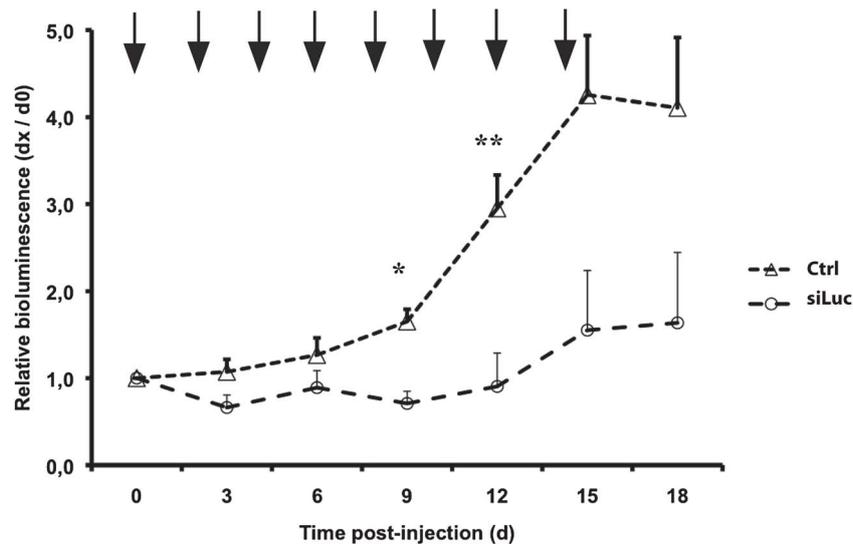


Figure I-3 : Efficacité *in vivo* des nanoparticules CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> sur des tumeurs sous-cutanées A549Luc dans des souris nude. Bioluminescence relative (moyenne ± écart-type) après 8 injections tous les deux jours (flèches) de nanoparticules correspondant à 25 µg de siLuc, comparée au groupe contrôle (\* p = 0,029 (T- vs. siLuc)), (\*\* p = 0,016 (T- vs. siLuc)).

L'intensité de bioluminescence semble toutefois également diminuer au jour 15 dans le groupe contrôle ayant subi l'injection de CPnp enrobées avec un siRNA contrôle. Ceci peut être dû, à l'effet off-target associé à la concentration importante de siRNA administrée. L'utilisation de différents siRNA ciblant le même gène pourrait aider à résoudre ce problème de façon générale.

#### 4. Biodistribution *in vivo*

Nous avons émis l'hypothèse que l'ajout de galactose sur les CPnp permettrait de cibler les cellules présentant des récepteurs aux asialo-glycoprotéines. Nous avons choisi d'étudier la validité de cette hypothèse en étudiant la biodistribution *in vivo* des CPnp associées au PEIY ou au PEIY-Gal grâce à un marquage radioactif des nanoparticules au technétium. A bout d'une heure, la distribution de la radioactivité montre un signal fort dans les glandes thyroïdes, salivaires, et dans l'estomac, dû à la présence de technétium libre dans la suspension de particules. Le foie et la vessie montrent des signaux radioactifs significatifs.

Afin de préciser la répartition des nanoparticules, chaque organe a été analysé après sacrifice et dissection des animaux, montrant – après comparaison avec la répartition organique de technétium libre – une localisation préférentielle des nanoparticules dans le foie et les poumons.

L'utilisation de clodronate, supprimant les cellules de Kupffer, a permis de vérifier que le signal hépatique reste important pour les CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub>, suggérant l'entrée majoritaire des nanoparticules dans les hépatocytes. Les CPnp enrobées avec le PEIY-Gal sont davantage

affectées par le traitement au clodronate. Le récepteur au galactose étant exprimé à la fois sur les cellules de Kupffer et sur les hépatocytes, ce résultat pourrait suggérer une endocytose médiée par récepteur dans les cellules de Kupffer.

### **5. Conclusion**

Le vecteur présenté dans cette publication constitue un outil prometteur dans le cadre des pathologies liées à une dérégulation génique. En effet, ces nanoparticules, de taille compatible avec la fenestration capillaire, et suffisamment petites pour limiter la phagocytose, sont stables au moins 6 jours, et permettent une libération efficace de siRNA à la fois *in vitro* et *in vivo*.

La possibilité d'y associer un agent d'imagerie est susceptible de transformer cet outil thérapeutique en véritable « couteau suisse » biologique, c'est-à-dire une nanoparticule multifonctionnelle à visée théranostique<sup>156</sup>.

De plus, la distribution hépatique préférentielle, ainsi que la possibilité de modifier le PEI afin d'obtenir un ciblage spécifique, font de ces particules un outil innovant des plus intéressants notamment pour la vectorisation de siRNA vers le foie.

Cite this: DOI: 10.1039/c3tb20557f

## Potent calcium phosphate nanoparticle surface coating for *in vitro* and *in vivo* siRNA delivery: a step toward multifunctional nanovectors†

Thirunavukkarasu Devarasu,<sup>a</sup> Roxane Saad,<sup>a</sup> Ali Ouadi,<sup>d</sup> Benoit Frisch,<sup>b</sup> Eric Robinet,<sup>c</sup> Patrice Laquerrière,<sup>d</sup> Jean-Claude Voegel,<sup>a</sup> Thomas Baumert,<sup>c</sup> Joelle Ogier<sup>a</sup> and Florent Meyer<sup>\*a</sup>

The present study describes hybrid nanoparticles, built by alternate deposition of siRNA and modified polyethyleneimine (tyrosine-grafted PEI or tyrosine/galactose-grafted PEI) on calcium phosphate nanoparticles. These “easy to produce” nanoparticles (NPs) present an efficient gene silencing effect demonstrated *in vitro* in a luciferase expressing cell culture model and *in vivo* in a tumour xenograft mouse model. The luciferase gene silencing percentage reached up to 95% *in vitro* with biocompatible doses of siRNA. Interestingly, we show by SPECT imaging of radiolabeled particles that without modifying the size, stability and *in vitro* efficiency, the grafting of a sugar moiety on PEI can modify the *in vivo* biodistribution of the particles. The proof of concept that galactose-grafting on PEI could change biodistribution without changing the gene silencing efficiency makes them versatile tools for specific delivery of small interfering RNA. As they have been designed so far, biodistribution is mainly located in the liver and thus these innovative nanoparticles open a realistic and feasible strategy for siRNA delivery into the liver *in vivo*.

Received 18th April 2013

Accepted 5th July 2013

DOI: 10.1039/c3tb20557f

[www.rsc.org/MaterialsB](http://www.rsc.org/MaterialsB)

Therapeutic applications of siRNA technology in disorders involving gene deregulation, especially in cancer, imply an efficient delivery of therapeutic siRNA, which can be achieved by siRNA encapsulation. Among various strategies for siRNA vectorisation, we focused our interest on calcium phosphate particles that are of particular interest for *in vivo* applications due to their biocompatibility and potential degradability.<sup>1,2</sup> This strategy brings protection from various degradation processes encountered *in vivo* as well as a progressive release during dissolution processes. Various drugs and molecules, from antiproliferative drugs to near infrared fluorescent dyes, have been encapsulated in calcium phosphate size-controlled particles.<sup>3–5</sup> Such strategies have been used for production of multifunctional nanoparticles aimed at multimodal imaging or theranostic applications.<sup>6–11</sup> Promising hybrid nanoparticles have been recently tailored for siRNA delivery toward treatment of pancreatic cancer or lung metastasis.<sup>12,13</sup> However several adjustments remain to be achieved to obtain the desired RNA

interference effect in clinical applications. Here we aim to investigate the feasibility of new Ca/P-based formulations as siRNA delivery vectors with organ specific targeting capability and biocompatible siRNA dose efficiency.

It has been shown previously that an outer shell of positively charged poly(ethyleneimine) (PEI) on calcium phosphate DNA-loaded nanoparticles could increase the transfection ability above those of calcium phosphate or PEI alone.<sup>14,15</sup> If PEI is a strong transfection agent for DNA due to its great endosomal escaping capability, PEI/siRNA complexes are highly unstable. Specific PEI-based polymers have been developed to go beyond this problem, like tyrosine- or pyridine-bearing PEI. Efficient siRNA delivery and gene silencing have been achieved *in vitro* with these polymers.<sup>16,17</sup> However such a protocol still results in a short term effect for a few days. Based on our previous studies on surface coating with PEI/DNA complexes by the layer-by-layer technique,<sup>18,19</sup> we developed a method to prepare calcium phosphate nanoparticles (CPnps) coated with siRNA and tyrosine-grafted PEI polymers. In the present study, two different polymers were used: simple tyrosine-grafted PEI (PEIY) and galactose-grafted PEIY (PEIY-Gal), the last one being aimed at targeting asialo-glycoprotein receptors specifically expressed by hepatocytes.<sup>20,21</sup> We show the successful formulation of calcium phosphate nanoparticles coated with (siRNA/PEIY)<sub>2</sub> or (siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> multilayers with no toxicity, high gene silencing efficacy *in vitro*, long lasting effect *in vivo*, and a preferential

<sup>a</sup>UMR 1121, INSERM/Université de Strasbourg and IHU Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France. E-mail: [fmeyer@unistra.fr](mailto:fmeyer@unistra.fr)

<sup>b</sup>UMR 7199, CNRS/Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, F-67400, France

<sup>c</sup>Inserm U1110/Université de Strasbourg and IHU Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France

<sup>d</sup>UMR 7178, CNRS/Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67036, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3tb20557f

liver biodistribution. Such nanoparticles could be of great interest in a multifunctional approach by using the core particle for drug or imaging agent encapsulation to complement the targeted delivery of siRNA.

## Results and discussion

### CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> production and characterization

Calcium phosphate nanoparticles were produced by a wet chemical process (concentration 0.02% p/v). Directly after their formation, they are coated with siRNA and PEIY or siRNA and PEIY-Gal by alternate deposition without a rinsing step. siRNA maximum absorption on calcium phosphate nanoparticles was first determined by incubating 10 µg siRNA with 1 mL of a calcium phosphate nanoparticle suspension for 1 hour at 4 °C under constant stirring. The siRNA concentration was measured in the flow through after centrifugation of the solution at 10 000g in a centrifugal filter (Amicon® ultra centrifugal filter 0.5 mL, Ultracel®-50K membrane, cut off = 50 kDa) by spectrophotometry at 260 nm (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). 2.35 ± 0.25 µg of siRNA are adsorbed per mL of nanoparticle suspension. About half of this concentration, 1.3 µg, has been used for the coating of the nanoparticles. The concentration of PEI added for the coating of the particles represents a N/P ratio = 3. The alternate deposition of each component has been followed by surface potential measurements (Fig. 1). Addition of each polymer to the nanoparticle mixture led to a change of surface potential as classically observed during polyelectrolyte multilayer buildup. After the completion of the coating, the particles CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> show a net positive charge (24–30 mV) and a hydrodynamic size of 56–60 nm due to PEIY or PEIY-Gal coating, respectively. Transmission electron microscopy (TEM) imaging was done on a crude sample and after uranyl acetate coloration. The particle size was confirmed by TEM imaging (Fig. 2). Nucleic acid complexes with various polymers can be visualized by TEM imaging after uranyl acetate coloration.<sup>22</sup> Careful observation

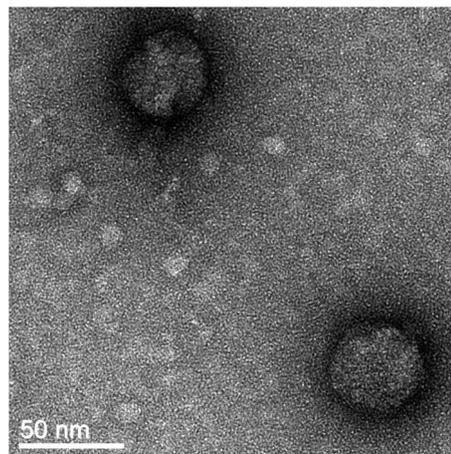


Fig. 2 TEM imaging representative micrograph of CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> after acetate uranyl coloration.

was made to detect the presence of PEIY/siRNA non-associated with calcium phosphate particles. No PEIY/siRNA complexes were detected.

Since particle aggregation remains a limitation among calcium phosphate particle carriers due to their chemistry, we analysed the size of the coated particles for 6 days by dynamic light scattering (DLS) measurements. The particle size remained stable during the time course of the experiment (Fig. 3), which confirms that coating with polyelectrolyte multilayers can stabilize the particles.<sup>23</sup> These results are in agreement with other groups using PEI as a stabilising agent for calcium phosphate particles.<sup>14,15</sup> The stability of surface coatings was assessed, in the presence of serum, by a gel retardation assay. Briefly, CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> were incubated in fetal bovine serum (FBS south American (CE) GIBCO, ref. 11573397, Fisher Scientific) for 1 hour and subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel. No siRNA release

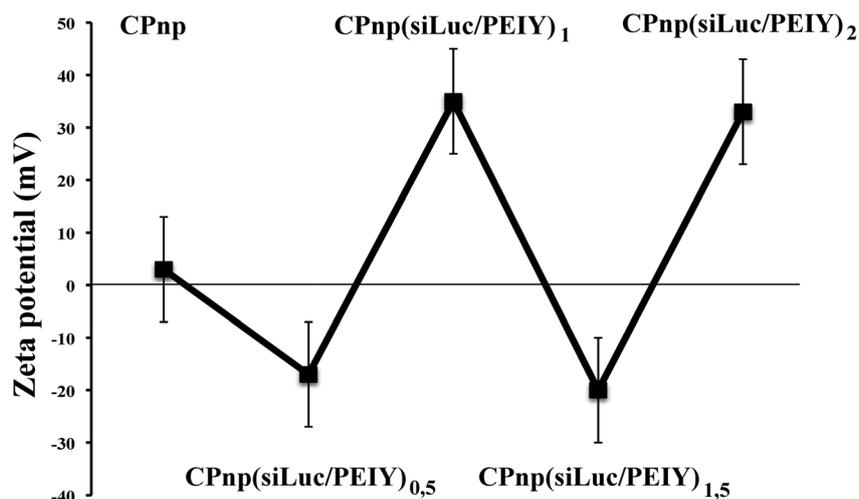
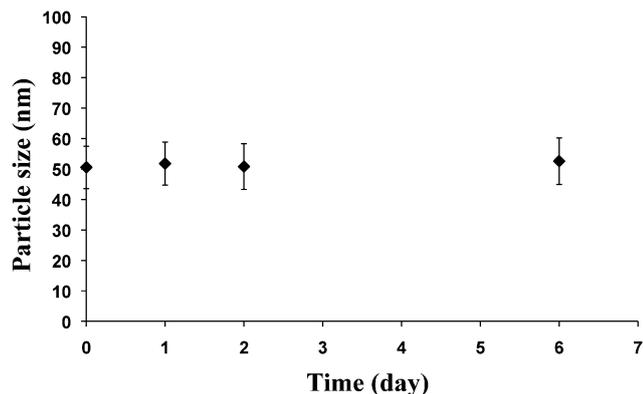


Fig. 1 Evolution of the surface potential of CPnps during the coating process. After each step of the coating, the surface potential of the particle was recorded using a NanoZS apparatus (Malvern). Change of surface charge illustrates the potent coating of the particles by the polyelectrolytes.

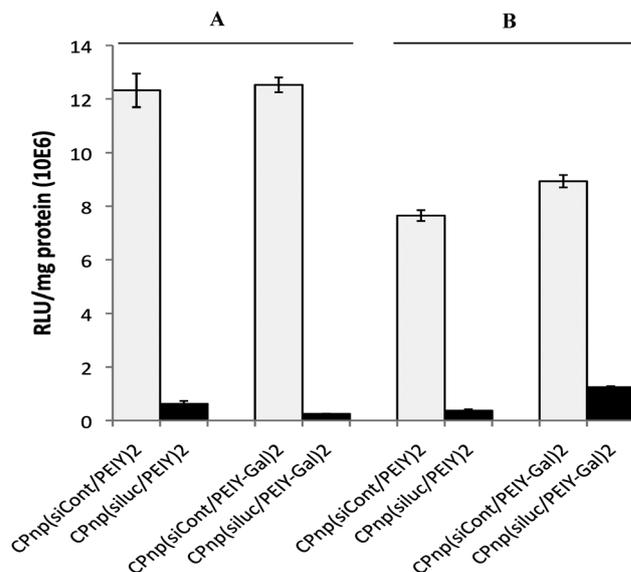


**Fig. 3** Evolution of the size of CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> over time. Particle size after coating was recorded over a period of 6 days by DLS. Particles were maintained at 4 °C during all the periods examined. At each time point, 1, 2 and 6 days, 1 mL of CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> suspension was used for measurements. CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> particles remain stable in size over the periods examined. The coating process preserves particles from aggregation.

was recorded (Fig. S1†). CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> toxicity was determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test on A549luc cells. No toxicity was detected up to a ratio of 1 µg of siRNA per mL of cell culture medium (data not shown).

#### *In vitro* gene silencing efficacy

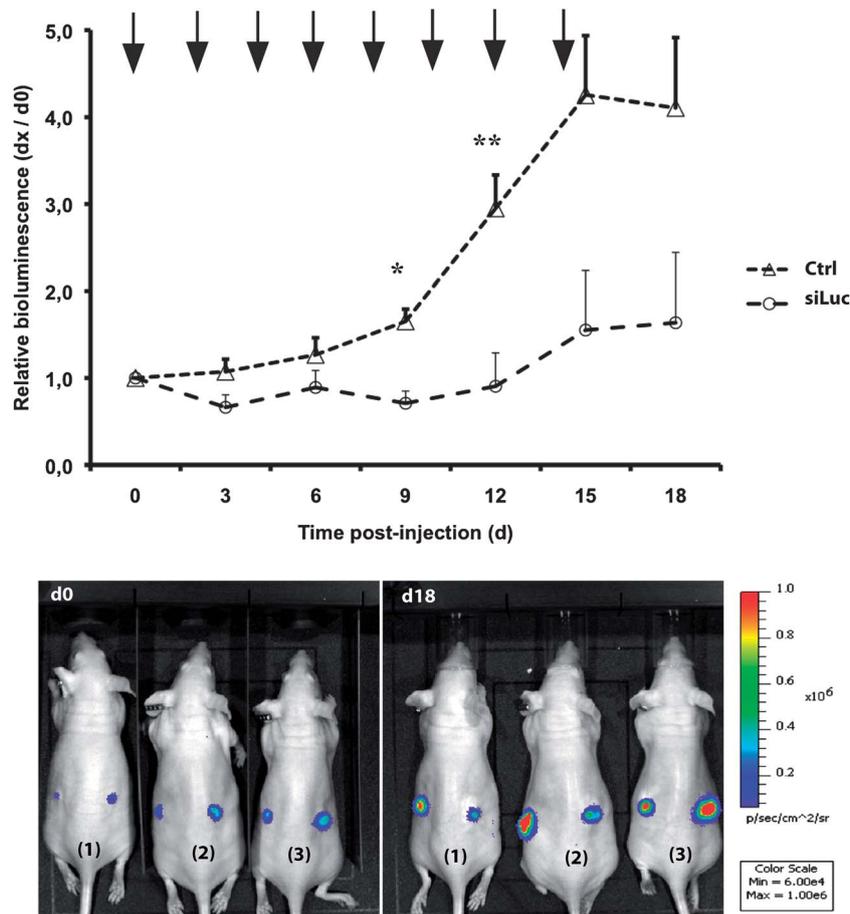
To investigate whether these siRNA-coated CPnps can be used as carriers for siRNA delivery and gene silencing therapy, *in vitro* gene silencing experiments were carried out. The capability of CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> to deliver efficiently siRNA into cells was evaluated by monitoring the inhibition of the firefly luciferase gene expression in A549luc cells using a specifically designed siRNA:siLuc (Custom siRNA, Dharmacon). To avoid the experimental bias generated by transient plasmid transfection, we used a cell line that stably expresses the reporter gene. Nanoparticles were added to cells by dilution with cell media containing serum. CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> bearing siGenome non-targeting siRNA (siCont) (siGENOME non-targeting siRNA #1, ref. D-001210-01-05, Dharmacon) were used as negative controls. Cells were incubated with nanoparticles for 48 h or 72 h. The luciferase activity was quantified from cell lysate (Fig. 4). The luciferase expression level is shown as a relative light unit (RLU) normalized for protein quantity. 48 hours after addition of CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> or CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub>, carrier-mediated siRNA delivery resulted in a marked inhibition of the reporter gene expression in A549luc cells, with 95% and 98% of inhibition, respectively. In contrast, incubation of cells with CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> or CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> had no significant effect. Furthermore, this strong inhibitory effect was maintained over 3 days, with 95% and 86% of inhibition for CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub>, respectively. These results demonstrate that the addition of galactose moieties does not change the efficiency of siRNA delivery (Fig. 4).



**Fig. 4** *In vitro* gene silencing efficiency of CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> on A549luc cells. A549luc cells (human lung carcinoma cell line), stably expressing *Photinus pyralis* luciferase gene from pGL3 (Clontech, CA), were transfected with CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> or CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub> suspension bearing the equivalent of 1 µg of siLuc, targeting GL3 gene, diluted in serum containing cell culture medium. CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> bearing siGenome non-targeting siRNA (Dharmacon) were used as negative controls. The luciferase activity was recorded (a) after 48 h and (b) after 72 h. CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub> allow spectacular inhibition of the gene reporter expression in A549 cells, with 95% and 98% of inhibition, respectively at 48 h. Effective inhibition is maintained over 72 h with 95% and 86%, respectively.

#### *In vivo* gene silencing efficacy

*In vivo* siRNA delivery using CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> particles has been tested on a tumour xenograft mouse model. Subcutaneous tumours were generated in nude mice by subcutaneous injection of 10E7 A549luc cells. Once tumours grew up to a size reaching  $\geq 40$  mm<sup>3</sup> and bioluminescence analysis confirmed luciferase expression, CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> particles, equivalent to 5 or 25 µg of siRNA in 40 µL NaCl 0.9%, were injected directly into the tumour. Tumour bioluminescence was monitored every three days and siLuc delivery efficacy was assessed by the reduction in tumour bioluminescence intensity as directly related to luciferase expression in A549luc cells. For both siLuc doses tested (5 and 25 µg), a single injection failed to produce any significant reduction of luciferase activity, as compared to control groups (NaCl 0.9% injection and non-targeting siRNA (siCont) bearing particles) (data not shown). Eight iterative injections of CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> particles containing 25 µg siRNA, every two days for 14 days, were then performed and analysed against control treatment. Relative tumour bioluminescence to day 0 time point is represented in Fig. 5. The control group shows an increase of bioluminescence. Considering that the luciferase expression per cell remains constant over the time course of the experiment, this increase is correlated with the normal tumour growth. In the siLuc group, the relative bioluminescence remains stable over the time course of the experiment showing that the overall luciferase expression decreases in the growing tumour. It is noteworthy that careful analysis of



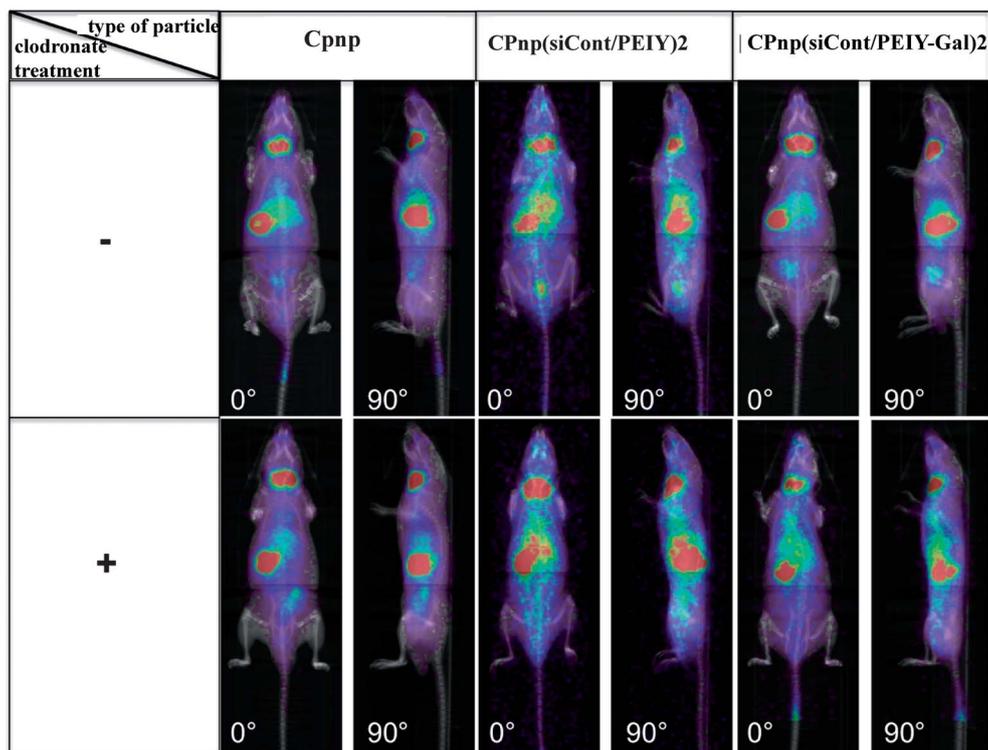
**Fig. 5** *In vivo* efficacy of CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> nanoparticles on A549luc subcutaneous tumour. (Upper panel) Relative bioluminescence of A549luc subcutaneous tumours in nude mice (mean ± SE) after 8 injections every two days (arrows) of CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> representing 25 µg of siRNA (siLuc – dashed line). The relative bioluminescence intensity of the siLuc group (*n* = 8) remains stable over the time course of the experiment showing an overall inhibition of luciferase expression in the growing cells, compared to the control group (T-, *n* = 25) showing a constant increase in relative bioluminescence intensity (\**p* = 0.029 (T- vs. siLuc)), \*\**p* = 0.016 (T- vs. siLuc). (Lower panel) Tumour luciferase activity analysis by bioluminescence imaging. The luciferase activity of A549luc subcutaneous tumour was recorded using an IVIS *in vivo* imaging system (Perkin Elmer), after intraperitoneal injection of 2 mg D-luciferin (Xenogen-Caliper). The region of interest was drawn manually for each tumour to analyse luminescence intensity. Imaging was done every three days. The luciferase activity recorded was used to determine gene silencing efficacy by comparing each measure from day 0. Three representative mice, bearing two tumours, are shown at two representative time points (day 0 (d0) and day 18 (d18)). The right tumours are treated with CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> and left ones are non-treated (1), injected with saline or (2) injected with CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> representing 25 µg siRNA (3).

bioluminescence variation in the three different control groups (Fig. S2†) does not show any significant difference. However it seems that the bioluminescence intensity is lowered in the siCont control group, which could be due, considering the siRNA local concentration, to an off target effect. Such an effect, described as an unexpected gene silencing of non-targeted genes, has been extensively described with siRNA and is directly dependent on the concentration.<sup>24,25</sup> One way to overcome this problem would be to multiply the number of different siRNAs targeting the same gene. Altogether these results confirmed the efficacy of the particle to trigger specific gene silencing *in vivo*.

### *In vivo* biodistribution

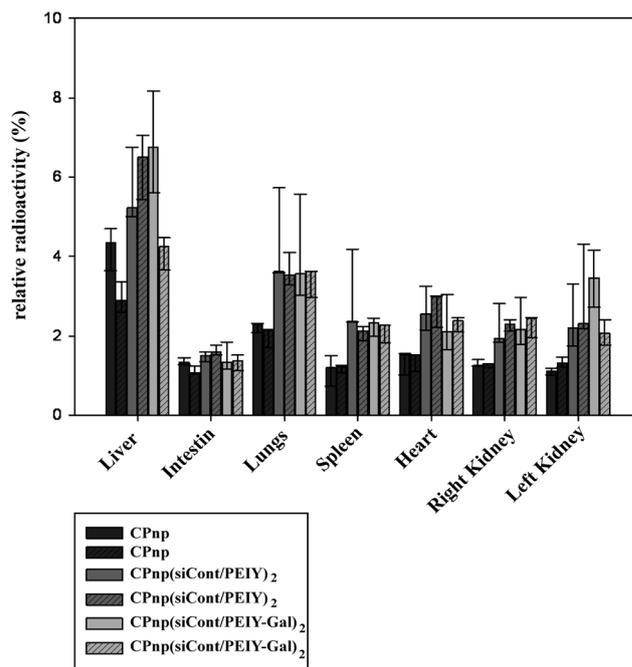
As we hypothesized that galactose grafting would address the particles to cells bearing asialo-glycoprotein receptors, we studied the *in vivo* biodistribution of CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub> in a mouse model. 200 µL of

radiolabelled CPnps (representing approximately 80 MBq), radiolabelled CPnps coated with (siLuc/PEIY)<sub>2</sub> or (siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub>, were intravenously injected into the tail vein of Institute for cancer research (ICR) mice. Fig. 6 shows the radioactivity distribution in the whole animal as recorded by single photon emission computed tomography (SPECT) one hour after injection. Salivary glands, thyroid and stomach show a strong signal due to the presence of free technetium in the particle suspension, as confirmed by imaging free technetium without particles under the same conditions (data not shown). A particularly strong signal has been recorded in the stomach which is probably mainly due to the free technetium, although it could also reflect the contribution of this specific organ to the particle scavenging.<sup>26–28</sup> The liver and bladder in all animals show significant radioactive signals. No signal was recorded in the thorax and bowels. Similar results were observed with gold nanoparticles showing that above 50 nm, gold nanoparticles coated with galactose have the same organ distribution as that



**Fig. 6** Radiomaging of calcium phosphate nanoparticles technetium labelled and coated calcium phosphate nanoparticles technetium labelled biodistribution in mouse models by CT scan and SPECT. 200  $\mu\text{L}$  of CPnp, CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> or CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> nanoparticles, labeled with technetium 99, representing approximately 80 MBq, were injected into mice by tail vein intravascular injection. Half of the mice were treated with clodronate 24 h before injection to induce Kupffer cell depletion. One hour post-injection mice were imaged by CT and SPECT scans. To facilitate organ recognition, CT and SPECT images have been superposed. A coronal (0°) and sagittal (90°) view is presented.

of non-coated ones.<sup>29</sup> To finely map the distribution of the particles in each individual organ, organ specific radioactivity was analysed in dissected organs after animal sacrifice. As shown in Fig. 7, the relative radioactivity to the whole amount injected shows a signal in all the selected organs examined. This basal relative radioactivity may be due to the presence of free technetium and to the blood flow since the measurement has been done as early as 1 h after injection. To distinguish between the radioactivity from free technetium and specific radioactivity from technetium trapped in CPnps, measurements of organ radioactivity after injection of free (TcO<sub>4</sub>)<sup>-</sup> without particles but under the same conditions (quantity and activity) were done. The organ repartition of the measured radioactivity was as follows: liver 4.2%, intestine 1.6%, lungs 2.5%, heart 2.2%, right kidney 2.4% and left kidney 2.4%. Taking these results into account, only two organs show a specific radioactivity signal, *i.e.* liver and lungs. The preferential localization of nanometric particles in the liver was previously reported for other types of particles like gold nanoparticles and coated gold nanoparticles.<sup>26</sup> Cho *et al.* show, for example, for 100 nm diameter cationic gold nanoparticles, the distribution in the liver, spleen and mesenteric lymph nodes as early as 30 minutes post-injection with a reduced elimination phase afterward.<sup>30</sup> We show here that, similarly, reduction in size but also surface charge resulting from the coating markedly modifies the *in vivo* distribution of nanocarriers. More interestingly, in our study, after clodronate treatment known to deplete liver-resident



**Fig. 7** Organ relative radioactivity measured one-hour post-injection. After CT and SPECT imaging, mice were sacrificed and organs were harvested for a direct measurement of radioactivity. Relative radioactivity of each organ to whole body radioactivity is presented in percentage for each nanoparticle formulation (CPnps (black bar); CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> (grey bars); CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> (light grey bars)): in whole bars for untreated mice and dashed bars for clodronate treated mice. Error bars represent the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartile.

Kupffer cells, the liver-specific signal remains strong for CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub>.<sup>31</sup> These data suggest that the detected radioactivity in the liver is due to nanocarrier delivery to hepatocytes rather than phagocytosis by Kupffer cells. In contrast to PEIY formulation, PEIY-Gal formulation is affected by clodronate treatment by a decrease of relative radioactivity from 6 to 4%. As the galactose receptor is expressed by both hepatocyte and Kupffer cells,<sup>32</sup> the decrease in the liver signal in clodronate-treated mice suggests a more pronounced receptor-related endocytosis by Kupffer cells. This is coherent to the fact that, while phagocytosis is the preferred mechanism involved in particle internalization above 200 nm diameter, endocytosis is the preferred one for particles under 100 nm.

## Experimental

### siRNA

siLuc and siCont were purchased from Thermo Scientific Dharmacon. siLuc (CUU ACGCUGAGUACUUCGAdTdT) is a custom made siRNA targeting luciferase GL3 mRNA. siCont, used as a non-targeting control, describes the siGENOME non-targeting siRNA #1 (ref. D-001210-01-05, Dharmacon), designed by the supplier.

### PEIY and PEIY-Gal synthesis

4-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)butanoic acid was synthesized according to a method by J. Haensler and F. Schuber, 1991.<sup>33</sup> PEIY was synthesized according to a method by G. Creusat and G. Zuber, 2008.<sup>17</sup>

Sodium 3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)thio)propanoate (67 mg; 0.23 mmol) and benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP: 137 mg; 0.31 mmol) were dissolved in DMF (5 mL), then added drop by drop to a solution of PEI-Y (30%) (500 mg, 3.9 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA: 670 mL; 3.84 mmol) in DMF (30 mL). After 2 hours under stirring, the solvent was removed by evaporation under vacuum. The residue was dissolved in Milli Q water and the milky solution was subjected to dialysis using a Spectra-Por 12–14 kDa membrane against Milli Q water pH 4 with 3 N HCl (1 L, 5 changes over a 48 h period), then dialysed against Milli Q water (1 L, 5 changes over a 48 h period). The solution was lyophilized to afford the product 250 mg of PEIY(30%)-Gal(10%). By proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR), comparing the integration signal at 6.87 ppm of 2 aromatic protons of tyrosine with that at 4.4 ppm of anomeric protons, the effective degree of modification was found to be 10%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, d): 7.12 (m, 0.66H, 2CH<sub>ar</sub>), 6.9 (m, 0.66H, 2CH<sub>ar</sub>), 4.43 (m, 0.1H, H<sub>1</sub>), 4.06 (m, 0.33H, CH<sub>a</sub>(Tyr)), 3.9–2.2 (m, 5H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, and other protons of sugar synthon).

### Cell culture

A549luc cells (human lung carcinoma; CCL-185; ATCC) transformed to stably express the *Photinus pyralis* luciferase gene

originating from the pGL3 plasmid (pGL3-Basic Vector, Accession number U47295, ref. E1751, Clontech, CA) were grown in RPMI medium (GIBCO, Rockville, MD) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS south American (CE) GIBCO, ref. 11573397, Fisher Scientific), 100 units per mL penicillin, 100 μg mL<sup>-1</sup> streptomycin (penicillin–streptomycin solution GIBCO, ref. 11548876, Fisher Scientific) and 0.8 μg mL<sup>-1</sup> G418 (Geneticin Selective Antibiotic (G418 sulfate) (50 mg mL<sup>-1</sup>), GIBCO, ref. 10131-019, Life Technologies). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

### Preparation of calcium phosphate nanoparticles

CPnps were prepared by a wet chemical process using calcium acetate ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca) (AR Aldrich) and sodium di-hydrogen phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (AR, Aldrich). For the precipitation process, 50 mL of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution at 2 mM, heated at 60 ± 2 °C, were added dropwise, at a rate of 2.5 mL min<sup>-1</sup>, to 60 mL of (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca (2 mM) and the pH was adjusted to 5.15 by adding sodium acetate 5 mM/acetic acid, heated at 60 ± 2 °C under constant stirring. After precipitation the CPnp suspension was cooled down to 4 °C for conservation until use.

### Technetium labelled calcium phosphate nanoparticle precipitation

Radiolabelling of particles was done by incorporation, in a random way, of technetium 99m during the precipitation process. TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> in 0.9% NaCl was added to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution at a concentration of 2 × 10<sup>-6</sup> M.

### siRNA and PEI multilayer coating on nanoparticles

CPnps were coated by alternated depositions of siRNA and PEIY or PEIY-Gal leading to a polyelectrolyte multilayer (siRNA/PEIY)<sub>2</sub> or (siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> at their surface. The CPnp suspension was kept at 4 ± 2 °C during the coating process. Before coating, the pH of the CP nanoparticle suspension was adjusted to 5.15. Under constant stirring, 1.3 μg of siRNA (1 μg μL<sup>-1</sup>) per mL of CPnp suspension (0.02% p/v) was added. CPnps were incubated for 1 h in the presence of siRNA, then 11 μL of PEIY or PEIY-Gal (10 mM N) per 1 mL of suspension was added. CPnps were incubated for 1 h in the presence of PEIY or PEIY-Gal. These steps were repeated 2 times to obtain a typical (siRNA/PEIY)<sub>2</sub> or (siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> coating at the surface of the nanoparticles. After completion of the coating, CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> and CPnp(siRNA/PEIY-Gal)<sub>2</sub> were kept at 4 °C until use.

### DLS and zeta potential measurements

The apparent sizes and surface charges of the coated nanoparticles were determined *via* dynamic light scattering measurements using a NanoZS apparatus (Malvern instruments, Paris, France) with the following specifications: sampling time = 90 s; refractive index of the medium = 1.3402; refractive index of particles = 1.47; medium viscosity = 1.145 cP and temperature = 25 °C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument.

## TEM imaging

10  $\mu\text{L}$  drops of particle suspensions were deposited on carbon-coated Formvar®-covered 100 mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences). After drying, the particles were stained with 2% uranyl acetate (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in 50% ethanol for 10 min and with 4% lead citrate (Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 5 min. Transmission electron microscopy (TEM) was performed with a Philips CM12 instrument (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), provided with a nitrogen-cooled anti-contamination device, operating with an accelerating voltage of 80 kV. Micrographs were acquired with a digital camera between 400 $\times$  and 3400 $\times$  magnification.

## Transfection experiments

24 h prior to the experiment, A549luc cells were seeded in a 24 well plate at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells per well. Nanoparticles (CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub>, CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub>, CPnp(siLuc/PEIY-Gal)<sub>2</sub> and CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub>), previously prepared, were concentrated ten times using an Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal filter (Amicon® Ultra-0.5 mL 50K Ultracel®-50K Membrane, ref. UFC 510096, Millipore) with a cut off of 50 kDa following the supplier instructions for use.

Typically, A549luc cells were transfected with a 100  $\mu\text{L}$  nanoparticle suspension, equipped with 1  $\mu\text{g}$  of siRNA, and added to each well of the cell culture medium containing serum (0.5 mL). 24 h after transfection, 0.5 mL of complete cell culture medium were added to each well. Cells were incubated for an additional 24 h or 48 h before analyzing the luciferase expression.

## Quantification of the luciferase gene expression

The luciferase gene expression was determined with a luciferase assay kit using the manufacturer's instructions (Luciferase assay system, ref. E1501, Promega). Briefly, cells were lysed with PBS, 0.1% Triton X100. The luminescence was measured from 20  $\mu\text{L}$  of lysate with a luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Germany). The luciferase activity was expressed as light units integrated over 10 s (RLU) and normalized per mg of cell protein (DC™ protein assay kit, ref. 500-0111, Biorad).

## In vivo transfection efficacy

A total of  $10 \times 10^7$  A549luc cells were subcutaneously inoculated, respectively, in the right and left hind limbs of 45 8–12 week-old female nude mice (Rj:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>, Janvier, Le genest St Isle, France) for 14 days. Tumour growth was assessed by bioluminescence imaging (BLI) using an Ivis 50 imaging system (Xenogen-Caliper, Perkin-Elmer, Villebon sur Yvette, France). A total of 45 tumours were equally and randomly assigned to saline, CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> nanoparticles or CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> nanoparticles. 40  $\mu\text{L}$  of saline, CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> or CPnp(siLuc/PEIY)<sub>2</sub> nanoparticles, representing 25  $\mu\text{g}$  siRNA, were injected into the tumour of the corresponding mice. Injections were repeated every two days for 14 days. BLI was performed every three days to measure the luciferase expression in tumours:

intraperitoneal injection of 2 mg D-luciferin (Xenogen-Caliper) was performed in mice maintained under general anesthesia with isoflurane and 1 min acquisitions (binning: 4) were repeatedly performed from 10 to 20 min after D-luciferin injection, which was determined in preliminary experiments to be the time frame leading to the maximal light emission. For each tumour, the acquisition time leading to the highest BLI value was retained for analysis. At each time point after initiation of treatment, the value of luciferase activity, expressed as photons per second per cm<sup>2</sup> per square radian ( $\text{p s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$ ), was normalized to the value obtained at day 0 (*i.e.* before initiation of the treatment; relative bioluminescence).

## In vivo biodistribution analysis

A total of 36 healthy mice (BalbC, Janvier, Le genest St Isle, France) (mean, 40 g; range, 35–55 g) were analyzed for the assessment of the biodistribution pattern of 99mTc-CPnps, 99mTc-CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> and 99mTc-CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub>. Mice were divided into two groups: the first group representing untreated mice and the second group representing mice treated with clodronate. Mice treated with clodronate received an intraperitoneal injection of 200  $\mu\text{L}$  of clodrosome suspension (5 mg mL<sup>-1</sup> of clodronate, Encapsula Nanosciences LLC, Nashville, USA) 24 hours before experiment.

On the day of the experiment, each animal received an intravenous injection of 200  $\mu\text{L}$  of 99mTc-CPnp or 99mTc-CPnp(siCont/PEIY)<sub>2</sub> and 99mTc-CPnp(siCont/PEIY-Gal)<sub>2</sub> suspension into the tail vein. For each type of formulation three animals from each group were used.

## In vivo CT/SPECT analysis

In order to recognize different organs, prior to SPECT analysis, a CT image was recorded on the AMISSA platform, a homemade multimodality imaging system for small animals combining X-ray, SPECT and PET devices. The  $\mu\text{CT}$  delivered a 3D reconstructed volume of the animal in real time.<sup>34</sup>

Targeting of 99mTc-labeled nanoparticles was monitored *via* the  $\mu\text{SPECT}$  imaging technique. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 10  $\mu\text{L}$  g<sup>-1</sup> of a solution made with ketamine hydrochloride 10% (Imalgene, Centravet, Velaine en Haye, France) and xylazine 5% (Rompun, Centravet, Velaine en Haye, France) and placed in a prone position in the animal holder after injection into the tail vein.  $\mu\text{SPECT}$  imaging was performed 4 minutes post-intravenous injection of 15 MBq of 99mTc-nanoparticles injected into the tail vein. The  $\mu\text{SPECT}$  system consists of a four head detection gamma camera. Each head comprises five-separated detection modules arranged along a circle of 58 mm with the pinhole as the center. A detection module consists of a YAP:Ce matrix of 8  $\times$  8 scintillating crystals 2.3  $\times$  2.3  $\times$  28 mm<sup>3</sup> each coupled to a multi-anode photomultiplier 8  $\times$  8 (Hamamatsu H 8804). The distance from the pinhole to the axis of rotation is 28 mm and the distance between the pinhole and the crystal is 58 mm which results in a magnification factor of 2.07.<sup>35</sup> Images were reconstructed using the OSEM (Ordered Subset Expectation Maximisation) iterative algorithm adapted for pinhole imaging.

Images were viewed and quantified using the Anatomist free-ware ([http://brainvisa.info/index\\_f.html](http://brainvisa.info/index_f.html)).

### Ex vivo biodistribution analysis

One hour post-injection, after *in vivo* imaging, animals were sacrificed and all major organs (lung, heart, kidneys, spleen, stomach and intestine) and tissues were dissected, weighed and counted using a gamma counting system (IsoMed 2000 Nuclear Medicine techniek Dresden, Germany). The amount of radioactivity in the organs is expressed as the percent of the activity measured in the entire body per gram of organ (%AM). The radioactivity decay was corrected. All work performed on animals was in accordance with INSERM animal care and use recommendations.

## Conclusions

The hybrid nanocarrier developed here presents the great advantage of its size fully compatible with less macrophage-related phagocytosis. Moreover, it demonstrates the potential of the system in terms of specificity of cell targeting. The nanoparticles produced in this study are nano-sized, compatible with capillary fenestration, stable over a period of 6 days and highly efficient in siRNA delivery allowing potent effects *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* distribution showed a preferential localization in the parenchymal liver tissue. Moreover, the versatility of the method with the use of modified PEI could make it of interest for gene therapy of numerous specific cells. Finally these innovative nanoparticles open a realistic and feasible strategy for siRNA delivery into the liver.

## Acknowledgements

We thank Dr Vesna Stanic for technical assistance in TEM imaging and Pr Vincent Ball for fruitful discussions. T.D. and R.S. acknowledge the University of Strasbourg and the Région Alsace, respectively, for funding. T.F.B. acknowledges the grant support of OSEO Fonds de Maturation.

## References

- 1 S. C. J. Loo, T. Moore, B. Banik and F. Alexis, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2010, **11**, 333–342.
- 2 S. V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 715–734.
- 3 D. Chiu, W. Zhou, S. Kitayaporn, D. T. Schwartz, K. Murali-Krishna, T. J. Kavanagh and F. Baneyx, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 610–617.
- 4 W. Jun, L. Lin, C. Yurong and Y. Juming, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2012, **13**, 1–7.
- 5 V. Uskokovic and T. A. Desai, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2013, **101**, 1416–1426.
- 6 G. Salzano, M. Marra, M. Porru, S. Zappavigna, A. Abbruzzese, M. I. La Rotonda, C. Leonetti, M. Caraglia and G. De Rosa, *Int. J. Pharm.*, 2011, **403**, 292–297.
- 7 A. Tabakovic, M. Kester and J. H. Adair, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2012, **4**, 96–112.
- 8 F. Chen, P. Huang, Y.-J. Zhu, J. Wu and D.-X. Cui, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6447–6455.
- 9 K. H. Min, H. J. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, S. Y. Jeong and S. C. Lee, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5788–5797.
- 10 S. R. Rout, B. Behera, T. K. Maiti and S. Mohapatra, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 10777–10783.
- 11 J. Gou, K. Zhang and X. Tang, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2012, **22**, 1367–1375.
- 12 F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama and K. Kataoka, *J. Controlled Release*, 2012, **161**, 868–874.
- 13 Y. Yang, J. Li, F. Liu and L. Huang, *Mol. Ther.*, 2012, **20**, 609–615.
- 14 V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann and M. Epple, *J. Mater. Sci.*, 2010, **45**, 4952–4957.
- 15 J. Hu, A. Kovtun, A. Tomaszewski, B. B. Singer, B. Seitz, M. Epple, K.-P. Steuhl, S. Erguen and T. A. Fuchsluger, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 1156–1163.
- 16 G. Creusat and G. Zuber, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2787–2789.
- 17 G. Creusat and G. Zuber, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2008, 91–92.
- 18 F. Meyer, V. Ball, P. Schaaf, J. C. Voegel and J. Ogier, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 419–422.
- 19 M. Dimitrova, C. Affolter, F. Meyer, I. Nguyen, D. G. Richard, C. Schuster, R. Bartenschlager, J. C. Voegel, J. Ogier and T. F. Baumert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 16320–16325.
- 20 H. W. Kao, C. L. Chen, W. Y. Chang, J. T. Chen, W. J. Lin, R. S. Liu and H. E. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 912–921.
- 21 D. D. Zheng, C. X. Duan, D. R. Zhang, L. J. Jia, G. P. Liu, Y. Liu, F. H. Wang, C. Y. Li, H. J. Guo and Q. Zhang, *Int. J. Pharm.*, 2012, **436**, 379–386.
- 22 V. Stanic, Y. Arntz, D. Richard, C. Affolter, I. Nguyen, C. Crucifix, P. Schultz, C. Baehr, B. Frisch and J. Ogier, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2048–2055.
- 23 A. Bouladjine, A. Al-Kattan, P. Dufour and C. Drouet, *Langmuir*, 2009, **25**, 12256–12265.
- 24 J. B. Bramsen, M. M. Pakula, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, D. Odadzic, R. Smicius, S. L. Wengel, J. Chattopadhyaya, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel and J. Kjems, *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, 5761–5773.
- 25 S. Petri and G. Meister, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **986**, 59–71.
- 26 N. Khlebtsov and L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1647–1671.
- 27 W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips and R. E. Geertsma, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1912–1919.
- 28 S. Hirn, M. Semmler-Behnke, C. Schleh, A. Wenk, J. Lipka, M. Schaffler, S. Takenaka, W. Moller, G. Schmid, U. Simon and W. G. Kreyling, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, **77**, 407–416.
- 29 J. M. Bergen, H. A. von Recum, T. T. Goodman, A. P. Massey and S. H. Pun, *Macromol. Biosci.*, 2006, **6**, 506–516.

- 30 W. S. Cho, M. Cho, J. Jeong, M. Choi, B. S. Han, H. S. Shin, J. Hong, B. H. Chung and M. H. Cho, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **245**, 116–123.
- 31 N. Lanthier, Y. Horsmans and I. A. Leclercq, *Hepatology*, 2010, **51**, 721–722.
- 32 L. Dini, A. Lentini, M. Massimi, P. Mattioli and L. Conti-Devirgiliis, *Liver*, 1993, **13**, 25–30.
- 33 J. Haensler and F. Schuber, *Glycoconjugate J.*, 1991, **8**, 116–124.
- 34 D. Brasse, B. Humbert, C. Mathelin, M. C. Rio and J. L. Guyonnet, *Phys. Med. Biol.*, 2005, **50**, 5799–5811.
- 35 Z. El Bitar, B. Leh, V. Bekaert, D. Huss, D. Brasse and IEEE, in *IEEE Nuclear Science Symposium/Medical Imaging Conference*, IEEE, Dresden, Germany, 2008, pp. 3076–3079.

## II. Preuve de concept : Evaluation de la formulation CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> sur des modèles d'Hépatite C

### Manuscrit en préparation :

Inhibition of HCV infection and replication by delivery of siRNA by hybrid nanoparticles.

**Roxane Saad**, Christine Affolter, Emilie Crouchet, Catherine Schuster, Thomas F Baumert, Florent Meyer\* and Joelle Ogier\*

L'hépatite C est un problème important au niveau mondial, et l'absence de traitements efficaces, ainsi que les effets secondaires des thérapies actuelles (*standard of care*, SOC) limitent fortement les chances de réussir à éradiquer ce virus. Au vu des résultats intéressants obtenus précédemment (cf **Résultats - Partie I**), nous avons décidé de tester l'efficacité des nanoparticules de phosphate de calcium enrobées sur l'infection par le HCV et sa prolifération.

Pour des raisons de dépôt de brevet sur le PEIY, et pour optimiser le vecteur, nous avons utilisé un polymère moins toxique, le PEI-Pyridine (PEIPyr), dont les performances *in vitro* et *in vivo* ont été testées en complexation avec des siRNA<sup>303</sup> : le PEIPyr en complexation avec siLuc permet d'obtenir à 48 h une inhibition d'expression génique au moins quatre fois plus importante *in vitro* que le PEIY (plus de 95 % contre 80 % d'inhibition de l'expression de la luciférase dans des cellules U87egfpluc). De plus, une inhibition de 30 % de l'activité luciférase *in vivo* est obtenue dans des tumeurs sous cutanées U87egfpluc à 4 jours grâce à des complexes PEIPyr/siLuc en comparaison à une complexation PEIPyr/siCTRL pour une quantité de 23,5 µg de siRNA<sup>303</sup>. La toxicité de ce polymère, évaluée par test d'hémolyse et par test MTT, est très inférieure à celle du PEI seul ou du PEIY<sup>303</sup>. Une nouvelle formulation de nanoparticules a été déterminée afin de permettre d'exploiter au mieux les siRNA enrobés. Ces nouvelles nanoparticules ont pour formulation : CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub>, et seront nommées CPnp tout au long de cette partie.

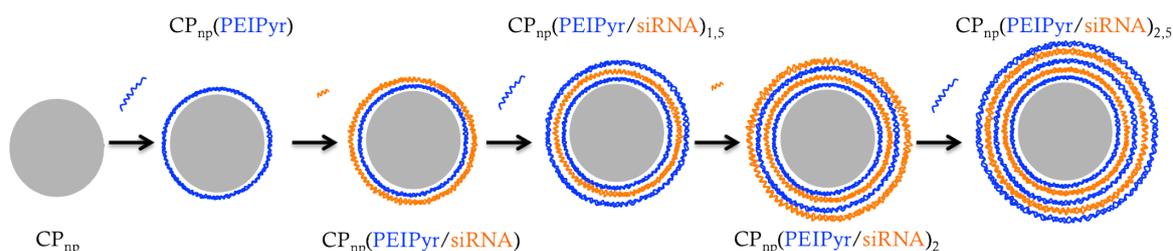
Les travaux présentés ici ont tout d'abord permis de caractériser et de valider les nouvelles CPnp. Nous nous sommes dans un second temps penchés sur le mode d'entrée des CPnp, celui-ci étant particulièrement important à la libération correcte de siRNA efficaces.

Les travaux présentés dans les paragraphes suivants nous ont permis de réaliser la preuve de concept de ces CPnp, montrant leur efficacité sur le HCV, tout d'abord en ciblant le virus directement, puis en ciblant les facteurs hôtes. En effet, l'utilisation de nanoparticules associées aux siRNA nous permet de choisir différentes cibles, virales et issues de l'hôte, en fonction de la sélection des siRNA, diminuant ainsi la résistance virale, et permettant une approche pan-génotypique<sup>319</sup>. Nous nous intéresserons ici principalement à deux molécules indispensables à l'entrée du HCV dans les hépatocytes : CD81 et CLDN1.

## 1. Construction et caractérisation des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub>

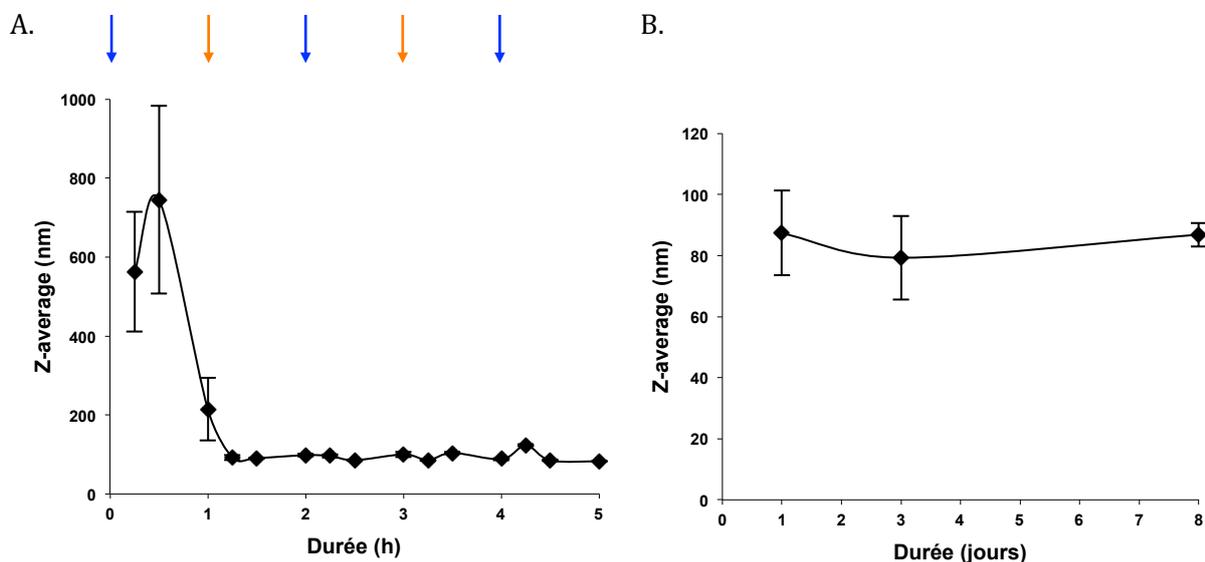
Comme les CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> présentées en première partie, les CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> sont produites en deux étapes :

- ❖ Production du cœur de phosphate de calcium par mise en présence, sous agitation, et à  $60 \pm 2$  °C de dihydrogénophosphate de sodium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et d'acétate de calcium [(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca].
- ❖ Enrobage alternatif par le PEIPyr et les siRNA.



**Illustration II-1 : Représentation schématique de la production et enrobage des CPnp.**

L'évolution du rayon hydrodynamique de la particule pendant l'assemblage montre qu'au bout d'une heure d'enrobage avec le PEIPyr, la taille des particules chute à  $214,5 \pm 79,3$  nm, et qu'après l'ajout des siRNA dans la solution, les particules atteignent une taille de  $83,0 \pm 1,0$  nm, qui est conservée au cours des heures suivantes (Figure II-1A).



**Figure II-1 : Mesures du diamètre moyen (Z-average) des CPnp par DLS au cours de l'enrobage (A.), et au cours des 8 jours suivants (B.). A. Le PEIPyr et les siRNA sont ajoutés à la solution de phosphate de calcium toutes les heures (représentés par les flèches bleues et oranges, respectivement).**

Ce phénomène est vraisemblablement lié à la polydispersité des particules observée suite au premier dépôt de PEIPyr, le dépôt suivant de siRNA permettant une complexation des charges complémentaires PEIPyr/siRNA. Des mesures de DLS réalisées ultérieurement, à 1, 3 et

8 jours après enrobage montrent que la taille (Figure II-1B), est stable dans l'eau à 4 °C tout au long de cette période.

L'utilisation de microscopie électronique à transmission (TEM) a permis de confirmer ces données. Les CPnp montrent une forme sphérique, d'une taille de 80 nm à 24 h après enrobage (Figure II-2).

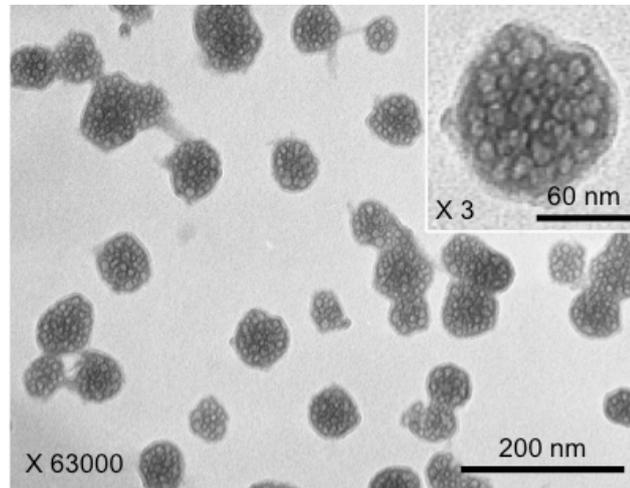


Figure II-2 : CPnp observées en TEM 24 h après enrobage et coloration à l'acétate d'uranyle (Grossissement : 63000 x).

Afin de nous assurer de la stabilité des CPnp, dans l'eau, mais surtout dans le sérum, une expérience d'électromobilité en gel d'agarose a été réalisée. Celle-ci a permis de vérifier l'absence de dissociation des siRNA des CPnp dans les deux milieux, grâce à une comparaison avec le comportement de siRNA libres déposés dans le gel (Figure II-3).

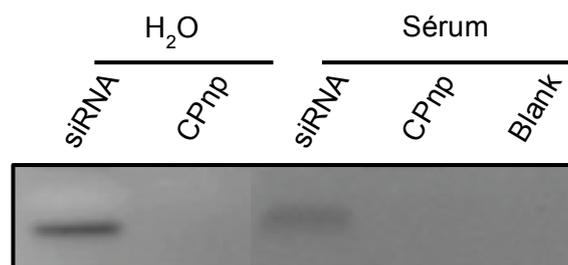
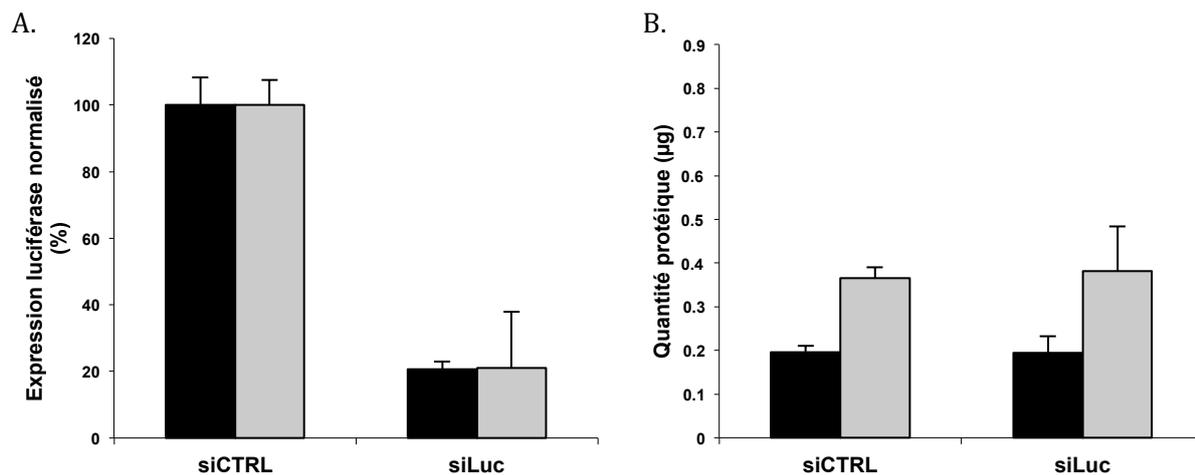


Figure II-3 : Electromobilité en gel d'agarose (EMSA) des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2.5</sub> dans l'eau ou dans du sérum en comparaison avec des siRNA libres. Les CPnp ou les siRNA sont incubés dans de l'eau ou du sérum, et soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 % pendant 1 h à 77 V. Après marquage des acides nucléiques au BET, les gels sont observés sous lampe UV.

Partant du principe que l'utilisation de plusieurs couches de siRNA va dans le sens d'une libération progressive, et sur la base de résultats préliminaires, deux types de constructions ont été testés *in vitro* sur un modèle cellulaire A549Luc : CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2.5</sub> et CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>3</sub>.



**Figure II-4 : Détermination de la formulation optimale des CPnp. A. Evaluation de l'inhibition de l'expression de la luciférase par transfection des CPnp(PEIPyr/siLuc)<sub>2.5</sub> ou CPnp(PEIPyr/siLuc)<sub>3</sub> dans des cellules A549Luc à trois jours. Représentation du pourcentage d'expression luciférase normalisé par la condition contrôle (CPnp avec siCTRL). B. Evaluation de la cytotoxicité des CPnp sur les cellules A549Luc à trois jours par la quantité protéique, associée au nombre de cellules. En noir : 3 couches de siRNA. En gris : 2 couches de siRNA.**

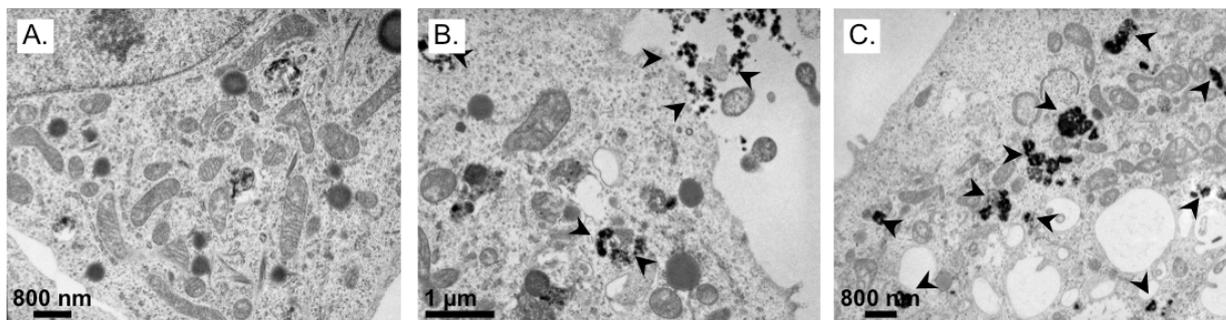
Comme le montrent les résultats ci-dessus, à trois jours, l'enrobage des CPnp par deux ou trois couches de siRNA n'engendre pas de variation significative de l'inhibition de l'expression de la luciférase (Figure II-4A). Cependant, pour le siRNA dirigé contre la luciférase comme pour le siRNA contrôle, l'ajout d'une troisième couche de siRNA entraîne une augmentation importante de la cytotoxicité cellulaire des CPnp (Figure II-4B), probablement associée à l'effet *off-target* de l'accumulation trop importante d'un siRNA donné dans les cellules. Au vu de ces résultats, la formulation retenue, et utilisée dans le reste de ce manuscrit est CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2.5</sub>.

## 2. Entrée cellulaire, et libération des siRNA

S'il est important de connaître la stabilité des nanoparticules dans l'eau et dans le sérum, il est également indispensable de savoir par quelle voie d'entrée cellulaire celles-ci pénètrent dans les cellules, ainsi que la durée de leur présence et de la libération des siRNA. En effet, ces informations sont nécessaires et cruciales pour la détermination des conditions d'utilisation thérapeutique des CPnp, ainsi que pour démontrer l'intérêt potentiel de ce vecteur.

Pour accéder à ces données, nous avons dans un premier temps observé l'entrée des CPnp dans les cellules par microscopie électronique. Pour cela, des images ont été réalisées en TEM avant le dépôt des nanoparticules sur les cellules Huh7, puis à 24 h et 4 jours après la transfection. Comme le montrent ces images, à 24 h, les particules sont visibles à la fois à proximité de la membrane cellulaire, ainsi que dans des vésicules en périphérie cellulaire (Figure II-5B).

Quatre jours après la transfection, il n'y a plus de particules libres visibles en dehors des cellules. Dans celles-ci, les particules ne sont plus situées dans des vésicules, mais semblent avoir été libérées dans le cytoplasme (Figure II-5C). Ces données sont en adéquation avec l'hypothèse de l'entrée des CPnp par endocytose, celles-ci mesurant moins de 100 nm<sup>70,71</sup>.



**Figure II-5 : Observation de cellules Huh7 en TEM. Les images ont été réalisées avant transfection (A.), à 24 h (B.) et à 4 jours (C.) post-transfection suite à une coloration négative à l'acétate d'uranyle.**

Pour corroborer ces données de microscopie électronique, l'imagerie confocale a été employée afin d'observer si les CPnp sont localisées au niveau des endosomes. Pour cela, un fluorophore, l'alizarine complexeone, a été incorporé lors de la synthèse du cœur de phosphate de calcium. La mesure de la taille par DLS a permis de montrer que cette incorporation ne modifie pas la taille des nanoparticules.

A 24 h après transfection, une colocalisation partielle peut être constatée entre les CPnp et les endosomes précoces, confirmant notre hypothèse précédente, et l'entrée des CPnp par endocytose (Figure II-6).

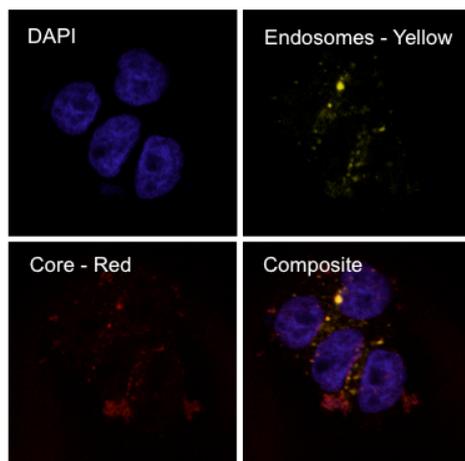


Figure II-6 : Observation de la colocalisation des CPnp avec les endosomes précoces dans les cellules Huh7 à 24 h. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI, tandis que les endosomes ont été marqués grâce un anticorps dirigé contre la protéine EEA1, spécifique des endosomes précoces (Endosomes - Yellow). Les CPnp sont marquées en rouge grâce à l'incorporation d'alizarine complexone (Core - Red). L'image composite correspond à la superposition des trois précédentes.

Les expériences précédentes nous prouvent que le cœur de phosphate de calcium est bien situé dans la cellule, entré par endocytose. Pour vérifier que l'enrobage des CPnp est présent, des images de microscopie confocale ont été réalisées, le marquage du cœur de phosphate de calcium des nanoparticules à l'alizarine complexone étant conservé et associé à un enrobage par des siRNA fluorescents.

Après 3 jours de transfection, une colocalisation des siRNA avec le cœur des nanoparticules est observée. Celle-ci est toujours visible à 7 jours, laissant supposer que les CPnp présentent encore des siRNA pouvant être libérés et affecter l'expression de leur gène cible (Figure II-7).

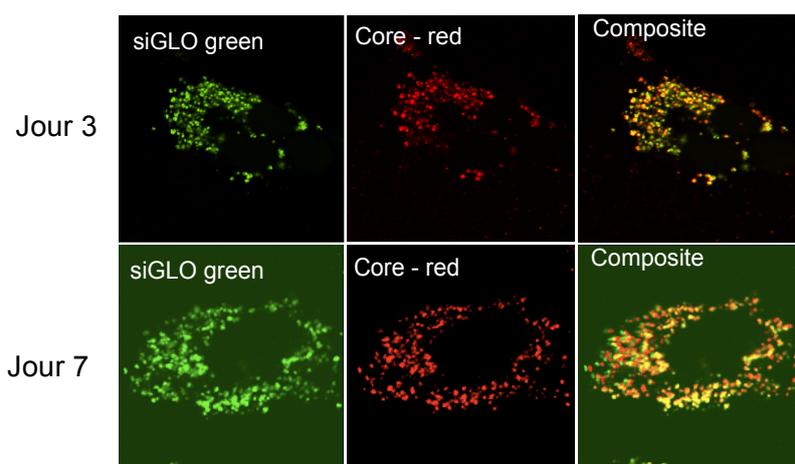


Figure II-7 : Imagerie confocale des cellules Huh7 après 3 jours (panneaux du haut) et 7 jours (panneaux du bas) de transfection avec les CPnp marquées par la présence de siRNA fluorescents (siGLO green), et d'alizarine complexone dans le cœur de phosphate de calcium (Core - red). Les images composites correspondent à la superposition des deux images précédentes.

Pour confirmer ces données intéressantes, nous avons employé une technique utilisée depuis peu dans le domaine de l'ARN interférence : la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)<sup>320</sup>. Pour cela, un primer ciblant le siRNA dirigé contre la luciférase a été généré et utilisé. Les résultats obtenus montrent une libération progressive des siRNA dans les cellules, et ce de manière dose-dépendante. Cette expérience nous confirme que la libération de siRNA dure au minimum 7 jours (Figure II-8), ce qui pourrait prolonger la rémanence de l'interférence, notamment *in vivo*, augmentant significativement la durée de vie des siRNA, qui pour des siRNA libres, varie de quelques minutes à une heure<sup>15</sup>.

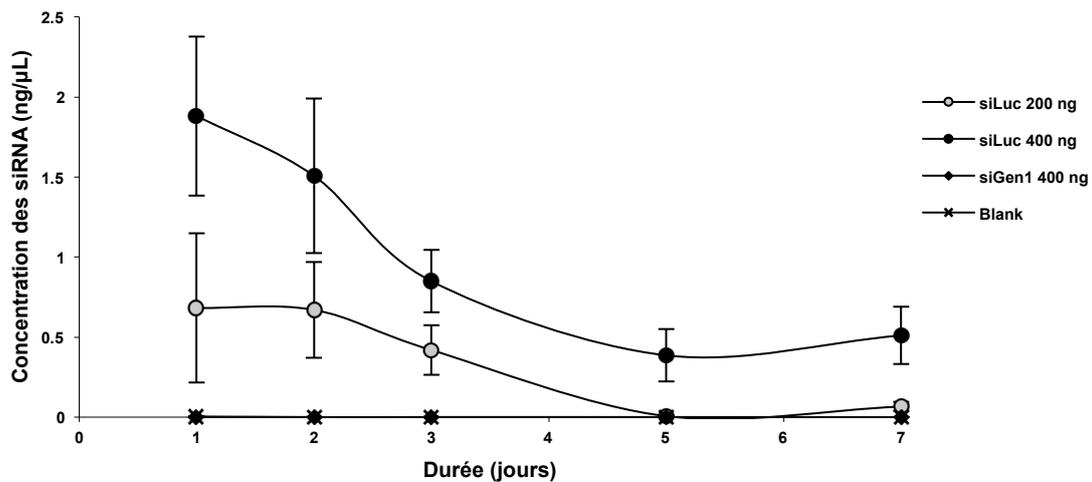


Figure II-8 : Observation de présence de siRNA dans les PHH après 72 h de transfection avec les CPnp à la dose 1 (équivalente à 400 ng de siRNA, siLuc ou siGen1) et à la dose ½ (équivalente à 200 ng de siLuc) par qRT-PCR. Les primers utilisés sont dirigés contre le siLuc, tandis que le siGen1 sert de contrôle négatif.

D'autre part, pour des raisons pratiques, des hépatocytes primaires humains (PHH) ont été utilisés pour cette expérience. En effet, ces cellules provenant de chirurgies hépatiques ne se divisent pas, permettant ainsi de conserver un nombre stable de cellules, et donc un ratio particules/cellules constant lors de l'expérience. Cette expérience a également permis de montrer que, malgré la réputation de mauvaise transfectabilité de ces cellules primaires, le vecteur que nous avons choisi, est capable d'y pénétrer. Ces résultats sont très encourageants quant à l'utilisation des CPnp *in vivo* dans le foie.

### 3. Toxicité des CPnp

Outre les caractéristiques physico-chimiques, et la capacité à entrer dans les cellules et à libérer les siRNA, un autre paramètre indispensable est à prendre en compte pour déterminer le potentiel d'un vecteur : la toxicité. En effet, l'utilisation d'un vecteur très efficace, mais cytotoxique n'a qu'un intérêt très limité.

Afin de déterminer la toxicité des CPnp, nous avons employé différents tests, Alamar blue, cristal violet, et MTT, donnant tous des résultats similaires, présentés ici à partir des données de tests MTT (Figure II-9).

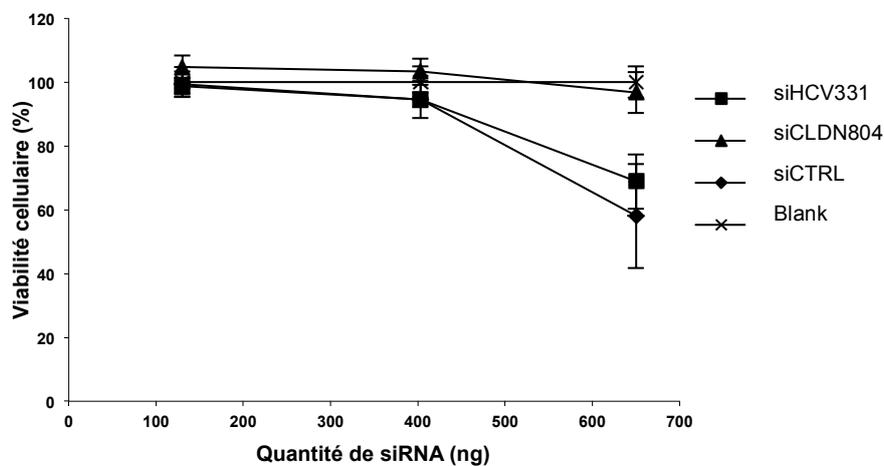


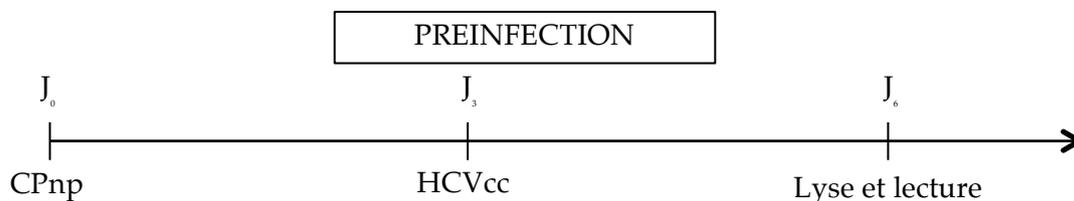
Figure II-9: Toxicité des CPnp enrobées avec différents siRNA en fonction de la dose utilisée (dose 1, équivalente à 400 ng de siRNA, dose 1/3, équivalente à 130 ng de siRNA ; dose 1,5 équivalente à 650 ng de siRNA), mesurée par test MTT. Blank : cellules seules ; siCTRL : siRNA non-ciblante ; siHCV331 : siRNA ciblant l'IRES du HCV ; siCLDN804 : siRNA ciblant la CLDN1.

Les résultats obtenus ne montrent pas de toxicité pour la dose employée dans la majorité des expériences (400 ng). De manière intéressante, il existe à la dose supérieure (650 ng) une toxicité associée à certains siRNA. De ce fait, celle-ci est probablement liée directement au siRNA, plutôt qu'aux CPnp en elles-mêmes. Ces résultats étant rassurants concernant les propriétés biologiques des CPnp, nous nous sommes ensuite intéressés à l'efficacité de ces nanoparticules.

#### 4. Inhibition de l'infection par le HCV par les CPnp : Preuve de concept

Ayant déjà démontré le potentiel de l'utilisation de l'ARN interférence pour cibler le HCV<sup>302</sup>, nous avons choisi d'utiliser le même exemple afin de réaliser la preuve de concept de l'efficacité des CPnp. Nous avons choisi en première approche l'utilisation d'un siRNA dont l'efficacité est connue, ciblant directement le virus, au niveau de l'IRES, zone indispensable à l'initiation de la réplication du génome viral, et de ce fait, peu susceptible de subir des mutations, le siHCV331<sup>280</sup>.

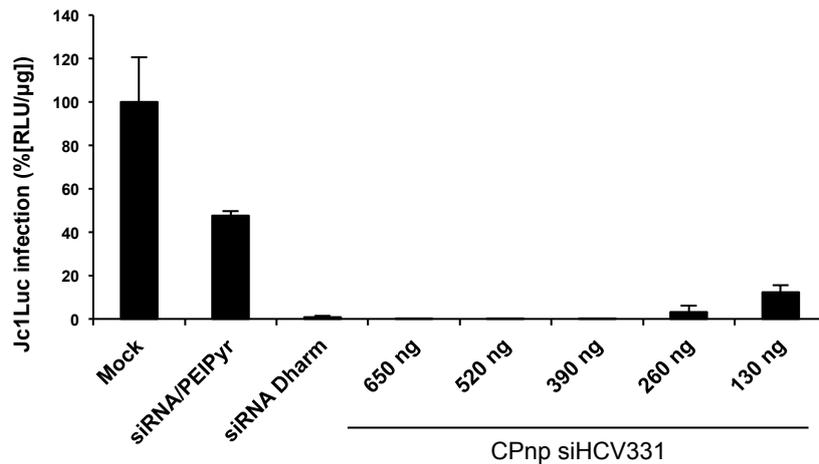
Nous avons décliné l'expérience selon deux protocoles, utilisant dans les deux cas les particules virales dérivées de la culture cellulaire (HCVcc Jc1Luc), celles-ci étant les plus proches du vrai virus, et les seules actuellement engendrant un cycle viral complet. Les particules virales Jc1Luc présentent également l'avantage de comprendre le gène de la luciférase dans leur génome, permettant un suivi aisé de la progression de l'infection par bioluminescence. Le premier protocole choisi, dit de pré-infection, correspond à un traitement préventif (Illustration II-1). En effet, les cellules utilisées, ici, les cellules Huh751, sont transfectées trois jours avant l'infection virale, permettant le déploiement du mécanisme de défense potentiel avant la propagation de l'infection. L'analyse de l'impact sur l'infection est réalisée trois jours après l'infection grâce à l'expression de la luciférase par le virus.



**Illustration II-1 : Représentation schématique du modèle de pré-infection.**

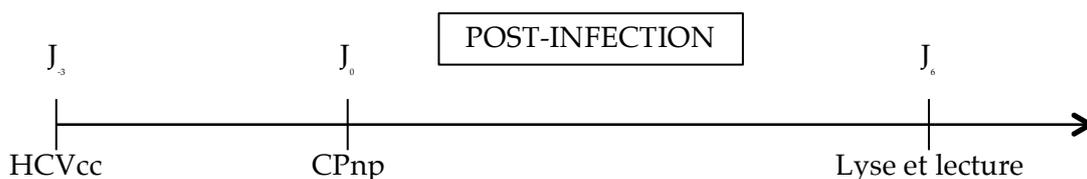
Les cellules, mises en culture à J<sub>-1</sub>, sont transfectées avec les CPnp à J<sub>0</sub>, puis infectées avec le virus sous forme de HCVcc Jc1Luc J<sub>3</sub>. L'analyse de l'expérience est réalisée à J<sub>6</sub>.

Les CPnp siHCV331 entraînent une inhibition de l'infection par Jc1Luc, permettant de diminuer celle-ci de jusqu'à  $99,95 \pm 0,01$  % par rapport à la condition d'infection sans CPnp (Figure II-10). Cette inhibition est dose-dépendante à basse concentration, puis semble atteindre un seuil. Pour des doses identiques, cette méthode est plus efficace que l'utilisation de complexes siRNA/PEIPyr, ne permettant que  $52,5 \pm 2,1$  % d'inhibition, et que le système commercial (DharmaFECT®), obtenant une inhibition de  $99,2 \pm 0,7$  %.



**Figure II-10 : Modèle « pré-infection » : Inhibition de l’infection de cellules Huh751 par le virus Jc1Luc sous forme de HCVcc par les CPnp siHCV331 à différentes doses (équivalentes à 650, 520, 390, 260, et 130 ng de siRNA). Les valeurs de luciférase sont normalisées par la quantité protéique (100 % : infection virale sans ajout de CPnp [Mock]). siRNA/PEIPyr : transfection de complexes siHCV331/PEIPyr à une dose équivalente au maximum de CPnp. siRNA Dharm : transfection de siHCV331 à l’aide du système commercial DharmaFECT® (Thermo Scientific) à une dose équivalente à la dose maximale de CPnp.**

Si ces résultats sont excellents, ils sont cependant relativement éloignés de la réalité de la pathologie. En effet, la possibilité d’un traitement préventif pour le HCV, mais non vaccinal, pour cette pathologie, est utopique, puisqu’il serait très coûteux et compliqué à mettre en place de manière généralisée et à long terme au sein des populations à risque, et qu’il est difficile, voire impossible de prévoir l’infection par avance. C’est pourquoi nous nous sommes également intéressés à un second modèle, dit de post-infection (Illustration II-2). Dans ce nouveau modèle, la transfection des nanoparticules est réalisée trois jours après l’infection virale, permettant la mise en place d’une infection dite chronique. L’analyse est ensuite réalisée – comme pour le modèle de pré-infection – six jours après l’ajout des CPnp, afin de permettre une comparaison entre les deux modèles.

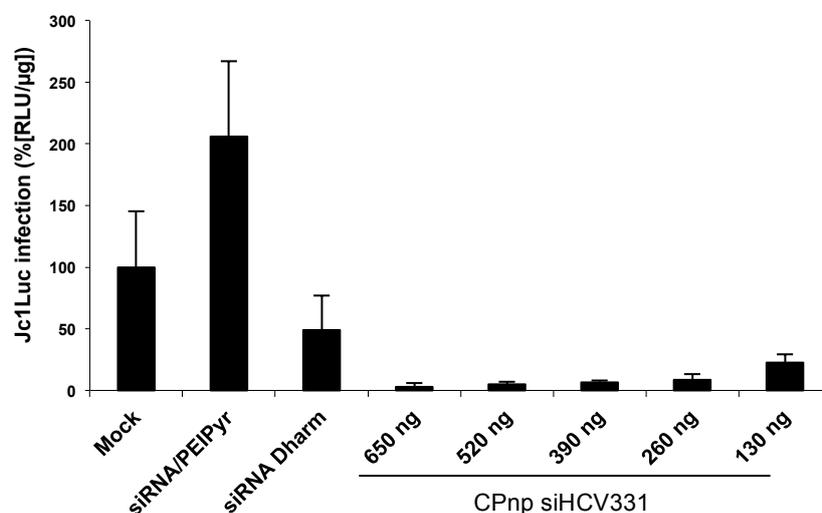


**Illustration II-2 : Représentation schématique du modèle de post-infection. Les cellules, mises en culture à  $J_{-4}$ , sont infectées avec le virus sous forme de HCVcc Jc1Luc à  $J_{-3}$ , puis transfectées avec les CPnp à  $J_0$ . L’analyse de l’expérience est réalisée à  $J_6$ .**

L’ajout des CPnp siHCV331 entraîne une inhibition de l’infection virale par les particules HCVcc Jc1Luc allant jusqu’à  $96,9 \pm 2,9$  % par rapport à la condition d’infection seule (Figure II-11). De même que précédemment, cette inhibition est dose-dépendante, mais n’atteint cette fois pas de palier, suggérant la possibilité d’augmenter encore la dose de CPnp transfectée.

Ces résultats légèrement inférieurs aux précédents, ainsi que la dose-dépendance sans pallier peuvent s'expliquer, entre autres, par le modèle en lui-même. En effet, les cellules étant infectées trois jours avant l'ajout des CPnp, la concentration cellulaire dans les puits est environ 8 fois plus importante que dans le modèle de pré-infection, réduisant d'autant la quantité de CPnp par cellule. De plus, il est probablement plus difficile d'enrayer une infection déjà installée, entraînant la présence d'un grand nombre de particules virales, que d'étouffer dans l'œuf une infection naissante.

Les résultats obtenus sont malgré tout largement meilleurs que lors de l'utilisation du système commercial ( $51,0 \pm 27,9$  % d'inhibition), ou des complexes siHCV331/PEIPyr, qui n'ont ici aucun effet sur l'infection.



**Figure II-11 : Modèle « post-infection » : Inhibition de l'infection de cellules Huh751 par le virus Jc1Luc sous forme de HCVcc par les CPnp siHCV331 à différentes doses (équivalentes à 650, 520, 390, 260, et 130 ng de siRNA). Les valeurs de luciférase sont normalisées par la quantité protéique (100 % : infection virale sans ajout de CPnp [Mock]). siRNA/PEIPyr : transfection de complexes siHCV331/PEIPyr à une dose équivalente au maximum de CPnp. siRNA Dharm : transfection de siHCV331 à l'aide du système commercial DharmaFECT® (Thermo Scientific) à une dose équivalente à la dose maximale de CPnp.**

Si ces résultats sont excellents, ils ne permettent cependant pas une suppression totale de l'infection virale. Pour tenter de se rapprocher de ce but, et en tirant parti de l'implication de divers facteurs hôte dans le cycle viral du HCV, nous avons choisi dans un second temps de nous intéresser à l'inhibition de deux récepteurs humains indispensables à l'entrée cellulaire du HCV, CD81 et CLDN1<sup>218,225</sup>.

## 5. Inhibition de l'expression protéique de facteurs hôtes et de l'infection virale associée

### CD81

CD81 est un facteur indispensable à l'entrée du HCV dans les hépatocytes. Nous avons donc choisi cette protéine pour tester l'impact direct des CPnp sur l'expression protéique. Pour cela, nous avons cultivé des cellules Huh751 en présence de CPnp enrobées avec un siRNA ciblant CD81 pendant 9 jours, et avons observé l'expression cellulaire de CD81 par cytométrie en flux (Figure II-12).

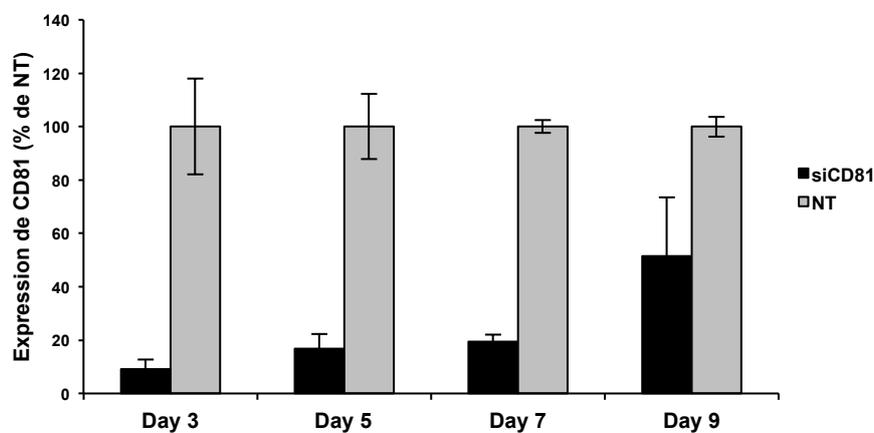


Figure II-12 : Expression de CD81 dans des cellules Huh751 non transfectées ou en présence de CPnp siCD81 équivalent à 400 ng de siRNA (dose 1), suivie par cytométrie en flux, à 3, 5, 7, et 9 jours après transfection. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de cellules non transfectées (NT).

Nous pouvons observer un effet direct de la transfection cellulaire par les CPnp siCD81 sur l'expression protéique. En effet, l'expression de CD81 diminue de  $90,8 \pm 3,6$  % à trois jours, de  $83,2 \pm 5,4$  % à 5 jours, de  $80,7 \pm 2,6$  % à 7 jours, et de  $48,4 \pm 21,8$  % à 9 jours (Figure II-12).

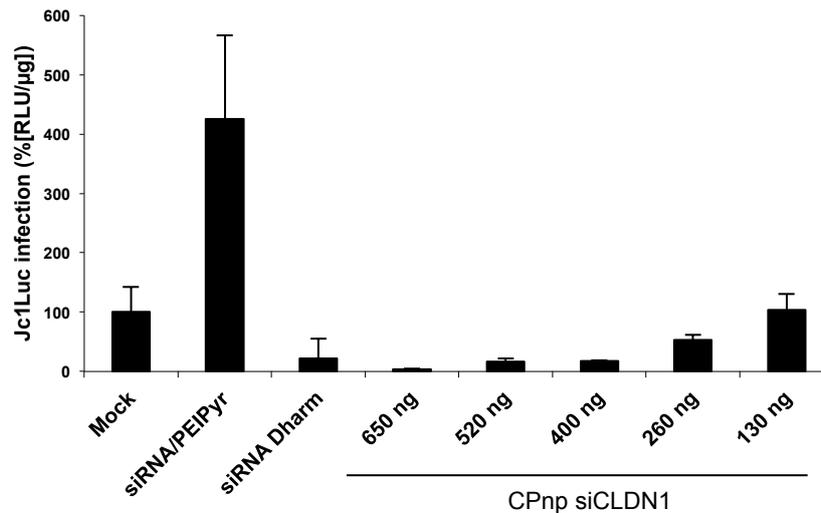
Ces résultats sont cohérents avec la libération de siRNA dans la cellule jusqu'à au moins 7 jours. Différents facteurs peuvent expliquer la présence résiduelle de CD81, comme par exemple la durée de vie de la protéine, ou encore sa forte expression dans les hépatocytes, nécessitant l'utilisation d'une dose supérieure à la dose actuelle de 400 ng, ou le co-ciblage d'un autre facteur.

### Claudin-1 (CLDN1)

Nous nous sommes intéressés à un autre facteur hôte indispensable au cycle du HCV, CLDN1. Ayant constaté que les CPnp permettaient à la fois l'inhibition de l'infection virale en ciblant le virus, et l'inhibition de l'expression d'un facteur hôte, comme CD81, nous avons choisi

d'analyser l'impact de l'inhibition de CLDN1 par les CPnp dans les deux modèles d'infection décrits précédemment.

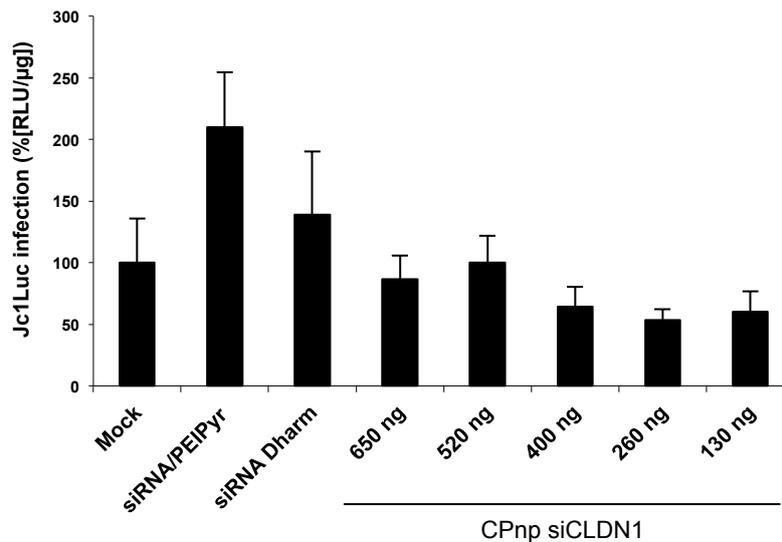
Ainsi, en pré-infection (cf Illustration II-1), l'infection par HCVcc est inhibée par les CPnp siCLDN1 de manière dose-dépendante jusqu'à  $96,3 \pm 1,3$  % en comparaison avec la condition d'infection sans CPnp (Mock) (Figure II-13). Cette inhibition, à une dose équivalente, est plus efficace que la méthode commerciale, permettant une inhibition de l'infection de  $77,8 \pm 32,7$  %. La complexation siCLDN1/PEIPyr, quant à elle, n'inhibe pas l'infection par les HCVcc Jc1Luc.



**Figure II-13 : Modèle « pré-infection » : Inhibition de l'infection de cellules Huh751 par le virus Jc1Luc sous forme de HCVcc par les CPnp siCLDN1 à différentes doses (équivalentes à 650, 520, 390, 260, et 130 ng de siRNA). Les valeurs de luciférase sont normalisées par la quantité protéique (100 % : infection virale sans ajout de CPnp [Mock]). siRNA/PEIPyr : transfection de complexes siCLDN1/PEIPyr à une dose équivalente au maximum de CPnp. siRNA Dharm : transfection de siCLDN1 à l'aide du système commercial DharmaFECT® (Thermo Scientific) à une dose équivalente à la dose maximale de CPnp.**

Dans le modèle de post-infection, les CPnp siCLDN1 génèrent une inhibition de l'infection par les HCVcc Jc1Luc allant jusqu'à  $46,8 \pm 8,8$  % en comparaison avec la condition contrôle en infection seule (Mock) (Figure II-14). Les méthodes commerciales ou par complexation siCLDN1/PEIPyr, quant à elles, n'ont pas d'effet sur l'infection dans ces conditions.

L'inhibition de l'infection par les CPnp siCLDN1 est toutefois bien inférieure en post-infection qu'en pré-infection, et ne présente pas d'effet dose-réponse marqué. Ceci peut cependant notamment être expliqué, outre l'augmentation du nombre de cellules et l'infection virale installée, par le fait que CLDN1 joue principalement son rôle de facteur d'entrée du virus lors de la primo-infection des cellules.



**Figure II-14 : Modèle « post-infection » : Inhibition de l'infection de cellules Huh751 par le virus Jc1Luc sous forme de HCVcc par les CPnp siCLDN1 à différentes doses (équivalentes à 650, 520, 400, 260, et 130 ng de siRNA). Les valeurs de luciférase sont normalisées par la quantité protéique (100 % : infection virale sans ajout de CPnp [Mock]). siRNA/PEIPyr : transfection de complexes siCLDN1/PEIPyr à une dose équivalente au maximum de CPnp. siRNA Dharm : transfection de siCLDN1 à l'aide du système commercial DharmaFECT® (Thermo Scientific) à une dose équivalente à la dose maximale de CPnp.**

En effet, CLDN1 n'est pas impliqué dans la prolifération de l'infection, ni dans la production et l'export des virions. Pour tester son impact en post-infection, il faudrait tester la capacité des nouveaux virions à infecter des cellules saines en présence des CPnp siCLDN1, en transférant par exemple le surnageant de culture des cellules infectées sur des cellules saines.

Ces résultats intéressants montrent que le ciblage de facteurs hôtes est prometteur, et complémentaire, voire supérieur au ciblage direct du virus. En effet, contrairement aux facteurs hôtes, peu variables, le génome viral est soumis à un grand nombre de mutations, lui permettant d'échapper aux traitements<sup>319</sup>. Cependant, pour en améliorer encore l'efficacité, il pourrait être intéressant de les utiliser de manière combinée, soit sur deux populations de CPnp transfectées de manière conjointe, soit en mélangeant les siRNA dès l'enrobage des CPnp. L'utilisation de ces deux facteurs hôtes, mais également éventuellement de siRNA ciblant d'autres facteurs d'entrée du HCV, comme OCLN ou SR-BI, pourrait ainsi mettre en évidence un effet synergique des plus intéressants.

### III. Preuve de concept : CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> et modèles tumoraux

Nous avons démontré précédemment l'intérêt potentiel des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> dans le cadre de l'infection par le HCV, ces particules permettant de diminuer l'infection virale en ciblant le génome viral et certains facteurs hôtes. D'autres pathologies, notamment les cancers, peuvent également tirer profit du développement d'une thérapie utilisant des siRNA. Sachant que l'utilisation des siRNA est limitée par leur sensibilité à la dégradation enzymatique dans le sang ainsi que par leur difficulté à passer les barrières biologiques (phagocytose, échappement endosomal) (cf Limites et défi des siRNA thérapeutiques p.18), l'emploi de vecteurs nanoparticulaires devrait permettre d'améliorer l'efficacité d'action des siRNA. De plus, les possibilités de fonctionnaliser les particules, pourraient également faciliter la pénétration des siRNA dans les tissus, et la « délivrance » sur les sites ciblés.

Nous nous sommes intéressés ici à l'évaluation de la formulation CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> dans le cadre du développement d'une stratégie thérapeutique dirigée contre le carcinome hépatocellulaire (HCC). Les cancers sont dus à la dérégulation de certains gènes, la plupart du temps impliqués dans des voies métaboliques importantes. Ces gènes, nommés oncogènes, vont alors inhiber l'apoptose, ou favoriser la division cellulaire, aboutissant au développement d'une tumeur. C'est le cas par exemple pour KRas, ou encore EGFR<sup>321,322</sup>.

Ces gènes, une fois identifiés, offrent des cibles thérapeutiques idéales, leur inhibition permettant de remédier à la croissance incontrôlable des cellules tumorales. Plusieurs inhibiteurs d'EGFR sont ainsi en cours d'étude clinique<sup>322</sup>. Gefitinib, par exemple, est actuellement en phase II d'essai clinique sur les métastases cervicales suite à un adénocarcinome pulmonaire présentant une mutation d'EGFR, et permet d'obtenir à la fois un arrêt de la progression des tumeurs et une augmentation du taux de survie avec un taux de réponse au traitement de 87,8 %<sup>323</sup>.

Pour valider la possibilité d'utiliser ces nanoparticules comme agents anticancéreux, nous avons dans un premier temps évalué les limites d'interférence ARN de celles-ci en ciblant un gène rapporteur. En effet, lors de l'étude de l'impact des CPnp sur l'expression de CD81 dans les cellules Huh751, il ne nous a pas été possible de dépasser une inhibition de  $90,8 \pm 3,6$  % à 3 jours pour des raisons de toxicité (cf Inhibition de l'expression protéique de facteurs hôtes et de l'infection virale associée p.116). Afin d'évaluer la possibilité d'obtenir une inhibition de 100% en respectant le seuil de toxicité de l'agent thérapeutique, nous avons choisi d'étudier l'efficacité

des CPnp face à des niveaux d'expression variable de luciférase, en utilisant un modèle de cellules transfectées de manière transitoire.

La seconde étape de l'évaluation des CPnp en tant qu'agents anticancéreux a été de valider leurs capacités à inhiber la croissance cellulaire, point central du développement de cancers, en ciblant un certain nombre d'oncogènes fréquemment impliqués dans différents cancers. Pour cela, une première étude a été réalisée *in vitro*.

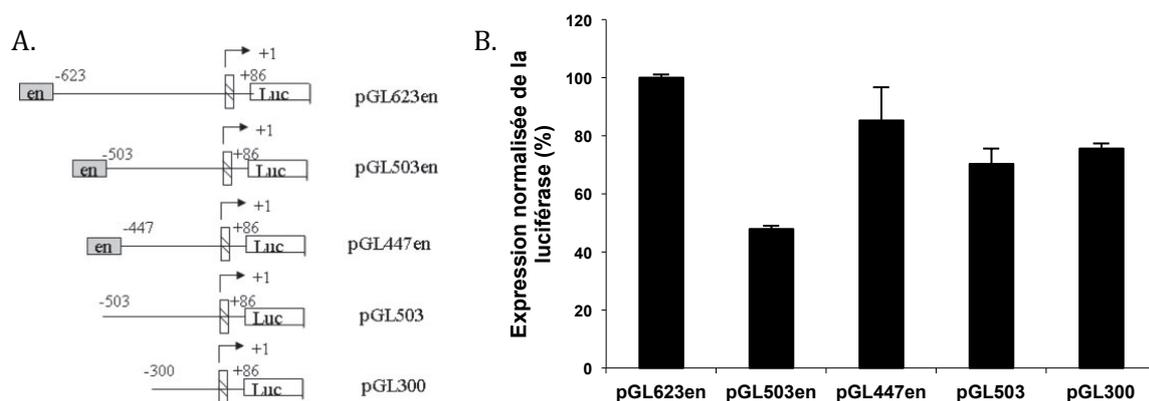
La culture cellulaire *in vitro* ne décrit que partiellement la physiologie et physiopathologie cellulaire, cette différence ayant été dénoncée plusieurs fois dans la littérature<sup>288,324,325</sup>. Le modèle des sphéroïdes, permettant la culture cellulaire *in vitro* en 3D, permet une meilleure corrélation avec les modèles *in vivo*. Ohmori *et al.* ont ainsi observé des différences d'efficacité du cysplatine sur les cellules cultivées en 2D ou en 3D, tandis que les résultats obtenus *in vivo* sont en corrélation avec ceux obtenus dans le modèle 3D<sup>326</sup>. C'est pourquoi, en nous basant sur la littérature, nous avons choisi d'employer ce modèle, devant permettre une meilleure corrélation avec les modèles *in vivo*.

En parallèle de l'étude de l'efficacité des CPnp sur ces différents modèles *in vitro*, nous avons également débuté les expériences *in vivo*, en nous intéressant à deux modes d'injections des CPnp : intratumoral direct, pour étudier la rémanence des particules, ou injection systémique, pour étudier la biodistribution de celles-ci. Ces deux modes d'injection sont envisageables pour le HCC, tout comme la chimio-embolisation, cette dernière technique n'étant cependant pas réalisable sur des modèles animaux de la taille de la souris.

## 1. CPnp et expression génique *in vitro* en culture cellulaire bidimensionnelle

Grâce à l'étude de l'expression de CD81, nous avons constaté que l'utilisation des CPnp permettait de diminuer l'expression d'une protéine intrinsèque jusqu'à  $91,8 \pm 3,6$  % à trois jours *in vitro*. Ces résultats laissent supposer qu'il existe une limite à la « délivrance » des siRNA, empêchant d'obtenir une inhibition de CD81 de 100 %. Pour mieux cerner cette limite, nous avons développé un modèle d'expression variable par transfection transitoire d'un plasmide, permettant à la fois d'obtenir une expression très importante et stable d'un gène rapporteur, la luciférase, mais également de moduler cette dernière par l'ajout de TNF $\alpha$ . Ainsi, nous avons pu observer la sensibilité de l'inhibition de l'expression de la luciférase par les CPnp en fonction du niveau d'expression de celle-ci.

Afin de tester l'efficacité de l'inhibition en fonction de l'expression génique, nous avons utilisé un vecteur plasmidique présentant un gène rapporteur luciférase sous promoteur du gène apoE, pGL3, associé à la séquence amplificatrice du gène humain apoE (ME1, downstream enhancer), présenté dans l'article de Yue *et al.*<sup>304</sup>. Nous avons utilisé cinq vecteurs différents, contenant la séquence d'amplification placée à différentes distances du site de début de transcription grâce à l'insertion de fragments de différentes tailles du promoteur de apoE, produits par digestion enzymatique ou par amplification par PCR. La transfection transitoire en cellules Huh7 montre une expression variable de la luciférase en fonction du plasmide. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yue et coll., et permettent de moduler l'expression de la luciférase dans des cellules Huh7 (Figure III-1).



**Figure III-1:** A. Constructions rapportrices présentant le gène luciférase (Luc) en aval de séquences promotrices du gène apoE. Les paires de bases sont numérotées par rapport au site de début de la transcription ; en représente l'inclusion de l'amplificateur ME1 (Source : Yue *et al.*, 2008<sup>304</sup>). B. Expression de la luciférase dans les cellules Huh7 4 jours après transfection réverse avec les plasmides pGL623en, pGL503en, pGL447en, pGL503 et pGL300. L'expression est normalisée par la mesure effectuée dans les cellules transfectées avec le plasmide contenant le promoteur entier de apoE, pGL623en (équivalente à 100 %).

Nous avons ensuite poursuivi l'expérience par l'ajout d'une dose 1 de CPnp siLuc ou siCTRL (correspondant à 400 ng de siRNA par puits) 24 h après la transfection, afin d'observer l'effet de celles-ci sur l'expression de la luciférase. Après 3 jours d'incubation en présence des CPnp, l'expression de la luciférase observée est diminuée de  $82 \pm 4,3 \%$  à  $92 \pm 0,9 \%$  selon les plasmides par rapport à la condition contrôle (Figure III-2), ces différences d'inhibition entre les différents plasmides n'étant pas significatives.

Il est intéressant d'observer que, malgré une variation d'expression des vecteurs allant jusqu'à 52 % entre les vecteurs pGL623en et pGL503en (Figure III-1B), l'inhibition obtenue par les CPnp siLuc par rapport au CPnp siCTRL correspondant est de  $92 \pm 0,9 \%$  et de  $91,5 \pm 0,2 \%$  respectivement, cette différence d'inhibition n'étant pas significative.

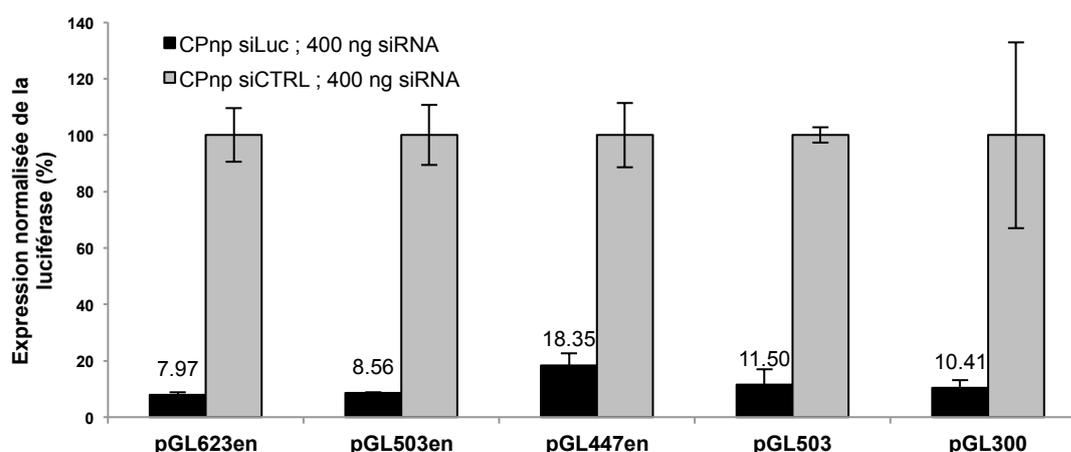


Figure III-2 : Expression de la luciférase par les cellules Huh7 à trois jours selon les différents plasmides en présence de la dose 1 de CPnp siLuc (équivalente à 400 ng de siRNA), normalisée par la condition contrôle en présence de CPnp siCTRL à la même dose (l'expression de la luciférase dans la condition contrôle pour chaque plasmide est équivalente à 100 %. L'expression de la luciférase en présence des CPnp siLuc est rapportée à ce pourcentage).

Pour compléter ces résultats, nous avons réalisé la même expérience en utilisant le pGL623en en présence du facteur de nécrose tumorale alpha ( $TNF\alpha$ ) pour tenter d'obtenir une différence d'expression plus importante de la luciférase. Cette molécule est associée à la régulation de l'expression d'ApoE en favorisant la liaison de  $NF\kappa B$  p50 sur son promoteur<sup>304</sup>. Yue *et al.* ont démontré que l'ajout de ce dernier permet de diminuer d'environ 3 fois l'expression induite par le promoteur de apoE<sup>304</sup>. Différentes doses de  $TNF\alpha$  ont été testées afin de mesurer l'effet de ce traitement sur l'expression de la luciférase dans notre modèle. Comme le montrent les résultats de la Figure III-3, l'adjonction de  $TNF\alpha$  entraîne l'inhibition significative de l'expression de la luciférase. La modulation des concentrations de  $TNF\alpha$  testées n'entraîne cependant pas de variation significative ( $52,3 \pm 9,2 \%$  à  $67,6 \pm 7,4 \%$ ). Il faut cependant noter que l'effet que nous avons observé est moindre que celui obtenu par l'équipe de Yue. Cela peut-être dû à la différence de lignée cellulaire, puisque nous travaillons sur des cellules Huh751,

issues d'une lignée hépatique, tandis que Yue *et al.* utilisent des cellules 3T3-L1, présentant un phénotype d'adipocytes.

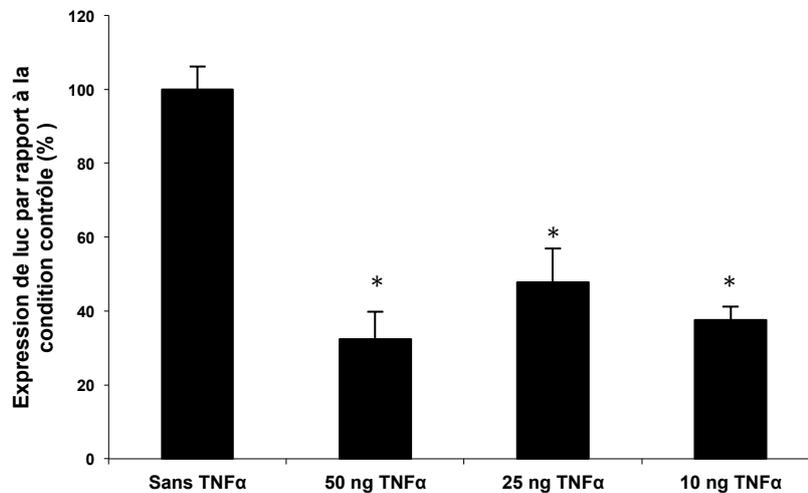


Figure III-3 : Expression de la luciférase dans les cellules Huh7 en présence du plasmide pGL623 en après 3 jours de transfection en présence ou en absence de différentes doses de TNFα. L'expression est normalisée par la mesure effectuée dans les cellules transfectées sans ajout de TNFα (équivalente à 100 %). L'expression de la luciférase en présence des trois doses de TNFα est significativement différente de l'expression de la luciférase en absence de TNFα ( $p < 0,01$ ). La différence d'expression de la luciférase en présence des différentes doses de TNFα n'est pas significative.

Ces résultats montrent également qu'il est possible d'obtenir une diminution de l'expression de luciférase du plasmide pGL623 en de plus de 50 % en présence de TNFα par rapport au témoin sans TNFα (Figure III-1B). Nous avons alors utilisé ce modèle pour étudier la variation d'inhibition de l'expression par les CPnp en fonction de la quantité initiale de luciférase.

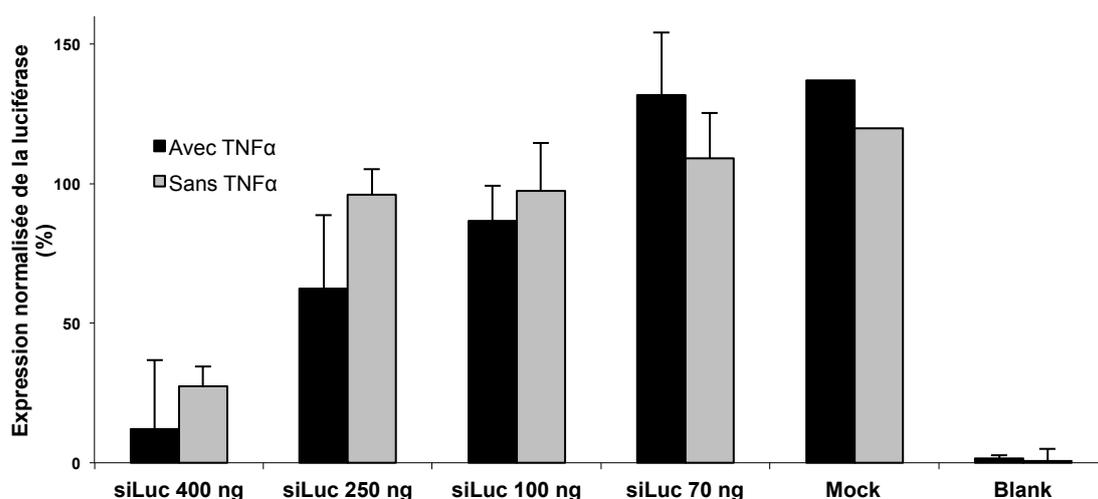


Figure III-4 : Expression de la luciférase dans les cellules Huh7 en présence du plasmide pGL623 en et de différentes doses de CPnp siLuc (équivalentes à 400, 250, 100 et 70 ng de siRNA) avec ou sans TNFα (50 ng). L'expression est normalisée par la condition contrôlée en présence de CPnp siCTRL (équivalente à 100 %).

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre l'inhibition de l'expression de la luciférase par les CPnp siLuc avec et sans  $TNF\alpha$ , quelle que soit la dose de CPnp utilisée (Figure III-4).

Même en diminuant de  $52,3 \pm 9,2 \%$  l'expression de la luciférase grâce à l'ajout de  $TNF\alpha$ , il n'est pas possible d'inhiber davantage le taux d'inhibition de celle-ci. Il faut cependant tenir compte du fait que nous observons l'activité de la luciférase et non pas l'impact des CPnp sur la quantité d'ARNm présents, mais également sur la quantité de protéine qui en découle. Il serait intéressant de pouvoir mesurer les niveaux d'ARNm en présence et en absence de  $TNF\alpha$  et des CPnp, mais également les quantités protéiques de luciférase.

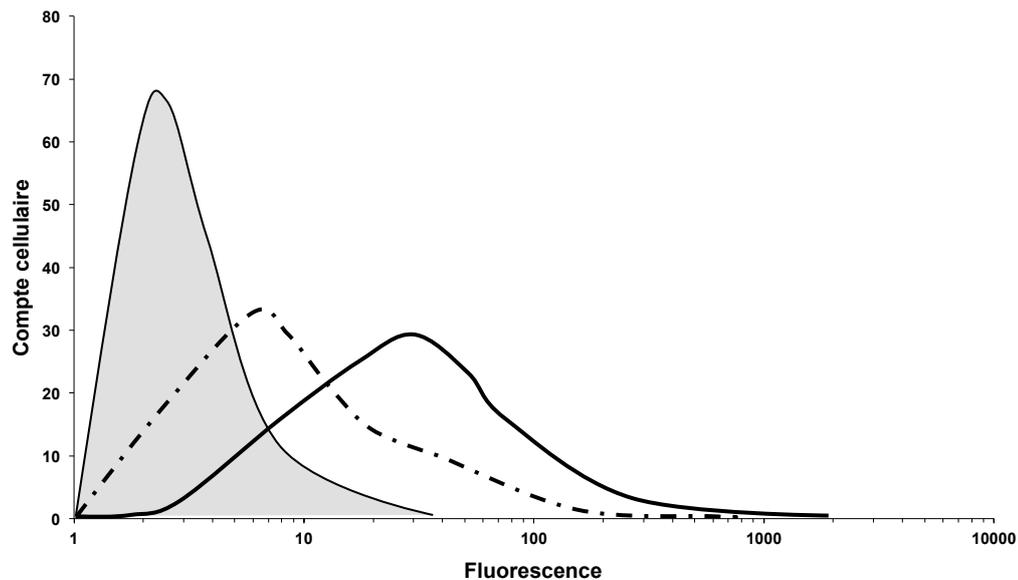
De plus, refaire l'expérience d'une manière différente, en utilisant par exemple un plasmide permettant une expression beaucoup plus faible de la luciférase, ou en travaillant sur des gènes hôtes, apporterait un certain nombre d'informations supplémentaires. En effet, se rapprocher ainsi de conditions réelles d'expression protéique permettrait de prendre la mesure des capacités des siRNA en tant qu'agents thérapeutiques. Nous pourrions ainsi vérifier si, à un niveau d'expression plus faible de la protéine d'intérêt, cette limitation à environ 90 % d'inhibition est toujours présente.

Ces résultats montrent les limites potentielles de l'utilisation des siRNA pour la thérapeutique. En effet, ils suggèrent que la limite d'inhibition n'est pas seulement liée à la quantité de siRNA délivrée dans les cellules, mais également à d'autres facteurs intrinsèques. La machinerie cellulaire d'interférence ARN pourrait elle-même être associée à cette limitation, étant peut-être saturable, ou n'étant peut-être pas capable de gérer une telle quantité de siRNA de manière générale, ou d'un siRNA donné. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la façon dont les siRNA, délivrés par les CPnp, sont utilisés par la machinerie d'interférence ARN. L'utilisation d'un mélange de siRNA ciblant un même gène, plutôt qu'un siRNA unique, pourrait également permettre de contrôler s'il pourrait ainsi être possible de dépasser cette barrière.

Outre la limitation par les capacités de prise en charge des siRNA par la machinerie intracellulaire d'interférence ARN, il faut également tenir compte des pertes de siRNA au niveau cellulaire. En effet, Stalder *et al.* ont montré que 75 à 90 % des siRNA ayant été délivrés dans les cellules par lipofection cationique sont éliminés rapidement par les lysosomes, ainsi que d'autres voies de dégradation et de sécrétion. Ainsi, seuls 10 à 25 % des siRNA délivrés sont libérés des endosomes. Ils ont également démontré que, malgré que la machinerie d'interférence ARN ne soit pas saturée, les siRNA sont chargés de manière très inefficace par AGO2 (moins de 1 % des siRNA ayant pénétré les cellules)<sup>327</sup>. Leurs résultats montrent, de manière surprenante,

que seules 10 à 110 molécules de siRNA sont chargées sur RISC, et que cela est suffisant pour inhiber l'expression d'un ARNm d'expression conséquente<sup>327</sup>.

De plus, comme dans la grande majorité des modèles *in vitro*, les cellules sont issues de lignées cancéreuses très prolifératives. Cette prolifération engendre une dilution des particules, diminuant d'autant la quantité de siRNA par cellule au cours du temps. Ainsi, nous observons en cytométrie en flux une diminution de fluorescence par cellule d'environ 7 fois entre 7 jours et 10 jours après transfection (Figure III-5).



**Figure III-5 : Observation de la présence de siRNA dans les cellules Huh751 à 7 et à 10 jours après transfection par cytométrie en flux. Les cellules ont été transfectées avec des CPnp enrobées avec des siRNA fluorescents (siGLO Green, quantité équivalente à 400 ng de siRNA par puits). En gris : contrôle isotypique. En noir : cellules après 7 jours de transfection. En pointillés : cellules après 10 jours de transfection.**

Pour aller au bout de cette analyse, il serait intéressant d'étudier l'impact des CPnp sur des cultures cellulaires *ex vivo*, à l'aide des cellules telles que les PHH, ou encore d'utiliser nouvelle technique de culture des Huh7 décrite en 2006 par Sainz et Chisari, qui pourrait permettre l'étude de l'impact des CPnp sur une population cellulaire à croissance « très lente ». En effet, l'ajout de DMSO à 1% au milieu de culture de ces cellules leur permet de développer un phénotype plus proche des hépatocytes que lors de leur culture classique, mais surtout de les conserver en culture à plus long terme<sup>328</sup>. Dans ces conditions, la prolifération des Huh7 est très ralentie, voire interrompue, évitant la dilution des CPnp lors des divisions cellulaires.

## 2. Inhibition de la croissance cellulaire par l'interférence ARN : screening de cibles potentielles en culture 2D et 3D

L'utilisation des CPnp associées à des siRNA antiviraux, dirigés soit contre le HCV, soit contre des facteurs hôtes, permettent une diminution de l'infection par celui-ci (cf Inhibition de l'infection par le HCV par les CPnp : Preuve de concept p.113). Nous nous sommes intéressés ici à l'impact des CPnp sur la croissance cellulaire, dans le cadre du développement de tumeurs cancéreuses.

Pour cela, après une sélection de cibles oncogéniques par une analyse bibliographique, nous avons opté pour une stratégie d'étude en plusieurs étapes. Les CPnp enrobées avec les siRNA dirigés contre les différentes cibles ont tout d'abord été testées classiquement *in vitro*, à l'aide de cultures cellulaires « monocouche », à la fois sur un modèle tumoral classique reconnu, les cellules HeLaLuc, et sur un modèle de HCC, les cellules Huh7Luc. Le modèle de culture cellulaire en 2D, utilisé dans la grande majorité des études, permet en effet d'obtenir un environnement cellulaire contrôlé et homogène, et permet la croissance de la plupart des types cellulaires<sup>288</sup>. Ce modèle est cependant très éloigné des conditions physiologiques. En effet, les cellules dans l'organisme sont notamment en contact avec d'autres cellules, ou avec la matrice extracellulaire (ECM), et ont un comportement différent, et peuvent perdre leurs phénotypes une fois sorties de leur cadre et placées en culture en 2D<sup>288</sup>.

D'autre part, il a été montré que les résultats obtenus *in vitro* lors de l'étude de vecteurs ne sont pas toujours corrélés avec les résultats obtenus *in vivo*<sup>324</sup>. En effet, la culture en 2D ne permet pas d'observer une image globale de l'action des siRNA au cours du temps, notamment. L'impact des siRNA en fonction des zones tumorales est également occulté. En effet, les tumeurs ne sont pas des tissus homogènes, et comportent souvent des cellules souches dans des zones hypoxiques, éloignées des vaisseaux sanguins, particulièrement résistantes aux chimiothérapies, et capables d'engendrer la repousse tumorale<sup>324</sup>.

Malgré la différence de fiabilité entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, il n'est pas possible de ne travailler que sur des modèles animaux, pour des raisons évidentes d'éthiques (nombre d'animaux), mais également pour des raisons de coût, et de complexité<sup>325</sup>.

Pour surmonter ces différents obstacles, nous avons trouvé dans la littérature une méthode faisant office d'intermédiaire entre les expériences *in vitro* et *in vivo* : la production et l'utilisation de sphéroïdes. Ce système de culture en 3D de cellules tumorales permet la production d'ECM et les interactions cellule-cellule, et mime la structure de tumeurs précoces non vascularisées, comme l'hétérogénéité, la présence de zones hypoxiques, ou encore la densité cellulaire importante<sup>324,325</sup>. Il permet également aux cellules de retrouver partiellement au

moins un phénotype normal<sup>293,295</sup>, ainsi que d'étudier à long terme l'efficacité et la diffusion des systèmes de « délivrance » de siRNA de manière relativement aisée<sup>324</sup>.

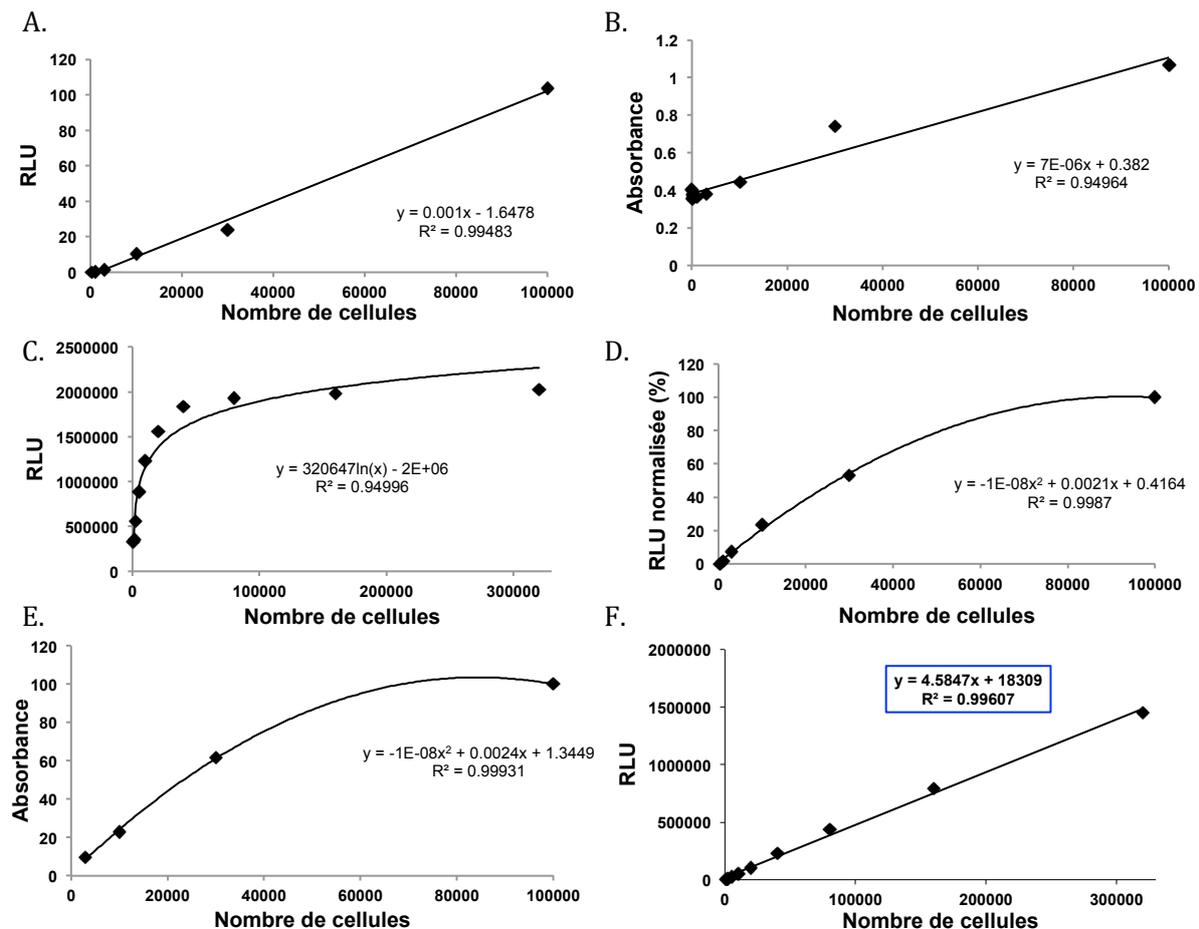
### *Choix des cibles*

Pour analyser l'impact des CPnp sur la croissance cellulaire, nous avons choisi de cibler différentes voies métaboliques fréquemment impliquées dans le développement de tumeurs. Ainsi, nous avons analysé la littérature, afin de sélectionner six cibles potentiellement intéressantes, réparties sur l'ensemble des voies métaboliques principales. L'analyse a été effectuée selon les critères suivants : récurrence de l'implication de la molécule dans des tumeurs humaines, possibilité d'inhiber la croissance tumorale en ciblant celle-ci (grâce à l'utilisation d'anticorps, d'inhibiteurs compétitifs, de siRNA, etc.). Pour chaque cible, un siRNA dont l'efficacité d'inhibition a été testée par le fournisseur (Qiagen) a été sélectionné. Les molécules ciblées sont :

- ❖ K-RAS : ce gène code pour une GTPase située au départ de différentes voies de signalisation entraînant la transcription de gènes impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire. Ras est l'un des oncogènes les plus courants dans les cancers humains<sup>321</sup>.
- ❖ c-Myc : ce proto-oncogène joue un rôle important dans le contrôle de la croissance, de l'apoptose et de la différenciation cellulaire, et fait partie des gènes les plus fréquemment modifiés dans les cancers humains<sup>321</sup>.
- ❖ CTNNB1 : ce gène code pour la  $\beta$ -caténine, une protéine impliquée dans les jonctions adhérentes, ainsi que dans l'arrêt de la division cellulaire des épithélia. Elle est également impliquée dans différentes voies de signalisation, principalement la voie Wnt/ $\beta$ -catenin, et est souvent impliquée dans le développement de cancers<sup>329</sup>.
- ❖ PIK3CA : ce gène code pour la phosphatidylinositol 3-kinase, située en périphérie de la cellule, et activant notamment Akt. Cette protéine est impliquée dans de nombreux cancers, mais sa fonction précise n'est pas encore connue<sup>330</sup>.
- ❖ E2F1 : ce gène code pour une protéine de la famille des facteurs de transcription E2F. Ceux-ci sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, ainsi que dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, et jouent un rôle indispensable de suppresseurs de tumeur<sup>321</sup>.
- ❖ EGFR : Ce gène code pour une glycoprotéine de la superfamille des kinases, récepteur à l'EGF (epidermal growth factor). La liaison de EGF à son récepteur entraîne la prolifération cellulaire. Ce gène est associé à un certain nombre de cancers, notamment du poumon<sup>322</sup>.

*Expériences en 2D – Choix du mode d’analyse*

Pour plus de facilité, nous avons tout d’abord testé l’effet des siRNA ciblant ces différents gènes dans un modèle classique de transfection de lignées cellulaires en plaques de culture. Pour cela, nous avons transfecté ces cellules avec les CPnp enrobées avec les différents siRNA à tester, et analysé la croissance de celles-ci à 3 jours, grâce à l’expression de la luciférase produite par ces dernières. Le choix de cette méthode d’analyse a été réalisé après comparaison de différents systèmes.



**Figure III-6 : Observation de la linéarité de différents tests permettant d’évaluer le nombre et la croissance cellulaire. A. Test MTT. B. Test protéique DC. C. Test CyQuant. D. Test Alamar Blue. E. Test au cristal violet. F. Test luciférase.**

Nous avons comparé six méthodes de quantification directe ou indirecte du nombre de cellules, en les appliquant en parallèle à une même gamme cellulaire allant de  $10^3$  à  $3.10^5$  cellules. Le test sélectionné devait être suffisamment sensible pour différencier de petits nombres de cellules, mais également être capable de détecter de grandes quantités de cellules. Nous avons choisi, pour départager les différentes méthodes, de nous baser sur un facteur mathématique, à savoir la corrélation linéaire entre les valeurs de luminescence ou d’absorbance, et le nombre de cellules. Les résultats obtenus ne sont pas équivalents. Ainsi, les mesures obtenues par test MTT et par test protéique sont linéaires, permettant une évaluation

aisée du nombre de cellules. Cependant, le test MTT présente l'inconvénient de ne pas permettre la réutilisation des puits testés pour d'autres analyses, entraînant une multiplication des échantillons, et surtout la dissociation des expériences de toxicité ou de croissance, et d'efficacité. Le test protéique, quant à lui, manque de précision ( $R^2 \approx 0,95$ ). De plus, ces deux tests ne sont linéaires que jusqu'à  $10^5$  cellules (Figure III-6A, et B).

Le test CyQuant, pourtant destiné à l'évaluation de la quantité cellulaire, présente, sur notre gamme de nombre de cellules, une courbe de tendance logarithmique (Figure III-6C). Les courbes de tendance des tests à l'Alamar Blue et au Cristal violet sont quant à elles polynomiales (Figure III-6D et E). Enfin, la quantification par la mesure de l'activité luciférase est la méthode la plus aisée, et également la plus linéaire ( $R^2 \approx 0,996$ ) sur une gamme de nombre de cellules étendue, permettant d'évaluer le nombre et la croissance des cellules de manière précise, et ce jusqu'à  $3.10^5$  cellules (Figure III-6F). Celle-ci correspondant le mieux à nos besoins, c'est donc cette méthode que nous avons sélectionnée.

### *Expériences en 2D*

Pour tester les siRNA sélectionnés, nous avons tout d'abord choisi deux lignées cellulaires : un modèle de choix en cancérologie, les cellules HeLaLuc, ainsi qu'une lignée de cellules associée au type de cancer qui nous intéresse plus particulièrement, la lignée hépatique Huh7Luc. Construite sur le même principe que la lignée Huh7Luc, la lignée HeLaLuc est dérivée de la lignée HeLa, et exprime également la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*), sous le promoteur du virus SV40 par transfection stable.

Après 3 jours de transfection des cellules avec les CPnp portant les différents siRNA, nous avons pu constater un effet inhibiteur de croissance de ces siRNA anti-oncogéniques. En effet, les six siRNA permettent une diminution de la croissance significative, de l'ordre de  $34,4 \pm 1,0 \%$  à  $52,6 \pm 2,4 \%$  par rapport à la condition contrôle (siCTRL) dans le modèle HeLaLuc (Figure III-7A).

Comme dans le précédent modèle des cellules HeLaLuc, nous avons pu observer sur les cellules Huh7Luc un effet des CPnp enrobées avec certains siRNA sur la croissance cellulaire. La dose utilisée est légèrement supérieure, afin de se conformer à la dose 1 utilisée tout au long de ce manuscrit. Les siRNA dirigés contre KRAS et MYC induisent un ralentissement de la croissance, entraînant, selon le siRNA, une diminution de  $64,2 \pm 1,2 \%$  et de  $49,4 \pm 2,0 \%$ , respectivement, du nombre de cellules après 3 jours de transfection par rapport à la condition contrôle (siCTRL) (Figure III-7B). L'impact des siRNA dirigés contre E2F1, EGFR, PIK3CA, et CTNNB1 sur la croissance des cellules Huh7Luc n'est pas significatif par rapport à la croissance cellulaire en condition contrôle.

L'effet moindre des CPnp enrobées avec les différents siRNA est probablement dû aux variations existant entre les deux lignées cellulaires au niveau métabolique notamment, celles-ci provenant de deux organes différents (utérus et foie), et ayant vraisemblablement également subi des mutations différentes lors de leur oncogénèse.

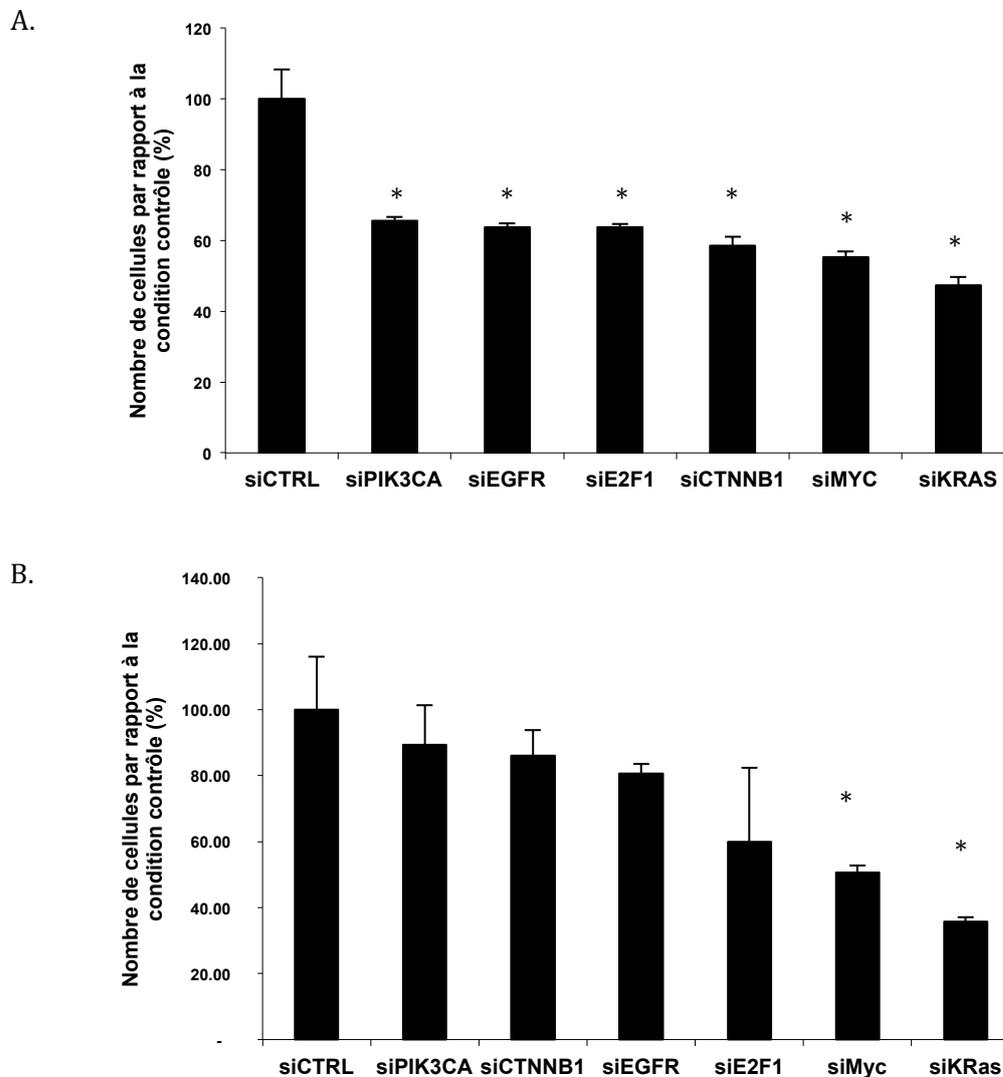


Figure III-7 : Quantité cellulaire évaluée après 3 jours de transfection avec les CPnp enrobées avec différents siRNA anti-tumoraux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules dans la condition contrôle, calculé par régression linéaire grâce à la mesure de l'expression de la luciférase (siCTRL ; CPnp enrobées avec siCTRL) A. Dans les cellules HeLaLuc (quantité de siRNA équivalente à 125 ng). B. Dans les cellules Huh7Luc, avec une dose 1 de CPnp (quantité de siRNA équivalente à 160 ng). La diminution d'expression de la luciférase dans les conditions surmontées d'un astérisque est significativement différente de celle en condition contrôle ( $p < 0,05$ ).

Comme nous l'avons souligné précédemment, l'étude en 2D est également relativement éloignée de la réalité. De plus, la culture en « monocouche » présente l'inconvénient de ne pouvoir se prolonger trop longtemps, faute de place dans les puits. C'est pourquoi nous avons décidé de comparer les résultats obtenus précédemment à ceux résultant de l'utilisation du modèle en 3D des sphéroïdes, et de poursuivre l'expérience sur plus de 3 jours.

*Evaluation des CPnp en culture cellulaire tridimensionnelle*

Trois jours après la production des sphéroïdes, ces derniers ont été mis en présence de CPnp contenant différents siRNA à une concentration équivalente à 160 ng de siRNA. Des mesures de l'aire des différents sphéroïdes ont été réalisées à partir d'images obtenues à 1, 3, 8 et 15 jours de culture en présence de CPnp. L'aire des sphéroïdes a été mesurée grâce au logiciel Image J, puis normalisée par l'aire du sphéroïde correspondant au jour 1.

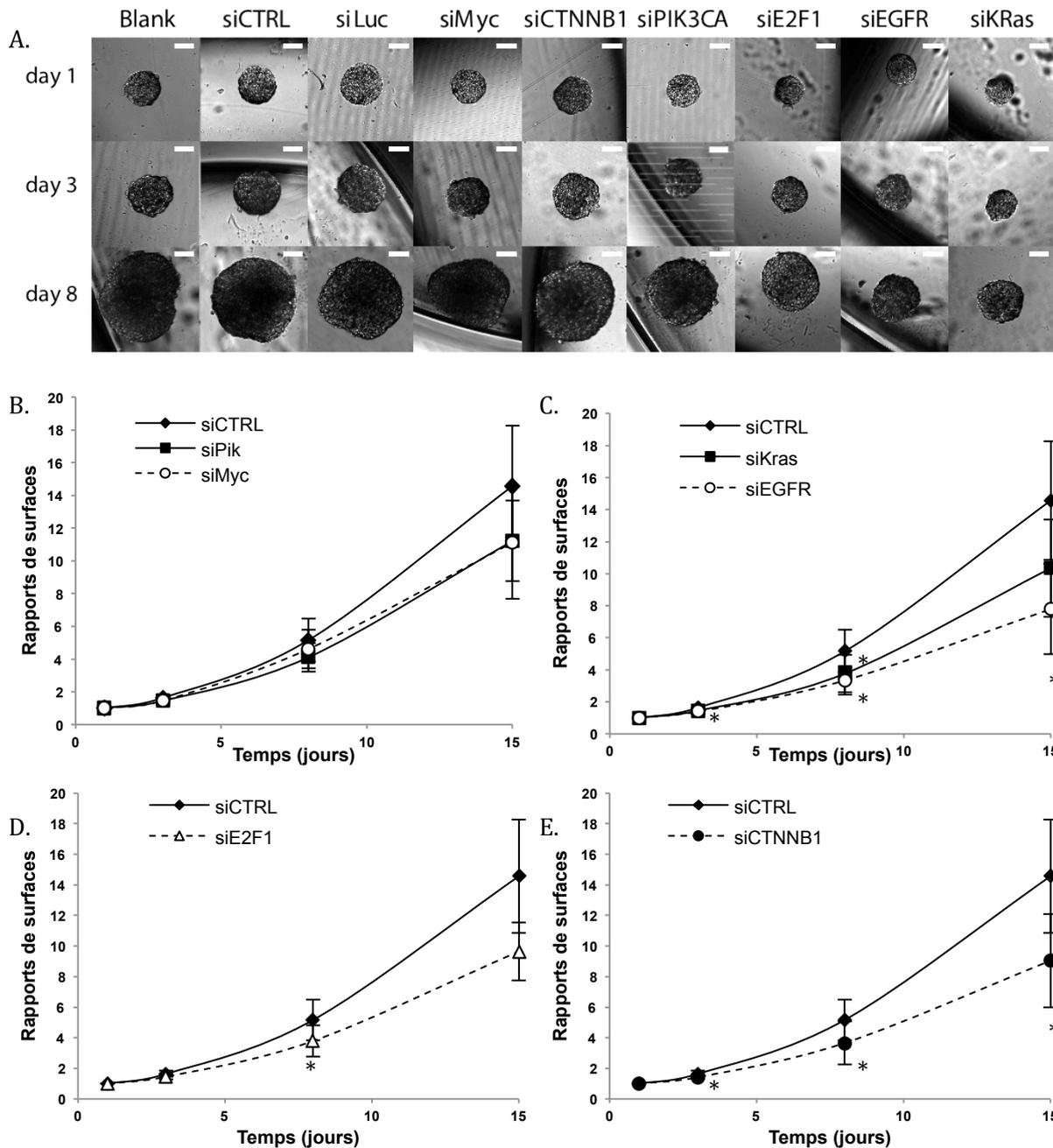


Figure III-8 : Mesures de propriétés antiprolifératives de différents siRNA associés à des CPnp sur un modèle de croissance sphéroïde de cellules Huh7. Les sphéroïdes sont cultivés 15 jours en présence de CPnp (équivalents à 160 ng de siRNA). La croissance est mesurée à jour 1, 3, et 8 et 15. A. Observation des sphéroïdes par microscopie optique à 1, 3 et 8 jours. Barre d'échelle : 100 µm. B. à E. La croissance est mesurée aux jours 1, 3, et 8 et 15 (\* p < 0,05). (Blank : sphéroïdes non transfectés ; siCTRL : CPnp enrobées)

avec un siRNA contrôle non-ciblant ; siLuc : CPnp enrobées avec un siRNA ciblant la luciférase ; siCTRL et siLuc servent de conditions de contrôle négatif).

Les données obtenues montrent que les CPnp enrobées avec des siRNA dirigés contre cMYC et PIK3CA (siMyc et siPik), permettent un ralentissement de la croissance cellulaire de  $10,7 \pm 7,1$  % et  $11,2 \pm 11,2$  % à trois jours, de  $10,7 \pm 22,1$  % et  $20,5 \pm 16,3$  % à huit jours, et de  $23,7 \pm 22,1$  % et  $23,0 \pm 15,7$  % à quinze jours, respectivement (Figure III-8B). Les CPnp enrobées avec les quatre autres siRNA sont plus performants.

En effet, siKRas permet un ralentissement de la croissance cellulaire de  $11,4 \pm 10,3$  % à trois jours, de  $27,2 \pm 21,8$  % à huit jours, et de  $29,0 \pm 19,5$  % à quinze jours, ces valeurs étant significatives à trois et huit jours (Figure III-8C). siE2F1, quant à lui, permet d'observer une croissance cellulaire ralentie de  $13,2 \pm 7,5$  % à trois jours, de  $29,2 \pm 17,2$  % à huit jours, et de  $33,8 \pm 12,3$  % à quinze jours, ces valeurs étant significatives à huit jours (Figure III-8D).

Enfin, l'ajout de CPnp enrobées avec siCTNNB1 ou siEGFR sur les cellules entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire de  $13,4 \pm 7,5$  % à  $14,7 \pm 9,6$  % à trois jours, de  $29,3 \pm 26,5$  % à  $35,5 \pm 16,6$  % à huit jours, et de  $37,9 \pm 19,6$  % à  $46,5 \pm 18,1$  % à quinze jours, respectivement (Figure III-8E, C). La différence de croissance cellulaire par rapport à la condition contrôle est statistiquement significative à tous les temps pour CTNNB1 et EGFR (toutes les différences statistiques sont représentées par un astérisque dans la Figure III-8).

Malgré cette validation statistique, nous pouvons constater que les écarts-types, représentant la déviation des valeurs de taille des différents échantillons autour de la moyenne, sont assez importants. Cependant, travaillant sur un système 3D, nous avons constaté que la moindre variation de taille des sphéroïdes est amplifiée de façon conséquente, engendrant ces écarts-types prononcés. Pour y remédier, il serait nécessaire de multiplier les expériences, et les échantillons (ici nous travaillons sur deux expériences représentatives, contenant au moins 8 sphéroïdes par condition).

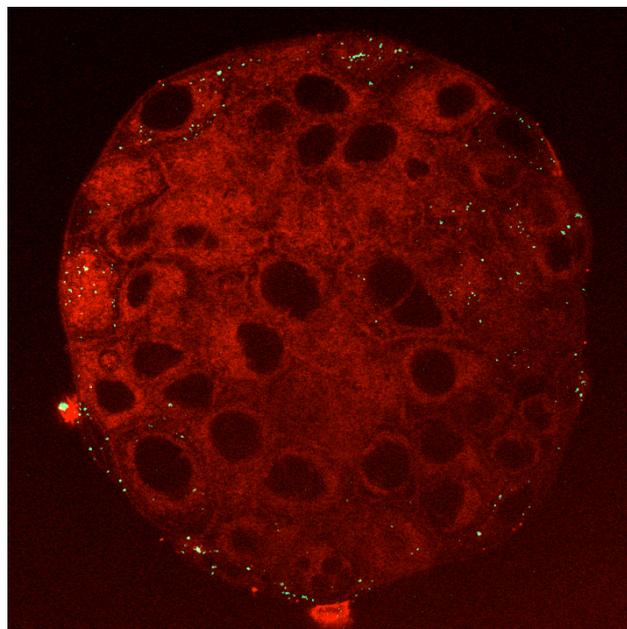
En comparant les résultats obtenus en 2D et en 3D, nous pouvons faire le même constat que Ohmori *et al.*<sup>331</sup>: nous observons une variation dans l'efficacité des CPnp enrobées avec les différents siRNA selon que les expériences soient réalisées en « monocouche » ou en sphéroïdes. En effet, si en 2D comme en 3D siPik est le siRNA le moins efficace pour ralentir la croissance cellulaire, nous avons observé que siMyc, permettant une inhibition significative parmi les plus fortes en 2D, ne permet pas d'obtenir les mêmes résultats dans les sphéroïdes. De même, si siKRas permet d'obtenir un ralentissement de la croissance cellulaire significative à la fois en 2D et en 3D à trois jours, les valeurs sont cependant très différentes, dépassant 50% en 2D, et n'atteignant que 11% en 3D. Il sera alors important d'observer si les résultats obtenus *in vivo* sont bien corrélés avec ceux obtenus dans le modèle tridimensionnel.

Pénétration tissulaire des CPnp

Au vu des résultats intéressants, mais relativement limités, d'inhibition de croissance des sphéroïdes par les CPnp, nous nous sommes intéressés à la capacité d'entrée des CPnp dans les sphéroïdes, et à leur distribution.

Ainsi, nous avons observé la répartition des CPnp par microscopie confocale dans les sphéroïdes de cellules Huh7Luc grâce à l'utilisation de CPnp enrobées avec un siRNA fluorescent, le siGLO Green, et par le marquage membranaire des sphéroïdes au PKH26.

Cette expérience nous a permis de constater que les CPnp ne pénètrent que dans la première ou les deux premières couches cellulaires des sphéroïdes après 24 h de mise en contact (Figure III-9). Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la limitation d'inhibition de croissance observée lors des expériences précédentes.



**Figure III-9 : Pénétration des CPnp dans les sphéroïdes Huh7Luc. Observation par microscopie confocale à 3 jours. Les CPnp sont visibles par l'utilisation d'un siRNA fluorescent, siGLO green (en vert), et les membranes cellulaires sont marquées par PKH26, acide gras associé à un fluorophore s'intégrant dans les membranes.**

Cette pénétration limitée dans les sphéroïdes pourrait s'expliquer par le choix du modèle 3D utilisé. L'utilisation d'une technique microfluidique permettrait éventuellement un contact plus important des CPnp avec les cellules grâce à l'utilisation d'une circulation du milieu en circuit fermé<sup>301</sup>. Ce dernier serait également plus proche de la réalité de l'interaction des cellules avec les éléments du flux sanguin ou lymphatique. En effet, contrairement aux conditions classiques de culture cellulaire, culture des sphéroïdes y compris, l'environnement cellulaire dans l'organisme est constamment soumis à différents flux, permettant l'apport de nouveaux nutriments, et la mise en contact des cellules avec différents ligands et molécules. Dans les

conditions classiques de culture *in vitro* en 2D, les cellules se trouvent dans un milieu immobile, dont les éléments vont, selon leur densité, soit rester en suspension, soit se déposer au fond des puits. Si cette dernière possibilité peut-être intéressante lors de la culture de cellules en « monocouche » – les cellules se trouvant au fond des puits, tout élément soumis à la gravité est susceptible d’entrer en contact avec celles-ci – ce n’est pas le cas dans le cadre de la culture de sphéroïdes<sup>332</sup>. Cependant, favoriser la mise en contact des particules avec les sphéroïdes n’assure pas forcément l’augmentation de l’entrée de celles-ci dans les cellules. En effet, il est possible que les mécanismes d’entrée des particules soient déjà sollicités au maximum pour les cellules périphériques. De plus, la prolongation du contact particules-cellules pourrait ne pas permettre non plus d’augmenter la pénétration des particules dans les cellules situées au centre des sphéroïdes. En effet, comme l’endocytose, les systèmes de passage de cellule à cellule (exocytose et passage jonctionnel) pourraient être saturés.

Les sphéroïdes présentent les mêmes caractéristiques physiologiques que les tumeurs *in vivo* : densité cellulaire importante, pression interstitielle élevée, hypoxie, contacts cellule-cellule et présence de matrice extracellulaire<sup>324,333,334</sup>. Ces paramètres empêchent la pénétration de molécules thérapeutiques ou de nanoparticules en profondeur dans les tumeurs, une fois sorties des capillaires sanguins<sup>335</sup>. Dans les sphéroïdes, comme dans les tumeurs, ces éléments limitent fortement la « délivrance » de molécules en restreignant la pénétration des vecteurs au sein du tissu. Nos données sont conformes aux résultats obtenus précédemment par Goodman *et al.*<sup>336</sup>. En effet, au bout de 5, si 37% des nanoparticules de polystyrène de 40 nm pénètrent au delà des premières couches de cellules des sphéroïdes, ces valeurs chutent à moins de 5% pour des nanoparticules de 100 nm et plus<sup>336</sup>.

Le développement d’une technique de micro-injection de CPnp au cœur des sphéroïdes, mimant une injection intra-tumorale pourrait être très intéressante et permettre de remédier en partie à ce problème. L’adaptation croissante des techniques de l’industrie microélectronique à la biologie a permis la création de micro-aiguilles adaptées à l’injection d’ADN dans les cellules, de drogues dans les tissus neuraux etc.<sup>337</sup>. Ces techniques pourraient, de la même manière, être employées pour injecter les CPnp au cœur même des sphéroïdes. Il faudra cependant s’assurer qu’une injection de ce type permet bien la diffusion des CPnp vers l’extérieur des sphéroïdes, et sur quelle distance. L’utilisation d’une telle technique associée à la présence de CPnp dans le milieu de culture pourrait alors permettre de cibler toutes les cellules des sphéroïdes. Il sera cependant également important de prendre en compte la nature différente de l’environnement cellulaire en périphérie et au centre des sphéroïdes. En effet, les cellules centrales sont souvent hypoxiques, voire nécrotiques, et peuvent ne pas présenter le même métabolisme que les cellules périphériques, et donc ne pas réagir de la même manière aux CPnp. Il serait cependant

très important de pouvoir cibler ces cellules. En effet, il a été démontré que, *in vivo*, les régions tumorales éloignées des vaisseaux sanguins peuvent contenir des cellules souches qui, n'étant pas touchées par les traitements du fait de leur éloignement, peuvent suffire à relancer la croissance tumorale malgré l'efficacité des traitements<sup>335</sup>. L'utilisation de micro-injections itératives, associées au changement du milieu de culture des sphéroïdes, permettrait de se rapprocher encore davantage de la réalité des injections intra-tumorales *in vivo*, en s'affranchissant du contact permanent et artificiel des particules et des sphéroïdes en culture.

### 3. Evaluations préliminaires des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2.5</sub> *in vivo*

Afin de suivre la diffusion locale des particules après injection intra-tumorale, les particules de phosphate de calcium ont été marquées avec du vert d'indocyanine (ICG). L'incorporation d'ICG dans des formulations de phosphate de calcium pour l'étude de la biodistribution de nanoparticules a été décrite précédemment par Altinoğlu, et n'entraîne pas de modification ni de la taille, ni de l'efficacité des nanoparticules<sup>308</sup>. En effet, après analyse par DLS, nous avons observé que 81,1% des CPnp ICG mesurent  $88,8 \pm 17,8$  nm. Il existe également une petite population de particules plus petites : 18,9% des CPnp mesurent  $29,7 \pm 5,1$  nm (Figure III-10). Celle-ci peut également être observée occasionnellement lors de la production de CPnp sans ICG.

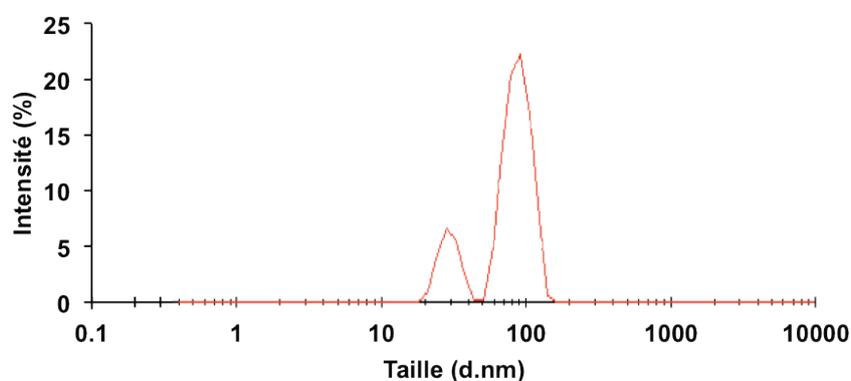


Figure III-10 : Distribution de taille des CPnp ICG en fonction de l'intensité. Mesure par DLS.

La diffusion et la rémanence des nanoparticules ont été testées dans un modèle de tumeur sous-cutanée de cellules Huh7luc sur souris BRG. Trois doses différentes de particules ont été testées : 1, 10 et 100  $\mu$ g de siRNA dans un volume constant de 90  $\mu$ L. Les particules ont été préparées avec un siRNA ciblant la luciférase (siLUC), afin de pouvoir parallèlement analyser l'efficacité de la « délivrance » des siRNA. A  $t = 0, 1$  et 2 jours après injection, les tumeurs ont été imagées et l'intensité de fluorescence a été mesurée (Imageur IVIS® Spectrum, Perkin Elmer). Parallèlement, une mesure de l'intensité de bioluminescence a été réalisée afin de détecter la tumeur, mais également pour voir l'effet potentiel de la « délivrance » locale des siRNA ciblant la luciférase.

Les résultats d'intensité de fluorescence sont présentés dans les Figure III-11 et Figure III-12. Les données observées montrent une fluorescence de  $1,8 \cdot 10^{-6}$ , de  $2,3 \cdot 10^{-6}$ , et  $4,8 \cdot 10^{-6}$  unités relatives (RFU) pour les doses correspondant à 1, 10 et 100  $\mu$ g de siRNA, respectivement, après injection. Les valeurs correspondent au rapport de l'efficacité moyenne d'émission en fonction du niveau d'excitation ( $p/s/cm^2/sr/\mu W/cm^2$ ). De manière intéressante, malgré

l'injection de doses variant d'un log, la différence de fluorescence observée correspond seulement à un facteur 2 environ à chaque fois (Figure III-11).

Pour les trois doses testées, on observe une rémanence de la fluorescence sur l'ensemble des temps testés. Les valeurs de fluorescence de l'ICG associé aux CPnp injectées à une dose correspondant à  $1 \mu\text{g}$  de siRNA ne présentent pas de grandes variations au cours du temps, et se situent entre  $1,4 \cdot 10^{-6}$  et  $2,2 \cdot 10^{-6}$  RFU. Il est intéressant de noter que pour les doses 10 et  $100 \mu\text{g}$ , on observe même une augmentation de la quantité de fluorescence mesurée. Ainsi, les valeurs de fluorescence de l'ICG associé aux CPnp injectées aux doses correspondant à 10 et  $100 \mu\text{g}$  de siRNA présentent une augmentation jusqu'au jour 2, avec des valeurs de  $4,5 \cdot 10^{-6}$  et  $7,7 \cdot 10^{-6}$  RFU à jour 1, et  $8,1 \cdot 10^{-6}$  et  $23,4 \cdot 10^{-6}$  RFU à jour 2, respectivement. L'ICG est une molécule sensible à la concentration, et présentant un phénomène d'extinction (*quenching*) à forte concentration. La dispersion des nanoparticules et la diminution relative de la concentration d'ICG *in situ* au cours du temps pourrait expliquer la diminution du phénomène d'extinction, et donc l'augmentation des valeurs de fluorescence<sup>308,338</sup>. Au troisième jour, l'intensité de fluorescence diminue quelque soit la concentration étudiée.

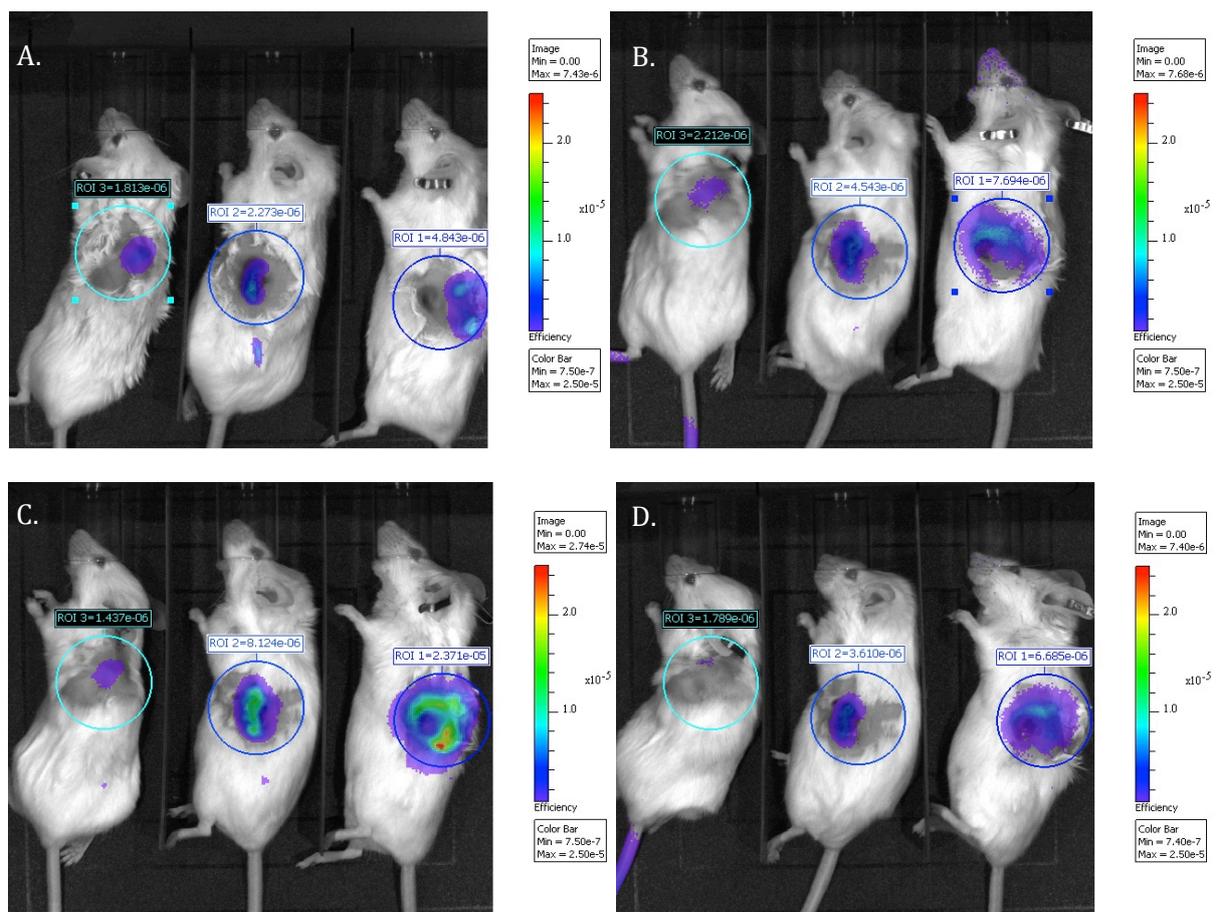
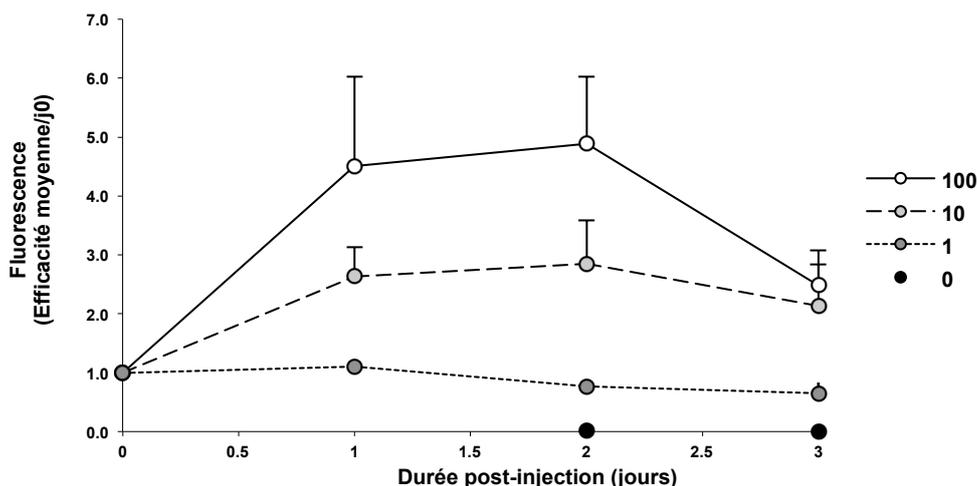


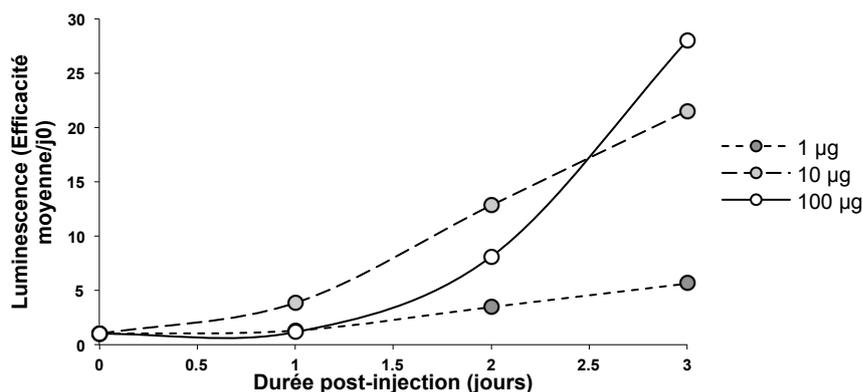
Figure III-11 : Observation des CPnp siLuc ICG *in vivo* après injection intra-tumorale (A.), à jour 1 (B.), à jour 2 (C.), à jour 3 (D.). Les mêmes trois souris sont présentées dans chaque image, ayant reçu une injection de CPnp équivalente à une quantité de 1, 10, ou  $100 \mu\text{g}$  de siRNA, respectivement, de gauche à droite.



**Figure III-12 : Représentation graphique des moyennes de fluorescences journalières de chaque dose de CPnp (équivalente à une quantité de 1, 10, ou 100 µg de siRNA) rapportée à la valeur respective obtenue au jour d'injection.**

Ces résultats confirment la rémanence des CPnp au niveau de la tumeur au moins trois jours, quelle que soit la dose injectée. Il serait intéressant de les compléter par des expériences d'histologie, afin d'observer où se situent les particules en fonction du temps. De plus, des expériences d'efficacité, utilisant les siRNA mis en évidence précédemment (siEGFR, siE2F1, siKRas, siCTNNB1), permettraient de déterminer si la présence des CPnp au niveau tumoral peut être corrélé avec de l'interférence ARN.

L'analyse de la bioluminescence des tumeurs Huh7Luc en présence de CPnp enrobées avec des siRNA dirigés contre la luciférase nous a également permis d'évaluer l'impact des CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub> sur l'expression de cette enzyme par la tumeur (Figure III-13).



**Figure III-13 : Expression de la luciférase au cours du temps dans les tumeurs sous-cutanées en présence de CPnp enrobées avec 1, 10, ou 100 µg de siLuc. L'expression à chaque temps est normalisée par l'expression correspondante au jour d'injection.**

Comme le montre la figure ci-dessus (Figure III-13), l'expression de la luciférase dans les cellules tumorales Huh7Luc n'est pas affectée de manière significative par l'ajout de CPnp siLuc, quelle que soit la dose de siRNA correspondante, en une injection unique. Ces résultats sont en

accord avec les résultats obtenus dans les cellules A549Luc avec les CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub> (cf Efficacité d'interférence ARN *in vivo* p.101). En effet, l'utilisation de siLuc n'influe en rien sur la croissance cellulaire, les tumeurs continuent de croître, et la quantité de luciférase exprimée est donc en constante augmentation, ne pouvant que difficilement être compensée par l'injection unique de CPnp siLuc.

Les données obtenues nous donnent des résultats intéressants concernant l'utilisation de CPnp *in vivo*. En effet, une dose de 1 µg de CPnp ICG est suffisante pour être visible jusqu'à 3 jours suite à une injection intra-tumorale sous-cutanée. Toutefois, des doses jusqu'à 100 µg de siLuc ne sont pas suffisantes pour observer une diminution de l'expression de la luciférase dans des cellules tumorales en croissance.

La réalisation de la même expérience avec un siRNA anti-tumoral efficace, comme ceux mis en évidence grâce au modèle des sphéroïdes, ainsi que la mise en place d'un protocole d'injections itératif, permettra probablement d'obtenir de meilleurs résultats, et de préciser davantage les doses nécessaires de CPnp.

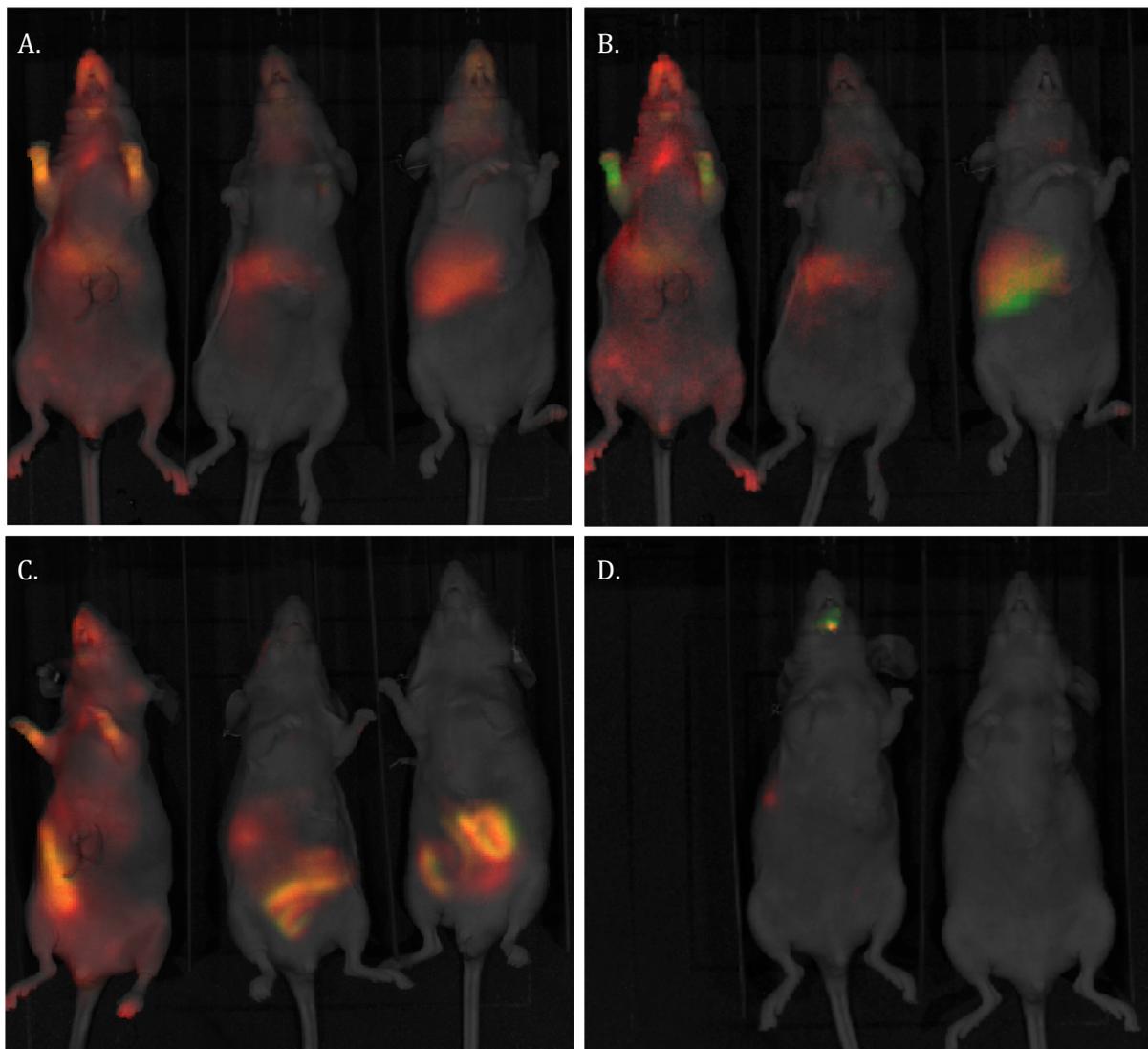
### ***Biodistribution des CPnp et effet EPR***

Toutes les tumeurs ne sont pas accessibles par une injection intra-tumorale. En effet, outre les tumeurs sous-cutanées, les tumeurs nécessitent toutes d'autres modes d'acheminement des traitements. Si les possibilités sont variées, elles ne sont cependant pas toutes envisageables :

- ❖ Injection intra-tumorale en chirurgie<sup>339</sup> : augmente les risques liés au traitement, notamment suite à la nécessité de réaliser l'injection sous anesthésie, et aux risques d'infections associés à l'opération, lorsque la tumeur n'est pas sous-cutanée. De plus, tout protocole itératif d'injections à court terme est exclu.
- ❖ Implantation d'une « pompe » sur le site tumoral, afin de libérer le traitement progressivement<sup>340</sup> : comme précédemment, de nombreux risques sont associés à la chirurgie. De plus, toutes les molécules thérapeutiques ne peuvent pas se conserver correctement dans de telles conditions.
- ❖ Injections intra-péritonéales ou intraveineuses<sup>341</sup> : les plus couramment utilisées, mais nécessitant la certitude que les molécules thérapeutiques atteignent bien leur cible.

La biodistribution des nanoparticules de type CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2,5</sub>, après injection intraveineuse, a été évaluée par imagerie de fluorescence à l'aide de l'imageur IVIS® (Perkin Elmer) dans un modèle murin de cancer orthotopique. Le modèle utilisé se base sur la méthode utilisée pour obtenir des souris présentant des foies humanisés<sup>269</sup>. Elle consiste en l'injection

splénique dans des souris Nude de cellules Huh7Luc, qui vont migrer vers le foie par la veine splénique et la veine porte hépatique et permettre l'établissement d'un processus tumoral. Les expériences sont réalisées lorsque deux mesures successives des tumeurs détectées par bioluminescence présentent une augmentation du signal, et atteignent des valeurs supérieures à  $10^5$  RLU, correspondant à des tumeurs de plusieurs millimètres. Les CPnp ICG (en équivalent siRNA) ont été injectées à raison de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Cette dose correspond, en moyenne, à la quantité de siRNA couramment injectée *in vivo*, et ayant montré une certaine efficacité dans plusieurs modèles<sup>342-344</sup>.

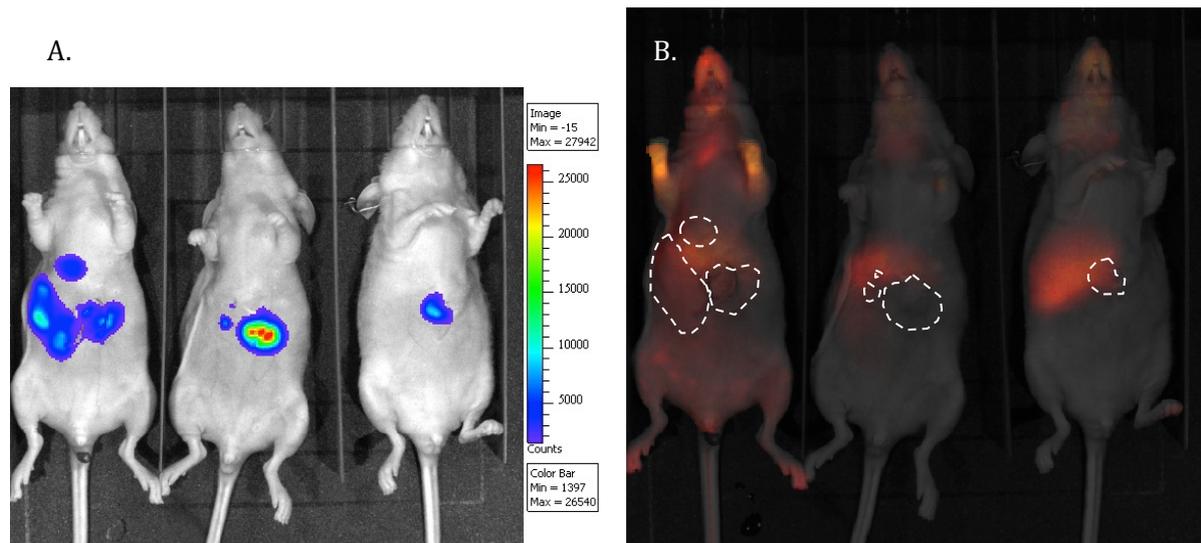


**Figure III-14 :** Observation de la répartition des CPnp marquées par incorporation d'ICG dans le cœur de phosphate de calcium, injectés par voie rétro-orbitale dans des souris Nude présentant une tumeur hépatique Huh7Luc (quantité de CPnp injectée correspondant à  $27 \mu\text{g}$  de siRNA). Les images de pseudo-fluorescence ont été réalisées 2 minutes (A.), 10 minutes (B.), 2 h (C.) et 24 h (D.) après l'injection des CPnp.

Comme le montrent les images (Figure III-14), les CPnp sont visibles à 2 et 10 minutes dans le foie des souris. Après 2 h, les CPnp sont discernables à différents niveaux des intestins des souris, suggérant un passage hépatobiliaire ou hépato-gastrique (Figure III-14C). Au bout de

24 h, la grande majorité des CPnp semble déjà avoir été évacuée (seules deux souris sont présentées à 24 h car la troisième est décédée la veille suite à l'anesthésie).

En parallèle, des mesures de bioluminescence ont permis le positionnement des tumeurs (Figure III-15). Les mesures de bioluminescence ont été réalisées après celles de fluorescence, afin d'éviter une superposition des images. En effet, la bioluminescence entraînant une émission à toutes les longueurs d'ondes du spectre visible, sa mesure avant la fluorescence pourrait entraîner la présence d'un bruit de fond artificiel au niveau de la tumeur.



**Figure III-15 : Mesure de bioluminescence permettant la localisation des tumeurs Huh7Luc chez les souris Nude injectées avec les CPnp ICG (quantité équivalente à 27 µg de siRNA). A. Image de bioluminescence des tumeurs Huh7Luc prise à 2 min après injection des CPnp. B. Superposition de l'image de fluorescence des CPnp à 2 min et des zones tumorales détectées par bioluminescence (trait pointillé blanc).**

Les images de bioluminescence et de fluorescence ainsi comparées mettent en doute la colocalisation des CPnp et des tumeurs, et écartent a priori l'idée d'effet EPR des tumeurs sur les CPnp. Ces données sont cependant à confirmer, car les tumeurs obtenues n'ont pas été analysées en terme de vascularisation et de flux sanguin. En effet, pour pouvoir observer un effet EPR, la vascularisation des tumeurs est indispensable. Il pourrait également être intéressant de renouveler l'expérience en présence d'un facteur améliorant l'effet EPR comme la nitroglycérine ou l'angiotensine II<sup>103</sup>. Dans les tissus sains, en présence de ces facteurs, la pression sanguine augmente, et les muscles lisses entourant les vaisseaux se contractent, renforçant les jonctions cellule-cellule, et diminuant les risques de fuites. Dans les tissus tumoraux, au contraire, les vaisseaux sanguins, de moins bonne qualité, et étant moins étanches, vont se dilater davantage de manière passive, et favoriser les fuites, et donc l'échappement des nanoparticules dans les tissus tumoraux<sup>103</sup>.

L'obtention d'un effet EPR pourrait être très favorable à l'impact des CPnp sur la croissance tumorale. Comme indiqué ci-dessus, celui-ci pourrait favoriser la pénétration des

particules dans les tissus tumoraux, mais également améliorer leur temps de contact avec les cellules tumorales. En effet, il a été démontré que la rétention de macromolécules ou de particules au niveau tumoral peut être prolongée de manière importante grâce à l'effet EPR<sup>103</sup>.

L'ajout d'une couche supplémentaire sur les CPnp pourrait favoriser le contact de celles-ci avec les cellules tumorales, et améliorer l'effet EPR. En effet, la présence d'une charge de surface neutre, voire légèrement négative, et de molécules biocompatibles en surface des CPnp, favorise grandement la mise en place d'un effet EPR, sans nécessité d'ajouter de molécules de ciblage<sup>103</sup>. Ces modifications pourraient faciliter, voire prolonger la mise en contact des CPnp avec les cellules tumorales, et ainsi augmenter les possibilités d'entrée des CPnp, et donc l'efficacité des siRNA, et ce, sans restreindre le ciblage à un type cellulaire et tumoral unique.

---

# Conclusions

---

Les travaux réalisés au cours de mes trois ans de thèse ont permis de caractériser et de réaliser la preuve de concept d'un type de vectorisation de siRNA prometteur basé sur l'enrobage multicouche de nanoparticules de phosphate de calcium. Deux formulations de nanoparticules ont été analysées, à la fois *in vitro* et *in vivo*, laissant présager de leur potentiel thérapeutique.

La première formulation, CPnp(siRNA/PEIY)<sub>2</sub>, nanoparticules d'environ 60 nm, et d'une stabilité de plus de 6 jours, a montré *in vitro* des capacités d'inhibition de l'expression génique jusqu'à 95 % à trois jours. Par ailleurs, le greffage de galactose au polycation, permettant de cibler le récepteur aux asialo-glycoprotéines, ne modifie pas l'efficacité fonctionnelle du vecteur. Les expériences réalisées *in vivo* ont démontré que, si une dose de CPnp enrobées n'est pas suffisante pour inhiber l'expression d'un gène rapporteur, gène de luciférase, exprimé par les cellules tumorales, un effet est visible grâce à l'injection itérative de CPnp. Cependant, probablement dû en partie au fait que l'inhibition de l'expression de ce gène, contrairement à d'autres cibles, n'a *a priori* aucun impact sur la croissance ou même la physiologie cellulaire, l'inhibition de l'expression de cette molécule dans une tumeur toujours croissante s'est avérée limitée à malgré l'injection itérative de CPnp.

La comparaison de l'inhibition de l'expression tumorale de la luciférase *in vivo* en présence de CPnp enrobées avec des siRNA ciblant la luciférase ou non-ciblants a également permis de détecter un effet off-target des nanoparticules, probablement dû à l'injection trop massive d'un siRNA unique<sup>17</sup>. Pour remédier à cela, l'emploi de siRNA différents, mais ciblant le même gène, ou même des gènes différents, permettant de diminuer la quantité individuelle de chaque siRNA, pourrait être une solution.

Les expériences *in vivo* de biodistribution nous ont également permis de confirmer l'hypothèse de la distribution principale des particules dans le foie et les poumons, que les CPnp présentent des molécules de galactose pour le ciblage ou non. Il semble cependant que les nanoparticules ciblées pénètrent dans les cellules par deux voies : l'endocytose classique, et l'endocytose médiée par récepteur, principalement associée aux cellules phagocytes de Kupffer. Bien qu'il ne soit pas opérant pour cibler les cellules tumorales hépatiques, ce modèle de ciblage de récepteur montre l'intérêt du principe pour moduler l'endocytose des CPnp. Pour des raisons notamment de cytotoxicité du PEI, nos recherches se sont orientées vers une nouvelle formulation, CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>2.5</sub>. Comme les précédentes, ces nanoparticules sont sphériques, mesurent moins de 100 nm (environ 80 nm), et sont stables dans l'eau jusqu'à huit

jours, ainsi que dans le sérum. De plus, nous avons observé l'entrée de ces nanoparticules par endocytose, ainsi que la colocalisation du cœur de phosphate de calcium avec les siRNA jusqu'à une semaine, suggérant la possibilité d'une libération ultérieure de siRNA. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par qRT-PCR, montrant la présence de siRNA libres pendant au moins 7 jours dans les cellules.

Suite à la caractérisation de cette formulation, nous avons réalisé la preuve de concept d'efficacité de celle-ci sur un premier modèle de pathologie : l'infection virale par le HCV. Que les CPnp soient utilisées en amont de l'infection, ou que celle-ci soit déjà chronique, nous avons obtenu une inhibition de plus de 99,95 % et 96,9 % de l'infection, respectivement, en ciblant l'IRES du virus à l'aide d'une dose non toxique. Dans les deux cas, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec les techniques commerciales de transfection, ou avec l'utilisation de complexes PEIPyr/siRNA non particuliers. L'effet obtenu est cependant plus faible lorsque l'infection est déjà installée. Ce résultat peut s'expliquer par le rapport CPnp/cellules, différent dans les deux conditions du fait de la prolifération cellulaire qui se développe durant la mise en place de l'infection virale dans le cas de post-infection. Il serait des plus intéressants de renouveler cette expérience sur des cellules qui ne se divisent pas, afin de pouvoir contrôler le nombre de cellules présentes à tout moment, comme par exemple en utilisant des hépatocytes primaires humains (PHH). Si, de manière générale, le modèle de post-infection est plus proche de la réalité de l'infection virale, le modèle de pré-infection pourrait cependant présenter un intérêt dans le cadre des transplantations hépatiques suite au HCV. En effet, dans ce cas, une réinfection quasi-immédiate du greffon est observée. La mise en place d'un traitement par les CPnp au moment de la transplantation pourrait éventuellement empêcher, ou au moins ralentir l'infection du nouveau foie.

Malgré la qualité de l'inhibition obtenue par le ciblage du virus, celle-ci n'est pas totale. Cela est cependant indispensable pour espérer éradiquer une infection virale telle que le HCV. De plus, le HCV est connu pour sa grande variabilité, en faisant une cible complexe. Son cycle viral est cependant dépendant d'un certain nombre de facteurs hôtes qu'il peut alors être intéressant de cibler, ceux-ci étant bien moins soumis à mutations. Nous avons montré que le ciblage de facteurs hôtes nécessaires à l'entrée du virus pouvait être une approche alternative et complémentaire. Ainsi, le ciblage de CD81 permet d'inhiber de façon importante l'expression de ce facteur d'entrée, tandis que le ciblage de CLDN1 lors de l'infection virale permet d'inhiber l'infection virale jusqu'à 96,3 % dans le modèle de pré-infection, et seulement de 50 % en post-infection, ce qui peut, dans ce dernier cas, s'expliquer par la persistance de l'infection dans les cellules en culture. En effet, CLDN1, contrairement à d'autres facteurs hôtes comme ApoE, ne participe pas au cycle viral en lui-même, mais bien à son entrée dans les cellules. Le ciblage de ce

facteur est inopérant sur le virus internalisé, mais cependant empêche l'infection de nouvelles cellules encore saines.

Afin de pouvoir améliorer les résultats obtenus, il serait intéressant de ne pas seulement cibler le virus ou un facteur de l'hôte, mais d'employer des combinaisons renouvelées de siRNA utilisés de manière synergique. Il pourrait alors être possible d'éviter l'échappement viral et de juguler l'infection. Se pose alors la question de savoir quel serait le mode de vectorisation le plus intéressant : multiplier les populations de CPnp, enrobées chacune avec un type de siRNA précis, ou combiner les siRNA avant d'enrober les CPnp.

Ayant prouvé l'intérêt potentiel des CPnp dans le traitement de pathologies virales comme l'hépatite C, nous nous sommes également intéressés à réaliser une preuve de concept de l'efficacité des CPnp dans le cadre de pathologies tumorales et cancéreuses. Pour cela, un modèle de culture 3D mimant en partie les conditions *in vivo* a été utilisé pour l'étude des CPnp *in vitro* : les sphéroïdes. Ces amas cellulaires sphériques présentent en effet des interactions cellule-cellule s'approchant plus des conditions tissulaires que les cultures cellulaires bidimensionnelles. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence quatre cibles intéressantes pour le traitement de tumeurs de type hépatique en particulier : CTNNB1, EGFR, KRAS, et E2F1. En effet, le ciblage de ces éléments importants de différentes voies de signalisation permet un ralentissement significatif de la croissance des sphéroïdes. Il semble cependant que les CPnp ne puissent pas pénétrer au cœur même des sphéroïdes, expliquant partiellement l'impact limité des CPnp sur la croissance de ceux-ci. L'évolution du modèle, ou le choix d'un type cellulaire différent, ou même le travail sur une tumeur issue d'une biopsie pourrait permettre de remédier à ce problème, ou éventuellement de prouver que celui-ci est spécifique des cellules utilisées ici, les Huh7. Dans le cadre de l'étude des sphéroïdes, mais également lors du traitement de tumeurs sous-cutanées, l'éventualité de pouvoir injecter les CPnp directement au cœur de la tumeur et non pas de les diluer au milieu périphérique pourrait également être intéressante.

L'évaluation *in vivo* par injection intra-tumorale d'une dose de nanoparticules correspondant à 10 µg de siRNA dans un modèle de tumeur sous-cutanée Huh7Luc a permis de valider la fonctionnalisation des CPnp avec l'ICG, agent d'imagerie. Cette approche a par ailleurs confirmé que l'injection en dose unique, quelle qu'elle soit, est insuffisante à inhiber l'expression de la luciférase dans les cellules tumorales prolifératives utilisées. Les futures évaluations *in vivo* cibleront, de façon plus pertinente, l'inhibition de la croissance tumorale avec des CPnp enrobées de siRNA dirigés contre des oncogènes tels ceux mis en évidence dans le modèle de prolifération cellulaire 3D. La biodistribution des CPnp dans un modèle murin de tumeur hépatique suite à l'injection i.v. rétro-orbitale de CPnp ICG montre une localisation initiale des CPnp dans le foie. Cependant, en quelques heures, elles passent dans les intestins par la voie

hépatobiliaire, et sont éliminées en moins de 24 h. De plus, aucune colocalisation entre les CPnp et la tumeur n'a été objectivée. Le développement de molécules de ciblage pertinentes devrait permettre d'orienter la biodistribution des nanoparticules, mais également de ralentir leur élimination. Pour cela, il pourrait être opportun de prendre exemple sur les ciblage existant naturellement. Ainsi, nous avons vu auparavant la façon dont le HCV approche les hépatocytes avant même d'interagir avec les facteurs d'entrée. De la même manière, le ralentissement et la sortie des cellules immunitaires du flux circulant vers les tissus (rolling et diapédèse) est un mécanisme qu'il pourrait être intéressant d'imiter. Celui-ci nécessite cependant l'interaction avec différents récepteurs, et il sera important de s'assurer que le ciblage ajouté en surface des nanoparticules ne change pas leurs propriétés.

Il sera également intéressant d'étudier *in vivo* l'impact d'une troisième couche de siRNA sur les CPnp (CPnp(PEIPyr/siRNA)<sub>3</sub>). En effet, celles-ci sont plus toxiques *in vitro*, probablement du fait de l'effet off-target des siRNA, mais en variant les siRNA, ces nanoparticules pourraient permettre de prolonger d'autant la durée d'action du traitement. Il est cependant indispensable auparavant d'améliorer la biodistribution, afin de « laisser une chance » aux CPnp d'atteindre leur site-cible et d'entrer dans les cellules.

Il sera également important à court terme, d'étudier l'impact des CPnp sur le système immunitaire *in vivo*. En effet, comme mentionné dans l'introduction, les siRNA peuvent activer le système immunitaire, principalement inné. Il conviendra d'examiner la possibilité d'activation du système immunitaire contre les CPnp et l'effet délétère/bénéfique de celle-ci sur le traitement. En particulier, la production d'interférons lors de la reconnaissance des siRNA par le système des TLR est des plus intéressantes, notamment dans le cadre des cancers. En effet, les interférons de type I ont pour effet d'activer la réponse immunitaire adaptative, et pourraient ainsi associer l'effet direct des CPnp au déclenchement d'une « pseudo-immunothérapie ». Pour étudier cela, il sera important de travailler dans des lignées murines immunocompétentes, contrairement à celles utilisées ici.

Pour conclure, les CPnp sont des vecteurs particulièrement intéressants et prometteurs, notamment par leur grande versatilité. La possibilité d'y ajouter des molécules de ciblage, ainsi que des agents d'imagerie, permettant leur suivi *in vitro* et *in vivo*, fait de ce vecteur un outil théranostique, ouvrant la voie à de multiples applications de ces nanoparticules.

---

# Bibliographie

---

1. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289 (1990).
2. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**, 3343–3353 (1992).
3. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
4. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
5. Montgomery, M. K., Xu, S. & Fire, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15502–15507 (1998).
6. Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **286**, 950–952 (1999).
7. Pasquinelli, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
8. Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
9. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296 (2000).
10. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
11. Jinek, M. & Doudna, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405–412 (2009).
12. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655 (2009).
13. Gavrillov, K. & Saltzman, W. M. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J. Biol. Med.* **85**, 187–200 (2012).
14. Scholz, C. & Wagner, E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers. *J. Controlled Release* **161**, 554–565 (2012).
15. Behlke, M. A. Progress towards in Vivo Use of siRNAs. *Mol. Ther.* **13**, 644–670 (2006).
16. Guo, P. *et al.* Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 650–666 (2010).
17. Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635–637 (2003).
18. Birmingham, A. *et al.* 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* **3**, 199–204 (2006).
19. Jackson, A. L. *et al.* Widespread siRNA 'off-target' transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* **12**, 1179–1187 (2006).
20. Aagaard, L. & Rossi, J. J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 75–86 (2007).

21. Hornung, V. *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270 (2005).
22. Judge, A. D. *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* **23**, 457–462 (2005).
23. Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Polak, K., Fligier, A. & Krzyzosiak, W. J. RNAimmuno: A database of the nonspecific immunological effects of RNA interference and microRNA reagents. *RNA* **18**, 930–935 (2012).
24. Heil, F. *et al.* Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).
25. Diebold, S. S. *et al.* Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur. J. Immunol.* **36**, 3256–3267 (2006).
26. Robbins, M. *et al.* Misinterpreting the Therapeutic Effects of Small Interfering RNA Caused by Immune Stimulation. *Hum. Gene Ther.* **19**, 991–999 (2008).
27. Akira, S. & Takeda, K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* **327**, 581–589 (2004).
28. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005).
29. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376 (2003).
30. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
31. Kleinman, M. E. *et al.* Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* **452**, 591–597 (2008).
32. Yamamoto, M. *et al.* Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
33. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
34. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
35. Yoneyama, M. *et al.* Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* **175**, 2851–2858 (2005).
36. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).
37. Marques, J. T. *et al.* A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **24**, 559–565 (2006).
38. Robbins, M., Judge, A. & MacLachlan, I. siRNA and Innate Immunity. *Oligonucleotides* **19**, 89–102 (2009).
39. Juliano, R., Bauman, J., Kang, H. & Ming, X. Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Mol. Pharm.* **6**, 686–695 (2009).
40. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
41. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505–515 (2008).
42. Jason, T. L. H., Koropatnick, J. & Berg, R. W. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **201**, 66–83 (2004).

43. Dominska, M. & Dykxhoorn, D. M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J. Cell Sci.* **123**, 1183–1189 (2010).
44. Choung, S., Kim, Y. J., Kim, S., Park, H.-O. & Choi, Y.-C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 919–927 (2006).
45. Kawasaki, A. M. *et al.* Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* **36**, 831–841 (1993).
46. Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H. & Eckstein, F. Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* **253**, 314–317 (1991).
47. Elmén, J. *et al.* Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* **33**, 439–447 (2005).
48. Chen, P. Y. *et al.* Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA New York N* **14**, 263–274 (2008).
49. Mook, O. R., Baas, F., de Wissel, M. B. & Fluiter, K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 833–843 (2007).
50. Overhoff, M. & Sczakiel, G. Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep.* **6**, 1176–1181 (2005).
51. Stessl, M. *et al.* A proteomic study reveals unspecific apoptosis induction and reduction of glycolytic enzymes by the phosphorothioate antisense oligonucleotide oblimersen in human melanoma cells. *J. Proteomics* **72**, 1019–1030 (2009).
52. Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Ramsay Shaw, B. & Alexander, K. A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5991–6000 (2004).
53. Ui-Tei, K. *et al.* Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2136–2151 (2008).
54. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P. & Unverzagt, C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 4975–4977 (2004).
55. Guo, S., Huang, F. & Guo, P. Construction of folate-conjugated pRNA of bacteriophage phi29 DNA packaging motor for delivery of chimeric siRNA to nasopharyngeal carcinoma cells. *Gene Ther.* **13**, 814–820 (2006).
56. Manoharan, M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 570–579 (2004).
57. Strapps, W. R. *et al.* The siRNA sequence and guide strand overhangs are determinants of in vivo duration of silencing. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4788–4797 (2010).
58. Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199–213 (2002).
59. Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326–330 (2004).
60. Pushparaj, P. N., Aarthi, J. J., Manikandan, J. & Kumar, S. D. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo Applications. *J. Dent. Res.* **87**, 992–1003 (2008).

61. Harborth, J. *et al.* Sequence, Chemical, and Structural Variation of Small Interfering RNAs and Short Hairpin RNAs and the Effect on Mammalian Gene Silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **13**, 83–105 (2003).
62. Lee, S. H., Kim, S. H. & Park, T. G. Intracellular siRNA delivery system using polyelectrolyte complex micelles prepared from VEGF siRNA-PEG conjugate and cationic fusogenic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 511–516 (2007).
63. Golzio, M. *et al.* In vivo gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther.* **14**, 752–759 (2007).
64. Romano, P. R., McCallus, D. E. & Pachuk, C. J. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**, 3857–3865 (2006).
65. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
66. Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 145–150 (2008).
67. Brandenberger, C. *et al.* Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **242**, 56–65 (2010).
68. Chen, L., Mccrate, J. M., Lee, J. C.-M. & Li, H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology* **22**, 105708 (2011).
69. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 5577 (2012). doi:10.2147/IJN.S36111
70. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
71. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release* **145**, 182–195 (2010).
72. Pérez-Martínez, F. C., Guerra, J., Posadas, I. & Ceña, V. Barriers to Non-Viral Vector-Mediated Gene Delivery in the Nervous System. *Pharm. Res.* **28**, 1843–1858 (2011).
73. Parton, R. G. Caveolae Meet Endosomes: A Stable Relationship? *Dev. Cell* **7**, 458–460 (2004).
74. Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 185–194 (2007).
75. Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S. & Altschuler, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 26–32 (2007).
76. Yim, H., Park, S., Bae, Y. H. & Na, K. Biodegradable cationic nanoparticles loaded with an anticancer drug for deep penetration of heterogeneous tumours. *Biomaterials* (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.058
77. Stylianopoulos, T., Soteriou, K., Fukumura, D. & Jain, R. K. Cationic Nanoparticles Have Superior Transvascular Flux into Solid Tumors: Insights from a Mathematical Model. *Ann. Biomed. Eng.* **41**, 68–77 (2013).
78. Kostarelou, K. *et al.* Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *Int. J. Cancer* **112**, 713–721 (2004).
79. Leroueil, P. R. *et al.* Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers. *Nano Lett.* **8**, 420–424 (2008).
80. Yim, H. & Na, K. Polycationic Nanodrug Covered with Hyaluronic Acid for Treatment of P-Glycoprotein Overexpressing Cancer Cells. *Biomacromolecules* **11**, 2387–2393 (2010).

81. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I. & Nel, A. E. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* **2**, 85–96 (2008).
82. Ding, L. *et al.* Insight into the Mechanism of Antimicrobial Poly(phenylene ethynylene) Polyelectrolytes: Interactions with Phosphatidylglycerol Lipid Membranes†† *Langmuir* 25th Year: Molecular and macromolecular self-assemblies. *Langmuir* **25**, 13742–13751 (2009).
83. Zhou, J. *et al.* Biodegradable poly(amine-co-ester) terpolymers for targeted gene delivery. *Nat. Mater.* **11**, 82–90 (2012).
84. Florence, A. T., Hillery, A. M., Hussain, N. & Jani, P. U. Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: Studies on particle uptake and fate. *J. Controlled Release* **36**, 39–46 (1995).
85. Swartz, M. A. The physiology of the lymphatic system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, 3–20 (2001).
86. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
87. Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S. & Devoisselle, J.-M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomed.* **1**, 157–168 (2006).
88. Kulkarni, S. A. & Feng, S.-S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharm. Res.* 1–11 (2013). doi:10.1007/s11095-012-0958-3
89. Lockman, P. R. *et al.* Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *J. Controlled Release* **93**, 271–282 (2003).
90. Doshi, N. & Mitragotri, S. Macrophages Recognize Size and Shape of Their Targets. *PLoS ONE* **5**, e10051 (2010).
91. Best, J. P., Yan, Y. & Caruso, F. The Role of Particle Geometry and Mechanics in the Biological Domain. *Adv. Healthc. Mater.* **1**, 35–47 (2012).
92. Qiu, Y. *et al.* Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **31**, 7606–7619 (2010).
93. Albanese, A., Tang, P. S. & Chan, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14**, 1–16 (2012).
94. Chithrani, B. D. & Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **7**, 1542–1550 (2007).
95. Hutter, E. *et al.* Microglial Response to Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 2595–2606 (2010).
96. Wang, J., Tian, S., Petros, R. A., Napier, M. E. & DeSimone, J. M. The Complex Role of Multivalency in Nanoparticles Targeting the Transferrin Receptor for Cancer Therapies. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11306–11313 (2010).
97. Owens III, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **307**, 93–102 (2006).
98. Fadeel, B. Clear and present danger? *Swiss Med. Wkly.* (2012). doi:10.4414/smw.2012.13609
99. Smart, T. P., Mykhaylyk, O. O., Ryan, A. J. & Battaglia, G. Polymersomes hydrophilic brush scaling relations. *Soft Matter* **5**, 3607–3610 (2009).

100. Khopade, A. J. & Caruso, F. Stepwise Self-Assembled Poly(amidoamine) Dendrimer and Poly(styrenesulfonate) Microcapsules as Sustained Delivery Vehicles. *Biomacromolecules* **3**, 1154–1162 (2002).
101. Tan, S. J., Kiatwuthinon, P., Roh, Y. H., Kahn, J. S. & Luo, D. Engineering Nanocarriers for siRNA Delivery. *Small* **7**, 841–856 (2011).
102. Torchilin, V. P., Shtilman, M. I., Trubetskoy, V. S., Whiteman, K. & Milstein, A. M. Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1195**, 181–184 (1994).
103. Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 71–79 (2013).
104. Blanco, E. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects. *Cancer Sci.* **102**, 1247–1252 (2011).
105. Ross, J. F., Chaudhuri, P. K. & Ratnam, M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* **73**, 2432–2443 (1994).
106. Soutschek, J. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**, 173–178 (2004).
107. Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663–700 (1986).
108. Gallagher, F. A. *et al.* Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labelled bicarbonate. *Nature* **453**, 940–943 (2008).
109. Park, I.-K. *et al.* pH-Responsive Polymers as Gene Carriers. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 1122–1133 (2010).
110. Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7297–7301 (1995).
111. Neu, M., Fischer, D. & Kissel, T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J. Gene Med.* **7**, 992–1009 (2005).
112. Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethyleneimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 268–275 (1999).
113. Tang, M. X. & Szoka, F. C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* **4**, 823–832 (1997).
114. Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P. & Behr, J.-P. Towards synthetic viruses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 245–253 (2001).
115. Günther, M. *et al.* Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 438–449 (2011).
116. Janib, S. M., Moses, A. S. & MacKay, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1052–1063 (2010).
117. Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R. & Tsourkas, A. Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science* **338**, 903–910 (2012).
118. Briley-Saebo, K. C. *et al.* Gadolinium mixed-micelles: effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* **56**, 1336–1346 (2006).

119. Cheng, Z., Thorek, D. L. J. & Tsourkas, A. Gadolinium-conjugated dendrimer nanoclusters as a tumor-targeted T1 magnetic resonance imaging contrast agent. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 346–350 (2010).
120. Zou, P. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanotheranostics for targeted cancer cell imaging and pH-dependent intracellular drug release. *Mol. Pharm.* **7**, 1974–1984 (2010).
121. Li, Y. *et al.* A novel size-tunable nanocarrier system for targeted anticancer drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **144**, 314–323 (2010).
122. Filippini, L. & Sutherland, D. Nanotechnology: a brief introduction. at <<http://www.nanocap.eu/Flex/Site/Download07ab.pdf?ID=2256>>
123. Kreuter, J. Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **19**, 253–256 (1994).
124. Auffan, M. *et al.* Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 634–641 (2009).
125. Prijic, S. & Sersa, G. Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiol. Oncol.* **45**, 1–16 (2011).
126. Chen, J. & Xie. Progress on RNAi-based molecular medicines. *Int. J. Nanomedicine* 3971 (2012). doi:10.2147/IJN.S31897
127. Shegokar, R., Al Shaal, L. & Mishra, P. R. SiRNA delivery: challenges and role of carrier systems. *Pharm.* **66**, 313–318 (2011).
128. Singh, S. Nanomaterials as Non-viral siRNA Delivery Agents for Cancer Therapy. (2013). at <<http://bi.tbzmed.ac.ir/Portals/0/BI-2013/Singh-BioImpacts-2013.pdf>>
129. Webster, D. M., Sundaram, P. & Byrne, M. E. Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**, 1–20 (2013).
130. Matsumoto, S. *et al.* Environment-Responsive Block Copolymer Micelles with a Disulfide Cross-Linked Core for Enhanced siRNA Delivery. *Biomacromolecules* **10**, 119–127 (2009).
131. Benoit, D. S. W., Henry, S. M., Shubin, A. D., Hoffman, A. S. & Stayton, P. S. pH-Responsive Polymeric siRNA Carriers Sensitize Multidrug Resistant Ovarian Cancer Cells to Doxorubicin via Knockdown of Polo-like Kinase 1. *Mol. Pharm.* **7**, 442–455 (2010).
132. Kesharwani, P., Gajbhiye, V. & Jain, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials* **33**, 7138–7150 (2012).
133. Gillies, E. R., Dy, E., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Biological Evaluation of Polyester Dendrimer: Poly(ethylene oxide) ‘Bow-Tie’ Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture. *Mol. Pharm.* **2**, 129–138 (2005).
134. Kim, Y.-M., Park, M.-R. & Song, S.-C. Injectable Polyplex Hydrogel for Localized and Long-Term Delivery of siRNA. *ACS Nano* **6**, 5757–5766 (2012).
135. Suh, J., Paik, H. J. & Hwang, B. K. Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's. *Bioorganic Chem.* **22**, 318–327 (1994).
136. Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 581–593 (2005).
137. Jiang, G., Park, K., Kim, J., Kim, K. S. & Hahn, S. K. Target Specific Intracellular Delivery of siRNA/PEI–HA Complex by Receptor Mediated Endocytosis. *Mol. Pharm.* **6**, 727–737 (2009).
138. Park, M. R. *et al.* Highly efficient gene transfer with degradable poly(ester amine) based on poly(ethylene glycol) diacrylate and polyethylenimine in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* **10**, 198–207 (2008).

139. Krebs, M. D., Jeon, O. & Alsberg, E. Localized and Sustained Delivery of Silencing RNA from Macroscopic Biopolymer Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9204–9206 (2009).
140. Han, H. D. *et al.* Chitosan hydrogel for localized gene silencing. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 839–845 (2011).
141. Prato, M., Kostarelos, K. & Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Design and Discovery. *Accounts Chem. Res.* **41**, 60–68 (2008).
142. Liu, M. *et al.* Polyamidoamine-Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes for Gene Delivery: Synthesis, Transfection and Intracellular Trafficking. *Bioconjug. Chem.* **22**, 2237–2243 (2011).
143. Bussy, C., Ali-Boucetta, H. & Kostarelos, K. Safety Considerations for Graphene: Lessons Learnt from Carbon Nanotubes. *Accounts Chem. Res.* **46**, 692–701 (2013).
144. Giljohann, D. A. *et al.* Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3280–3294 (2010).
145. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Prigodich, A. E., Patel, P. C. & Mirkin, C. A. Gene Regulation with Polyvalent siRNA–Nanoparticle Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2072–2073 (2009).
146. Singha, K., Namgung, R. & Kim, W. J. Polymers in Small-Interfering RNA Delivery. *Nucleic Acid Ther. Former. Oligonucleotides* **21**, 133–147 (2011).
147. Elbakry, A. *et al.* Layer-by-Layer Assembled Gold Nanoparticles for siRNA Delivery. *Nano Lett.* **9**, 2059–2064 (2009).
148. Lee, Y. *et al.* Charge-Conversion Ternary Polyplex with Endosome Disruption Moiety: A Technique for Efficient and Safe Gene Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 5163–5166 (2008).
149. Trewyn, B. G., Giri, S., Slowing, I. I. & Lin, V. S.-Y. Mesoporous silica nanoparticle based controlled release, drug delivery, and biosensor systems. *Chem. Commun.* 3236–3245 (2007). doi:10.1039/B701744H
150. Hom, C., Lu, J. & Tamanoi, F. Silica nanoparticles as a delivery system for nucleic acid-based reagents. *J. Mater. Chem.* **19**, 6308–6316 (2009).
151. Xia, T. *et al.* Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano* **3**, 3273–3286 (2009).
152. Pons, T. & Mattoussi, H. Investigating Biological Processes at the Single Molecule Level Using Luminescent Quantum Dots. *Ann. Biomed. Eng.* **37**, 1934–1959 (2009).
153. Li, J.-M. *et al.* Multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery for HPV18 E6 gene silencing and intracellular imaging. *Biomaterials* **32**, 7978–7987 (2011).
154. Subramaniam, P. *et al.* Generation of a Library of Non-Toxic Quantum Dots for Cellular Imaging and siRNA Delivery. *Adv. Mater.* **24**, 4014–4019 (2012).
155. Mok, H. *et al.* pH-Sensitive siRNA Nanovector for Targeted Gene Silencing and Cytotoxic Effect in Cancer Cells. *Mol. Pharm.* **7**, 1930–1939 (2010).
156. Tabaković, A., Kester, M. & Adair, J. H. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 96–112 (2012).
157. Barth, B. M. *et al.* Bioconjugation of Calcium Phosphosilicate Composite Nanoparticles for Selective Targeting of Human Breast and Pancreatic Cancers In Vivo. *ACS Nano* **4**, 1279–1287 (2010).

158. Neumeier, M., Hails, L. A., Davis, S. A., Mann, S. & Epple, M. Synthesis of fluorescent core-shell hydroxyapatite nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **21**, 1250–1254 (2011).
159. Li, J., Chen, Y.-C., Tseng, Y.-C., Mozumdar, S. & Huang, L. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. *J. Controlled Release* **142**, 416–421 (2010).
160. Sokolova, V. *et al.* An outer shell of positively charged poly(ethyleneimine) strongly increases the transfection efficiency of calcium phosphate/DNA nanoparticles. *J. Mater. Sci.* **45**, 4952–4957 (2010).
161. Hu, J. *et al.* A new tool for the transfection of corneal endothelial cells: Calcium phosphate nanoparticles. *Acta Biomater.* **8**, 1156–1163 (2012).
162. Creusat, G. & Zuber, G. Tyrosine-modified PEI: A novel and highly efficient vector for siRNA delivery in mammalian cells. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 91–92 (2008).
163. Creusat, G. & Zuber, G. Self-Assembling Polyethylenimine Derivatives Mediate Efficient siRNA Delivery in Mammalian Cells. *ChemBioChem* **9**, 2787–2789 (2008).
164. Bukh, J., Miller, R. H. & Purcell, R. H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* **15**, 41–63 (1995).
165. Simmonds, P. *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* **74** ( Pt 11), 2391–2399 (1993).
166. Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362 (1989).
167. Alter, H. J. *et al.* Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* **2**, 838–841 (1975).
168. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767–770 (1975).
169. Pawlotsky, J.-M. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**, 587–592 (2003).
170. Simmonds, P. in *Hepat. C Virus Mol. Virol. Antivir. Ther.* (Bartenschlager, R.) **369**, 1–15 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
171. Thomas, D. L. Hepatitis C epidemiology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **242**, 25–41 (2000).
172. Kapoor, A. *et al.* Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11608–11613 (2011).
173. Burbelo, P. D. *et al.* Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J. Virol.* **86**, 6171–6178 (2012).
174. Zoulim, F., Chevallier, M., Maynard, M. & Trepo, C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev. Med. Virol.* **13**, 57–68 (2003).
175. Haberstroh, A. *et al.* Neutralizing Host Responses in Hepatitis C Virus Infection Target Viral Entry at Postbinding Steps and Membrane Fusion. *Gastroenterology* **135**, 1719–1728.e1 (2008).
176. Zeisel, M. B., Cosset, F.-L. & Baumert, T. F. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **48**, 299–307 (2008).
177. Von Hahn, T. *et al.* Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology* **132**, 667–678 (2007).

178. Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2436 (2007).
179. Hatzakis, A. *et al.* The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference\*. *J. Viral Hepat.* **18**, 1–16 (2011).
180. Hoofnagle, J. H. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* **26**, 15S–20S (1997).
181. Neumann, A. U. *et al.* Hepatitis C Viral Dynamics in Vivo and the Antiviral Efficacy of Interferon- $\alpha$  Therapy. *Science* **282**, 103–107 (1998).
182. Brown, R. S. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* **436**, 973–978 (2005).
183. Watt, K., Veldt, B. & Charlton, M. A Practical Guide to the Management of HCV Infection Following Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* **9**, 1707–1713 (2009).
184. Tai, A. W. & Chung, R. T. Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response. *J. Hepatol.* **50**, 412–420 (2009).
185. Taliani, G. *et al.* Pegylated Interferon Alfa-2b Plus Ribavirin in the Retreatment of Interferon-Ribavirin Nonresponder Patients. *Gastroenterology* **130**, 1098–1106 (2006).
186. Munir, S. *et al.* Hepatitis C Treatment: current and future perspectives. *Viol. J.* **7**, 296 (2010).
187. Hézode, C. *et al.* Telaprevir and Peginterferon with or without Ribavirin for Chronic HCV Infection. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1839–1850 (2009).
188. Sarrazin, C., Hézode, C., Zeuzem, S. & Pawlotsky, J.-M. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **56**, Supplement 1, S88–S100 (2012).
189. Lok, A. S. *et al.* Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1. *N. Engl. J. Med.* **366**, 216–224 (2012).
190. Zeisel, M. B., Lupberger, J., Fofana, I. & Baumert, T. F. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C – Perspectives and challenges. *J. Hepatol.* **58**, 375–384 (2013).
191. Kaito, M. *et al.* Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* **75**, 1755–1760 (1994).
192. Lindenbach, B. D. in *Hepat. C Virus Mol. Virol. Antivir. Ther.* (Bartenschlager, R.) **369**, 199–218 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
193. André, P. *et al.* Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J. Virol.* **76**, 6919–6928 (2002).
194. Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 453–463 (2007).
195. Astier-Gin, T., Bellecave, P., Litvak, S. & Ventura, M. Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA. *FEBS J.* **272**, 3872–3886 (2005).
196. Moradpour, D. & Penin, F. in *Hepat. C Virus Mol. Virol. Antivir. Ther.* (Bartenschlager, R.) **369**, 113–142 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
197. McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21**, 3980–3988 (2002).
198. Miyanari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–1097 (2007).

199. Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F. & Dubuisson, J. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J. Virol.* **74**, 3623–3633 (2000).
200. Lavillette, D. *et al.* Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 8752–8765 (2007).
201. Weiner, A. J. *et al.* Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180**, 842–848 (1991).
202. Penin, F. *et al.* Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J. Virol.* **75**, 5703–5710 (2001).
203. Steinmann, E. *et al.* Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* **3**, e103 (2007).
204. Luik, P. *et al.* The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12712–12716 (2009).
205. Hahn, T. von & Rice, C. M. Hepatitis C Virus Entry. *J. Biol. Chem.* **283**, 3689–3693 (2008).
206. Barth, H. *et al.* Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* **278**, 41003–41012 (2003).
207. Germi, R. *et al.* Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J. Med. Virol.* **68**, 206–215 (2002).
208. Barth, H. *et al.* Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *J. Virol.* **80**, 10579–10590 (2006).
209. Hishiki, T. *et al.* Infectivity of Hepatitis C Virus Is Influenced by Association with Apolipoprotein E Isoforms. *J. Virol.* **84**, 12048–12057 (2010).
210. Burlone, M. E. & Budkowska, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* **90**, 1055–1070 (2009).
211. Costa, D. D. *et al.* Reconstitution of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Nonhepatic Cells. *J. Virol.* **86**, 11919–11925 (2012).
212. Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J. Gen. Virol.* **87**, 1075–1084 (2006).
213. Cai, L., Ji, A., de Beer, F. C., Tannock, L. R. & van der Westhuyzen, D. R. SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J. Clin. Invest.* **118**, 364–375 (2008).
214. Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002).
215. Wüstner, D., Mondal, M., Huang, A. & Maxfield, F. R. Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells. *J. Lipid Res.* **45**, 427–437 (2004).
216. Meuleman, P. *et al.* A Human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**, 364–372 (2012).
217. Martin, F. *et al.* Tetraspanins in Viral Infections: a Fundamental Role in Viral Biology? *J. Virol.* **79**, 10839–10851 (2005).

218. Pileri, P. *et al.* Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
219. Zhang, Y.-Y., Zhang, B.-H., Ishii, K. & Liang, T. J. Novel Function of CD81 in Controlling Hepatitis C Virus Replication. *J. Virol.* **84**, 3396–3407 (2010).
220. Mee, C. J. *et al.* Polarization Restricts Hepatitis C Virus Entry into HepG2 Hepatoma Cells. *J. Virol.* **83**, 6211–6221 (2009).
221. Brimacombe, C. L. *et al.* Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* **85**, 596–605 (2010).
222. Meuleman, P. *et al.* Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* **48**, 1761–1768 (2008).
223. Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. & Bazzoni, G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 646–659 (2008).
224. Yang, W. *et al.* Correlation of the Tight Junction-like Distribution of Claudin-1 to the Cellular Tropism of Hepatitis C Virus. *J. Biol. Chem.* **283**, 8643–8653 (2008).
225. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
226. Fofana, I. *et al.* Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 953–964.e4 (2010).
227. Meertens, L. *et al.* The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *J. Virol.* **82**, 3555–3560 (2008).
228. Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).
229. Mee, C. J. *et al.* Effect of Cell Polarization on Hepatitis C Virus Entry. *J. Virol.* **82**, 461–470 (2008).
230. Rao, R. Occludin Phosphorylation in Regulation of Epithelial Tight Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**, 62–68 (2009).
231. Butt, A. M. *et al.* Computational identification of interplay between phosphorylation and O- $\beta$ -glycosylation of human occludin as potential mechanism to impair hepatitis C virus entry. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 1235–1245 (2012).
232. Lupberger, J. *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* **17**, 589–595 (2011).
233. Zeisel, M. B., Felmlee, D. J. & Baumert, T. F. in *Hepat. C Virus Mol. Virol. Antivir. Ther.* (Bartenschlager, R.) **369**, 87–112 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
234. Tscherne, D. M. *et al.* Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. *J. Virol.* **80**, 1734–1741 (2006).
235. Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **67**, 3338–3344 (1993).
236. Randall, K. L. B. and G. Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Commun. Integr. Biol.* **2**, 471–473 (2009).
237. Berger, K. L. *et al.* Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7577–7582 (2009).
238. Kaul, A. *et al.* Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics. *PLoS Pathog.* **5**, e1000546 (2009).

239. Ma, Y. *et al.* Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J. Virol.* **85**, 86–97 (2011).
240. Huang, H. *et al.* Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5848–5853 (2007).
241. Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* **19**, 95–103 (2011).
242. Timpe, J. M. *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**, 17–24 (2008).
243. Rumin, S. *et al.* Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J. Gen. Virol.* **80**, 3007–3018 (1999).
244. Barth, H. *et al.* Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J. Virol.* **79**, 5774–5785 (2005).
245. Rosa, D. *et al.* A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 1759–1763 (1996).
246. Kachko, A. *et al.* New neutralizing antibody epitopes in hepatitis C virus envelope glycoproteins are revealed by dissecting peptide recognition profiles. *Vaccine* **30**, 69–77 (2011).
247. Bartenschlager, R., Lohmann, V. & Penin, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 482–496 (2013).
248. Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *J. Virol.* **72**, 3827–3836 (1998).
249. Steinmann, D. *et al.* Inhibition of Hepatitis C Virus-Like Particle Binding to Target Cells by Antiviral Antibodies in Acute and Chronic Hepatitis C. *J. Virol.* **78**, 9030–9040 (2004).
250. Elmowalid, G. A. *et al.* Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8427–8432 (2007).
251. Triyatni, M. *et al.* Interaction of Hepatitis C Virus-Like Particles and Cells: a Model System for Studying Viral Binding and Entry. *J. Virol.* **76**, 9335–9344 (2002).
252. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* **197**, 633–642 (2003).
253. Bartosch, B. *et al.* Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 41624–41630 (2003).
254. Lohmann, V. *et al.* Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285**, 110–113 (1999).
255. Pietschmann, T. *et al.* Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *J. Virol.* **76**, 4008–4021 (2002).
256. Lindenbach, B. D. *et al.* Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309**, 623–626 (2005).
257. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005).

258. Koutsoudakis, G. *et al.* Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J. Virol.* **80**, 5308–5320 (2006).
259. Lindenbach, B. D. *et al.* Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3805–3809 (2006).
260. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7408–7413 (2006).
261. Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**, 459–463 (1978).
262. Hollinger, F. B. *et al.* Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* **10**, 60–68 (1978).
263. Barth, H., Robinet, E., Liang, T. J. & Baumert, T. F. Mouse models for the study of HCV infection and virus–host interactions. *J. Hepatol.* **49**, 134–142 (2008).
264. Koike, K., Moriya, K. & Matsuura, Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol. Res.* **40**, 69–82 (2010).
265. Zhao, X. *et al.* Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.* **109**, 221–232 (2002).
266. Amako, Y. *et al.* Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virol.* **84**, 303–311 (2010).
267. Tong, Y. *et al.* *Tupaia* CD81, SR-BI, Claudin-1, and Occludin Support Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* **85**, 2793–2802 (2011).
268. Bukh, J. *et al.* Challenge Pools of Hepatitis C Virus Genotypes 1–6 Prototype Strains: Replication Fitness and Pathogenicity in Chimpanzees and Human Liver-Chimeric Mouse Models. *J. Infect. Dis.* **201**, 1381–1389 (2010).
269. Mercer, D. F. *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 927–933 (2001).
270. Law, M. *et al.* Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat. Med.* **14**, 25–27 (2007).
271. Vanwolleghem, T. *et al.* Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver–chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* **47**, 1846–1855 (2008).
272. Meuleman, P. & Leroux-Roels, G. The human liver-uPA-SCID mouse: A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res.* **80**, 231–238 (2008).
273. Bissig, K.-D. *et al.* Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J. Clin. Invest.* **120**, 924–930 (2010).
274. Mazurier, F. *et al.* A Novel Immunodeficient Mouse Model-RAG2 gamma Cytokine Receptor Chain Double Mutants-Requiring Exogenous Cytokine Administration for Human Hematopoietic Stem Cell Engraftment Common. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 533–541 (1999).
275. Washburn, M. L. *et al.* A Humanized Mouse Model to Study Hepatitis C Virus Infection, Immune Response, and Liver Disease. *Gastroenterology* **140**, 1334–1344 (2011).
276. Robinet, E. & Baumert, T. F. A first step towards a mouse model for hepatitis C virus infection containing a human immune system. *J. Hepatol.* **55**, 718–720 (2011).
277. Dorner, M. *et al.* A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**, 208–211 (2011).

278. Motavaf, M., Safari, S. & Alavian, S. M. Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **19**, 757–765 (2012).
279. Watanabe, T., Umehara, T. & Kohara, M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1263–1276 (2007).
280. Yokota, T. *et al.* Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **4**, 602–608 (2003).
281. Arzumanyan, A., Reis, H. M. G. P. V. & Feitelson, M. A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 123–135 (2013).
282. Venook, A. P., Papandreou, C., Furuse, J. & Guevara, L. L. de. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *The Oncologist* **15**, 5–13 (2010).
283. Rehmann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 215–229 (2005).
284. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
285. Hernandez-Gea, V., Toffanin, S., Friedman, S. L. & Llovet, J. M. Role of the Microenvironment in the Pathogenesis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **144**, 512–527 (2013).
286. Poon, R. T.-P. M. *et al.* Improving Survival Results After Resection of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study of 377 Patients Over 10 Years. *Ann. Surg. July 2001* **234**, 63–70 (2001).
287. Llovet, J. M. *et al.* Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 378–390 (2008).
288. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* **31**, 108–115 (2013).
289. Moroni, L., de Wijn, J. R. & van Blitterswijk, C. A. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **19**, 543–572 (2008).
290. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **21**, 3307–3329 (2009).
291. Klopp, A. H. *et al.* Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One* **5**, e12180 (2010).
292. Greco, K. V. *et al.* High density micromass cultures of a human chondrocyte cell line: a reliable assay system to reveal the modulatory functions of pharmacological agents. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1919–1929 (2011).
293. Rivron, N. C. *et al.* Tissue assembly and organization: developmental mechanisms in microfabricated tissues. *Biomaterials* **30**, 4851–4858 (2009).
294. Rivron, N. C. *et al.* Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4413–4418 (2012).
295. Bierwolf, J. *et al.* Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 141–150 (2011).
296. Want, A. J., Nienow, A. W., Hewitt, C. J. & Coopman, K. Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask. *Regen. Med.* **7**, 71–84 (2012).

297. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* **4** 140–143 (1907).
298. Tung, Y.-C. *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* **136**, 473–478 (2011).
299. Rivron, N. C. *et al.* Tissue deformation spatially modulates VEGF signaling and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6886–6891 (2012).
300. Napolitano, A. P., Chai, P., Dean, D. M. & Morgan, J. R. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue Eng.* **13**, 2087–2094 (2007).
301. Torisawa, Y. *et al.* Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device. *Lab. Chip* **7**, 770–776 (2007).
302. Dimitrova, M. *et al.* Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16320–16325 (2008).
303. Creusat, G. *et al.* Pyridylthiourea-grafted polyethylenimine offers an effective assistance to siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *J. Controlled Release* **157**, 418–426 (2012).
304. Yue, L., Christman, J. W. & Mazzone, T. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Suppression of Adipocyte Apolipoprotein E Gene Transcription: Primary Role for the Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B Pathway and NF B p50. *Endocrinology* **149**, 4051–4058 (2008).
305. Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858–3863 (1982).
306. Marshall, M. V. *et al.* Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update. *Open Surg. Oncol. J. Online* **2**, 12 (2010).
307. Polom, K. *et al.* Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer* **117**, 4812–4822 (2011).
308. Altinoğlu, E. I. *et al.* Near-Infrared Emitting Fluorophore-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for In Vivo Imaging of Human Breast Cancer. *ACS Nano* **2**, 2075–2084 (2008).
309. Rahn, B. & Perren, S. Alizarinkomplexon -- Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau. *Experientia* **180** (1972).
310. Sukhorukov, G. B., Montrel, M. M., Petrov, A. I., Shabarchina, L. I. & Sukhorukov, B. I. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 913–922 (1996).
311. Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **57**, 4814–4820 (1972).
312. La génomique en biologie végétale. at <<http://bibliothèque.immobilier.fr/fr/ebook/9782738011671/la-genomique-en-biologie-vegetale>>
313. Stratford, S. *et al.* Examination of real-time polymerase chain reaction methods for the detection and quantification of modified siRNA. *Anal. Biochem.* **379**, 96–104 (2008).
314. Colombo, S., Nielsen, H. M. & Foged, C. Evaluation of carrier-mediated siRNA delivery: Lessons for the design of a stem-loop qPCR-based approach for quantification of intracellular full-length siRNA. *J. Controlled Release* **166**, 220–226 (2013).

315. Meyer, F., Ball, V., Schaaf, P., Voegel, J. C. & Ogier, J. Polyplex-embedding in polyelectrolyte multilayers for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1758**, 419–422 (2006).
316. Richard, D. *et al.* Polyelectrolyte Multilayer-Mediated Gene Delivery for Semaphorin Signaling Pathway Control. *Small* **6**, 2405–2411 (2010).
317. Kao, H.-W. *et al.* 18F-FBHGal for asialoglycoprotein receptor imaging in a hepatic fibrosis mouse model. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 912–921 (2013).
318. Zheng, D. *et al.* Galactosylated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of oridonin. *Int. J. Pharm.* **436**, 379–386 (2012).
319. Chandra, P. K. *et al.* Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Intracellular Delivery of Multiple siRNAs by Nanosomes. *Mol. Ther.* **20**, 1724–1736 (2012).
320. Overhoff, M., Wünsche, W. & Sczakiel, G. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res.* **32**, e170–e170 (2004).
321. Khan, Z. & Bisen, P. S. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: Special reference to oral cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1836**, 123–145 (2013).
322. Duffy, M. J. The war on cancer: are we winning? *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 1275–1284 (2013).
323. Iuchi, T. *et al.* Phase II trial of gefitinib alone without radiation therapy for Japanese patients with brain metastases from EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* doi:10.1016/j.lungcan.2013.08.016
324. Oishi, M. *et al.* Enhanced Growth Inhibition of Hepatic Multicellular Tumor Spheroids by Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate Formulated in PEGylated Polyplexes. *ChemMedChem* **2**, 1290–1297 (2007).
325. Ho, D. N. Penetration of Endothelial Cell Coated Multicellular Tumor Spheroids by Iron Oxide Nanoparticles. *Theranostics* **2**, 66–75 (2012).
326. Ohmori, T., Yang, J.-L., Price, J. O. & Arteaga, C. L. Blockade of Tumor Cell Transforming Growth Factor- $\beta$ s Enhances Cell Cycle Progression and Sensitizes Human Breast Carcinoma Cells to Cytotoxic Chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **245**, 350–359 (1998).
327. Stalder, L. *et al.* The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *EMBO J.* **32**, 1115–1127 (2013).
328. Sainz, B. & Chisari, F. V. Production of Infectious Hepatitis C Virus by Well-Differentiated, Growth-Arrested Human Hepatoma-Derived Cells. *J. Virol.* **80**, 10253–10257 (2006).
329. Tenbaum, S. P. *et al.*  $\beta$ -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat. Med.* **18**, 892–901 (2012).
330. Samuels, Y. *et al.* Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* **7**, 561–573 (2005).
331. Ohmori, T., Yang, J.-L., Price, J. O. & Arteaga, C. L. Blockade of Tumor Cell Transforming Growth Factor- $\beta$ s Enhances Cell Cycle Progression and Sensitizes Human Breast Carcinoma Cells to Cytotoxic Chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **245**, 350–359 (1998).
332. Teeguarden, J. G., Hinderliter, P. M., Orr, G., Thrall, B. D. & Pounds, J. G. Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments. *Toxicol. Sci.* **95**, 300–312 (2007).

- 
333. Sutherland, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177–184 (1988).
334. Mellor, H. R. *et al.* Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J. Gene Med.* **8**, 1160–1170 (2006).
335. Minchinton, A. I. & Tannock, I. F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 583–592 (2006).
336. Goodman, T. T., Olive, P. L. & Pun, S. H. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 265–274 (2007).
337. McAllister, D. V., Allen, M. G. & Prausnitz, M. R. Microfabricated Microneedles for Gene and Drug Delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 289–313 (2000).
338. Landsman, M. L., Kwant, G., Mook, G. A. & Zijlstra, W. G. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J. Appl. Physiol.* **40**, 575–583 (1976).
339. Baratin, M. *et al.* Regression of primary hepatocarcinoma in cancer-prone transgenic mice by local interferon-gamma delivery is associated with macrophages recruitment and nitric oxide production. *Cancer Gene Ther.* **8**, 193–202 (2001).
340. Xiao, Z.-Y., Jia, J.-B., Chen, L., Zou, W. & Chen, X.-P. Phase I clinical trial of continuous infusion of tyrosuleutide in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **29**, 1850–1858 (2012).
341. Reebye, V. *et al.* A novel RNA oligonucleotide improves liver function and inhibits liver carcinogenesis in vivo. *Hepatol. Baltim. Md* (2013). doi:10.1002/hep.26669
342. Hsu, S. *et al.* Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* (2013). doi:10.1016/j.nano.2013.05.007
343. Hampl, V. *et al.* Depletion of the transcriptional coactivators megakaryoblastic leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1367–1382 (2013).
344. Wu, C. *et al.* An RGD-Modified MRI-Visible Polymeric Vector for Targeted siRNA Delivery to Hepatocellular Carcinoma in Nude Mice. *PLoS ONE* **8**, e66416 (2013).

# Annexes

---

## *Participation à d'autres travaux :*

### **Publication n°2 : Ultrathin, bioresponsive and drug-functionalized protein capsules.**

Damien Mertz, Huixi Wu, Jy Shyuan Wong, Jiwei Cui, Pramudana Tan, Roxane Alles and Frank Caruso. J. Mater. Chem., 2012, 22, 21434

Ce travail présente une méthode de synthèse de capsules protéiques ultrafines biocompatibles, stables mécaniquement et de petite taille (environ 200 nm), permettant la conservation des fonctions protéiques. Celles-ci sont obtenues par liaison covalente d'une couche de protéine immobilisée sur des particules de silice modifiées par des groupements bromoisobutyramide, puis par suppression de la base de silice. Ces capsules sont également aisément fonctionnalisables par ajout de doxorubicine, une molécule anticancéreuse, et permettent une libération en réponse à des stimuli biologiques. Tous ces éléments font de ces capsules protéiques un vecteur prometteur pour la « délivrance » de drogues ainsi que le ciblage cellulaire.

**Ma participation :** réalisation d'expériences complémentaires de cytométrie en flux participant à la caractérisation des capsules.

## Ultrathin, bioresponsive and drug-functionalized protein capsules†

Damien Mertz,<sup>a</sup> Huixi Wu,<sup>a</sup> Jy Shyuan Wong,<sup>a</sup> Jiwei Cui,<sup>a</sup> Pramudana Tan,<sup>a</sup> Roxane Alles<sup>b</sup> and Frank Caruso<sup>\*a</sup>

Received 11th June 2012, Accepted 23rd August 2012

DOI: 10.1039/c2jm33737a

This paper presents a versatile approach for the synthesis of ultrathin (*ca.* 10 nm thickness) and bioresponsive protein capsules. The protein capsules are obtained after covalent cross-linking with Lomant's reagent of a single protein layer immobilized onto bromoisobutyramide-modified silica particles, followed by template removal. The combination of protein immobilization and cross-linking steps, affords protein capsules with enhanced mechanical stability and permits the formation of smaller capsule sizes (*ca.* 200 nm size) without loss of protein biofunctionality, as demonstrated through enzymatic catalysis experiments. Furthermore, we show the facile functionalization of these protein capsules with an anticancer drug, doxorubicin, which is releasable upon exposure to biological stimuli either *via* reductive cytosolic conditions or protease degradation. These bioresponsive and functionalized protein capsules are likely to have potential in cell targeting, and as drug delivery vehicles and biocatalysts.

## Introduction

Biopolymer-functionalized films and coatings are useful platforms for the development of biocatalytic systems,<sup>1–4</sup> biosensors,<sup>5–9</sup> stimuli-responsive devices,<sup>10–15</sup> cell targeting<sup>16,17</sup> or drug delivery.<sup>18–20</sup> Assemblies such as self-assembled peptides,<sup>21–25</sup> polypeptide hydrogels<sup>26–28</sup> or layer-by-layer protein hollow capsules<sup>29–34</sup> have been reported as efficient systems to catalyze reactions, target specific ligands, or induce mechanotransductive processes. Other systems based on protein-based cages,<sup>35–39</sup> microspheres,<sup>40–44</sup> nanoparticles<sup>45–48</sup> or conjugates<sup>45,49,50</sup> have been used for the loading, conjugation and release of various therapeutic molecules. The variety of strategies employed demonstrates the growing interest to design multifunctional

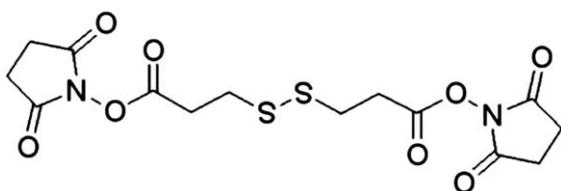
systems made of proteins or biopolymers aimed at biomedical applications. Recently, we reported a generalized method for the preparation of non-covalent, free-standing biopolymer architectures (including protein assemblies) based on bromoisobutyramide (BrIBAM) groups acting as intermolecular binders.<sup>51</sup> The process consists of the single-step adsorption of a biopolymer (*e.g.*, protein, nucleic acid or polysaccharide) onto silica templates chemically pre-modified with BrIBAM groups, followed by template removal to form hollow capsules, replicated spheres or fibers. The driving force for the formation of such architectures was demonstrated to result from non-covalent forces between the biopolymers and the BrIBAM moieties. However, these biomacromolecular capsules made *via* single-step coating displayed moderate mechanical stability. Additionally, the BrIBAM grafts did not efficiently bind low molecular weight drugs such as doxorubicin. Improved mechanical stability and control over drug loading and release are vital for next-generation drug delivery platforms.

Herein, we report the preparation of BrIBAM–protein capsules with enhanced mechanical stability *via* additional covalent cross-linking with dithiobis(succinimidyl propionate)<sup>52</sup> (Lomant's reagent abbreviated DSP, see Chart 1). DSP is a homo-bifunctional cross-linker with *N*-hydroxysuccinimide-ester (NHS) reactive ends. It reacts with amino residues such as lysine or arginine of the protein chains, which allow covalent bridging by forming amide bonds.<sup>52</sup> Moreover, this linker has a disulfide bridge, which is cleavable under reducing conditions and can be potentially exploited for responsiveness. The preparation of DSP–BrIBAM–protein capsules was investigated by employing five proteins: alkaline phosphatase (AP), insulin (INS), lysozyme (LYS), human serum albumin (HSA) and

<sup>a</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia. E-mail: fcaruso@unimelb.edu.au

<sup>b</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité U748, 67000 Strasbourg, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Wall thickness determination by AFM analysis (Fig. S1); effect of the DSP cross-linking on the size and wall thickness of BrIBAM–PLL capsules (Fig. S2); absorbance spectrum of PNP formation catalyzed by the DSP–BrIBAM–AP capsules (Fig. S3); DOX incubation within BrIBAM–HSA–MS with and without DSP cross-linking (Fig. S4); DOX release after incubation with GSH 5 mM (Fig. S5); DOX binding after incubation with amine scavengers (Fig. S6); DOX release *via* enzymatic degradation by proteases (Fig. S7). Tables: properties of the proteins employed (Table S1); effect of the DSP cross-linking on protein capsule size (Table S2) and wall thickness (Table S3); effect of the DSP cross-linking on PLL capsule size and wall thickness (Table S4); control experiments, DSP cross-linking of proteins without BrIBAM prelayer (Table S5); AFM analysis for INS and HSA submicron capsules (Table S6). See DOI: 10.1039/c2jm33737a



**Chart 1** Molecular structure of the homo-bifunctional cross-linker dithiobis(succinimidyl propionate), abbreviated DSP (or Lomant's reagent).

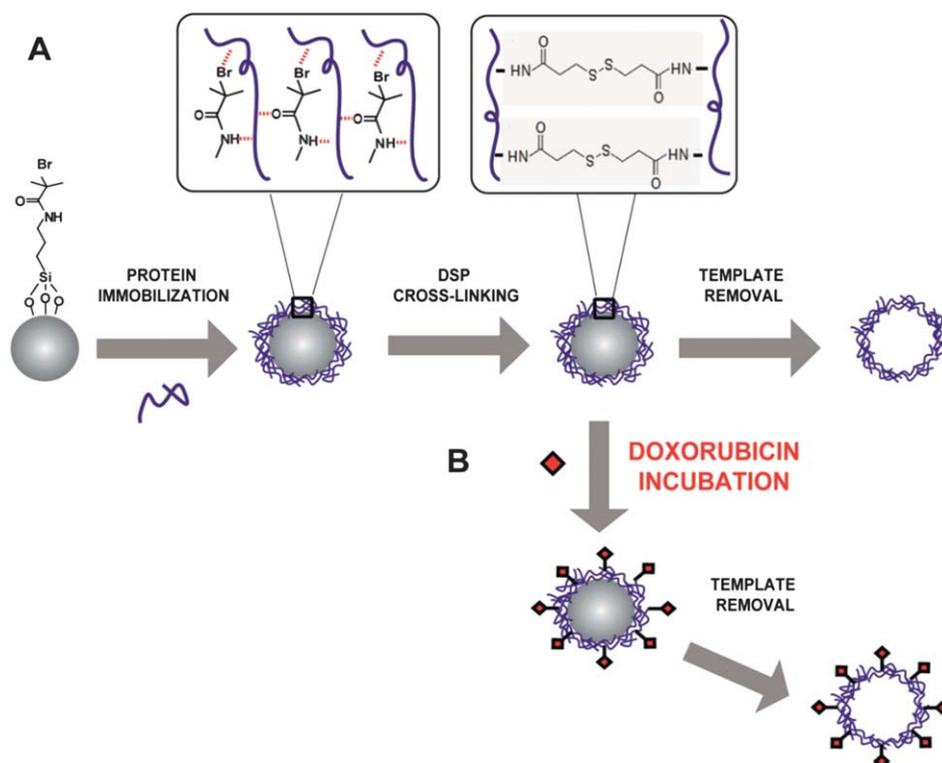
horseradish peroxidase (HRP) (see properties in Table S1†). The DSP covalent cross-linking is performed after immobilization of the proteins onto BrIBAM-modified silica particles, and after template removal, stabilized capsules made of these various proteins are formed (Fig. 1A). We demonstrate that compared to the protein capsules made from the BrIBAM-only approach, the additional DSP cross-linking leads to enhanced mechanical stability and dispersion of the protein capsules. Such a strategy is particularly advantageous to generate stable capsules prepared from a single protein coating step. Additionally, we show that DSP cross-linking allows their miniaturization as small as *ca.* 200 nm and preservation of their biological functionality (*e.g.*, enzymatic activity), demonstrating the potential of these systems for interaction with cells and for bioresponsiveness. Furthermore, the reported approach represents a simple way to post-

functionalize the protein capsules with biologically releasable doxorubicin (DOX) *via* incubation in a DOX solution (Fig. 1B).

## Experimental

### Materials

3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS), 2-bromoisobutryl bromide (BIB), ethanol (EtOH), *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), triethylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine B isothiocyanate (RITC), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sodium hydrogen-carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP), alkaline phosphatase (AP) from bovine intestinal mucosa, *para*-nitrophenylphosphate (PNP), insulin (INS) from bovine pancreas, lysozyme (LYS) from chicken egg white, human serum albumin (HSA), horseradish peroxidase (HRP), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), poly(ethylenimine) (PEI), poly(L-lysine hydrobromide) (PLL,  $M_w$  30–70 kDa), 11-azido-3,6,9-trioxadecane-1-amine (PEG-amine), L-glutathione reduced (GSH), DL-dithiothreitol (DTT) (1 M in water), protease from *Streptomyces griseus*, ethanolamine (ETA), and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were obtained from Sigma-Aldrich. Doxorubicin hydrochloride (DOX, purity 99%) was purchased from OChem Inc. (Des Plaines, IL). Nonporous silica particles of various sizes (5 wt% suspensions, average diameters: 5.35, 3.25, 1.11, 0.585, 0.304 and 0.147  $\mu\text{m}$ ) were obtained from Microparticles GmbH (Berlin, Germany). Mesoporous silica



**Fig. 1** (A) Assembly of DSP-cross-linked protein capsules. The first step of the process consists of a single-step adsorption of protein onto silica particles chemically modified with bromoisobutyramide (BrIBAM) non-covalent binders. The second step involves the covalent cross-linking of the immobilized proteins with DSP. Following template removal, ultrathin and mechanically stable protein capsules are formed. (B) Post-functionalization of DSP cross-linked protein capsules with DOX. Incubation of DOX with DSP-cross-linked BrIBAM-coated particles allows efficient binding of DOX. After template removal, DOX-functionalized protein capsules are formed.

(MS) particles (Separon SGX 1000, diameter 4.5  $\mu\text{m}$ , pore size 100 nm) were obtained from Tessek Ltd. (Czech Republic).

### Protein and PLL solutions

AP, INS, LYS, HSA, HRP and PLL (fluorescently labeled or not) were diluted to 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  in Milli Q water. PLL and LYS were diluted to 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 10) buffer.

### Fluorescent labeling of proteins and PLL

AP, INS and LYS were fluorescently labeled with RITC, while HSA, HRP and PLL were fluorescently labeled with FITC. A stoichiometry of 2 moles of fluorescent dye per mole of protein was employed. RITC and FITC were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at 10  $\text{mg mL}^{-1}$  and gently mixed with solutions of AP (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), INS (12.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ), LYS (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), HSA (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), HRP (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ) or PLL (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ) dissolved in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH 8.5). All of the proteins and the PLL were reacted for 1 h and were purified by size exclusion chromatography (SEC). SEC columns were equilibrated with Milli Q water (20 mL) and then loaded with the concentrated protein solutions. The solutions were then collected by eluting with Milli Q water and solutions of the fluorescently labeled proteins were stored in a freezer ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ).

### Assembly of BrIBAM–protein capsules

**Caution!** This method utilized HF, which is highly toxic and great care must be taken when handling. 200  $\mu\text{L}$  of silica templates (5 wt% nonporous silica particles or MS spheres) in EtOH were dispersed in a solution of EtOH (500  $\mu\text{L}$ ) containing ammonia (30  $\mu\text{L}$ ) and APTS (125  $\mu\text{L}$ ). After 2 h, the amino-modified templates were isolated *via* centrifugation and washed with EtOH (1  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ) and DMF (3  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ). A solution containing 2-bromoisobutyryl bromide (65  $\mu\text{L}$ ) in DMF (400  $\mu\text{L}$ ) was added dropwise to the amino-modified templates previously dispersed in a solution of DMF (400  $\mu\text{L}$ ) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (40  $\mu\text{L}$ ). After 2 h, Milli Q water (200  $\mu\text{L}$ ) was added to dissolve the precipitates formed and the resulting BrIBAM-coated particles were isolated *via* centrifugation and washed with DMF (3  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ). Chemically modified BrIBAM–silica particles dispersed in DMF (10  $\mu\text{L}$  at 5 wt%) were added to 100  $\mu\text{L}$  solutions of AP–RITC, INS–RITC, LYS–RITC, HSA–FITC, HRP–FITC, PLL–FITC, and allowed to stand for 30 min, followed by centrifugation and washing in Milli Q water (3  $\times$  100  $\mu\text{L}$ ). 1  $\mu\text{L}$  of the protein-coated particles (0.5 wt%) was deposited onto a PEI-coated slide (glass and silicon wafers) and brought into contact with 1  $\mu\text{L}$  of an ammonium fluoride ( $\text{NH}_4\text{F}$ , 8 M) buffered hydrofluoric acid (HF, 2 M) solution at pH 5 for 1 min, followed by extensive rinsing of the slide with Milli Q water.

### Assembly of DSP-covalently cross-linked BrIBAM–protein capsules

**Caution!** This method utilized HF, which is highly toxic and great care must be taken when handling. A DSP solution at 5  $\text{mg mL}^{-1}$  in DMF (15  $\mu\text{L}$ ) was added dropwise to the above fluorescently RITC- or FITC-labeled BrIBAM–protein silica particles (1 wt%) dispersed in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH 7.5) (45  $\mu\text{L}$ ). After 1 h,

the covalently cross-linked BrIBAM–protein particles were centrifuged and washed with 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH 7.5) (2  $\times$  90  $\mu\text{L}$ ). The DSP-covalently cross-linked BrIBAM–protein capsules were formed by dissolving the silica core templates using HF buffer ( $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$ , 8 M/2 M) at pH 5 for 1 min. At least three washing steps (1800g for 10 min), replacing the supernatant with fresh water, were applied to remove the HF buffer and isolate the capsules.

### Assembly of DSP-covalently cross-linked BrIBAM–HSA replicas

**Caution!** This method utilized HF which is highly toxic and great care must be taken when handling. BrIBAM-modified MS particles stored in DMF (10  $\mu\text{L}$  at 5 wt%) were dispersed in a 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  HSA solution (100  $\mu\text{L}$ ). After 30 min the particles were washed with Milli Q water (3  $\times$  100  $\mu\text{L}$ ). DSP cross-linking was performed as described above. A 1 wt% dispersion of the DSP-cross-linked BrIBAM HSA-coated MS particles in water (15  $\mu\text{L}$ ) was added to HF buffer ( $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$ , 8 M/2 M) at pH 5 for 1 min (150  $\mu\text{L}$ ). After 2 min the particles were isolated *via* centrifugation (1800g for 10 min) and washed with water (3  $\times$  20  $\mu\text{L}$ ) to afford homogeneous DSP-cross-linked BrIBAM HSA replicas, which were re-dispersed in water or PBS buffer.

### Measurement of enzymatic activity

The enzymatic activity of DSP–BrIBAM–AP capsules was detected by using *para*-nitrophenylphosphate (PNP) as a substrate. The PNP solution (1 mL) at 1.7  $\text{mg mL}^{-1}$  in 0.05 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH = 8.5) was brought in contact with the DSP–BrIBAM–AP capsules; the subsequent formation of *p*-nitrophenol (PN) and a phosphate ion by enzymatic conversion of PNP was followed by UV/Vis spectrophotometry at  $\lambda = 410\text{ nm}$  (maximum absorption). The enzymatic activity of DSP–BrIBAM–HRP capsules was detected by using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), a peroxidase substrate suitable for use in ELISA procedures. The ABTS solution (1 mL) at 1  $\text{mg mL}^{-1}$  in phosphate-citrate buffer (0.02 M, pH = 5.0) was brought in contact with the HRP capsules and the addition of hydrogen peroxide (20  $\mu\text{L}$ , 30 wt%) led to the green colored oxidized form of ABTS, which was followed by UV/Vis spectrophotometry (max absorption at  $\lambda = 420\text{ nm}$ ). The kinetics of the reaction was followed at  $\lambda = 405\text{ nm}$ .

### Doxorubicin conjugation

Doxorubicin solution (500  $\mu\text{L}$ ) at 0.1  $\text{mg mL}^{-1}$  in Milli Q water was incubated for 1 h with DSP-covalently cross-linked BrIBAM–HSA coated silica particles (100  $\mu\text{L}$  at 0.5 wt%) and abundantly washed with water to remove the loosely bound DOX. The procedure used is the same as that employed for incubation of DOX with DSP-covalently cross-linked BrIBAM–HSA-coated MS spheres. The formation of DOX-conjugated capsules and replicas was achieved after template removal with a similar protocol as described above.

## Doxorubicin release

To release the DOX from the protein capsules, DOX-functionalized DSP–BrIBAM–HSA capsules were incubated, respectively, with a DTT solution (0.5 M in PBS buffer, pH 7.2, 6 h), a GSH solution (5 mM in PBS buffer, pH 7.2, 3 h) and a protease solution (0.5 mg mL<sup>-1</sup> in PBS buffer at 37 °C, 3 h and 34 h). Control experiments were performed in PBS buffer with the same incubation periods.

## Characterizations methods

**Bright field and fluorescence microscopy.** Images of the non-cross-linked and DSP cross-linked BrIBAM–protein coated silica templates (non-porous and MS particles) and of the resulting protein capsules and replica spheres were taken using an Olympus IX71 inverted fluorescence microscope equipped with a DIC slider (U-DICT, Olympus), the corresponding filter sets, and a 60× oil immersion objective (Olympus UPFL20/0.5NA, W.D. 1.6). Analysis of the capsule size was performed using the Image Pro software.

**Atomic force microscopy (AFM).** The imaged protein capsules were deposited onto PEI-coated silicon wafers, rinsed extensively with Milli Q water and allowed to air dry. AFM scans of the capsules were obtained with a MFP-3D Asylum Research instrument in AC mode using ultrasharp SiN gold-coated cantilevers (NT-MDT).

**UV/Vis spectrophotometry.** A SAFAS (Monaco) spectrophotometer was used to measure the absorbance as a function of time and to acquire spectra of the products in aqueous buffer solution obtained from dephosphorylation of PNP and oxidation of ABTS catalyzed by DSP–BrIBAM–AP and DSP–BrIBAM–HRP capsules, respectively.

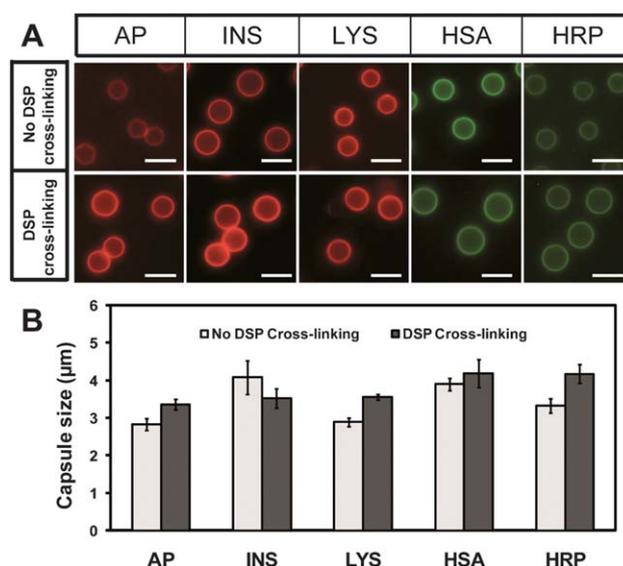
**Flow cytometry.** A Cyflow Space (Partec GmbH) flow cytometer using an excitation wavelength of 488 nm (emission filter of 560–590 nm) was used to measure the DOX fluorescence of DSP-cross-linked BrIBAM protein capsules and replica spheres in Milli Q water (pH 5.8). At least 20 000 particles were analyzed in each experiment.

**Confocal microscopy.** Imaging of the capsules was carried out on a Leica TCS SP2 CLSM system equipped with an argon laser ( $\lambda = 488$  nm) and a HeNe laser ( $\lambda = 633$  nm), the corresponding filter sets, and a 63× oil immersion objective (Leica, Germany).

## Results and discussion

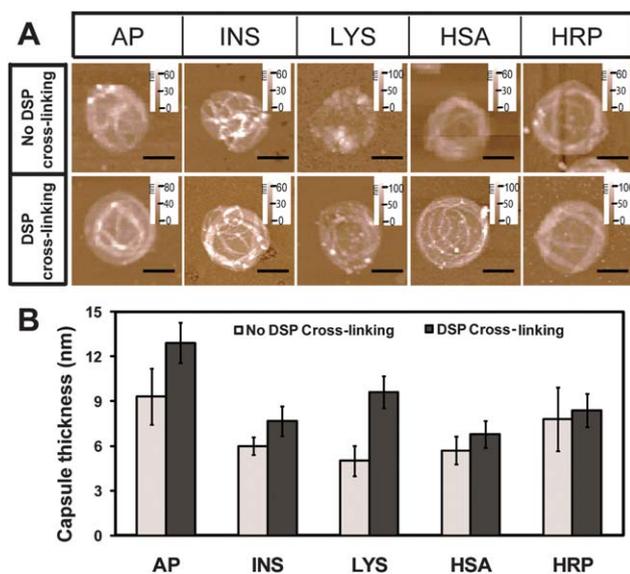
### Effect of DSP cross-linking on structural parameters

The effect of DSP covalent cross-linking on capsule size was investigated for the BrIBAM–protein capsules composed of AP, INS, LYS, HSA, or HRP. These proteins were fluorescently labeled with either fluorescein isothiocyanate (FITC) or rhodamine-isothiocyanate (RITC) and adsorbed for 30 min onto 5  $\mu$ m diameter BrIBAM-modified silica particles (see Experimental section for details). Half of these particles were subsequently cross-linked with DSP molecules. Following template removal,



**Fig. 2** (A) Fluorescence microscopy images of noncross-linked and DSP cross-linked BrIBAM–protein capsules. Scale bars are 5  $\mu$ m. (B) Capsule sizes obtained from analysis of the fluorescence microscopy images. For each capsule size measurement, the analysis was carried out on a minimum number of 30 capsules.

the non-cross-linked and DSP cross-linked BrIBAM protein capsules were imaged by fluorescence microscopy (Fig. 2A). All of the five protein capsules (AP, INS, LYS, HSA and HRP) after DSP cross-linking showed better capsule dispersion (*i.e.*, better dispersibility) in aqueous buffer, less shrinkage and less aggregation, compared to those without DSP cross-linking. The distribution of the protein capsule size measured *via* microscopy image analysis shows that the DSP covalent cross-linking led to a slight increase of the capsule sizes for all of the proteins employed, except for INS (see Fig. 2B and corresponding data in Table S2†). For INS, the size of the capsules was  $4.1 \pm 0.4$   $\mu$ m without DSP cross-linking and  $3.5 \pm 0.3$   $\mu$ m after DSP cross-linking. This effect may be explained by a change in the protein conformation after DSP cross-linking with INS probably becoming more hydrophobic than the other proteins. The influence of the covalent cross-linking on the capsule wall thickness with DSP was also investigated. The non-cross-linked and DSP cross-linked BrIBAM–protein capsules were imaged by AFM (Fig. 3A) and the wall thicknesses were estimated by AFM *z*-profile analysis (see detailed procedure in Fig. S1†). The wall thicknesses increased slightly with DSP covalent cross-linking for the BrIBAM–protein capsules (Fig. 3B and Table S3†). This result may be attributed to an increase of material due to numerous DSP molecules cross-linking the amino residue groups of proteins. This may also originate from more rigid structures after covalent cross-linking. To confirm the reactivity of the amino residues of the protein chains (mainly lysine groups), similar experiments were performed by employing PLL, a lysine homopolymer. Fluorescence microscopy and AFM images show an enhancement in size (*ca.* 50%) and wall thickness (*ca.* 2-fold), respectively, for the DSP–BrIBAM–PLL capsules after DSP cross-linking (see Fig. S2 and Table S4†). Our results are consistent with those found by Möhwald and coworkers,<sup>53</sup> who investigated the covalent cross-linking of poly(allylamine

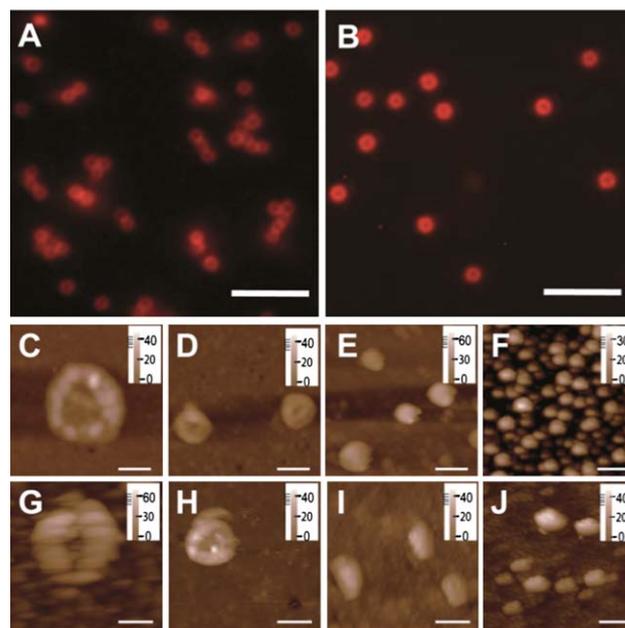


**Fig. 3** (A) Atomic force microscopy (AFM) images of the air-dried noncross-linked and DSP cross-linked BrIBAM-protein capsules. (B) The capsule wall thicknesses were estimated from  $z$ -profile analysis of 10 different capsules. Scale bars are 2  $\mu\text{m}$  for AFM images.

hydrochloride (PAH) and sodium poly(styrene sulfonate) (PSS) capsules with glutaraldehyde (GA). This cross-linking significantly improved the mechanical strength of the capsules and a thicker capsule wall was obtained. Other control experiments involving DSP cross-linking, but without the BrIBAM pre-coating, were performed. Negatively charged HSA, AP and HRP were coated onto amino-modified silica particles (obtained *via* silanization with APTS or *via* adsorption of PLL or PEI in water). The coated proteins were cross-linked with DSP and after template removal no capsules were obtained (see control experiments in Table S5†). These controls confirmed that a BrIBAM prelayer is essential to form the protein capsules. This emphasizes the importance of using covalent bridging with DSP to form stable protein capsules prepared from single step protein adsorption.

### Miniaturization of protein capsules to the submicron scale

Miniaturization of the protein capsules is especially relevant for the preparation of suitable carriers aimed at biomedical applications and interactions with cells. The design of submicron-sized protein capsules with controllable size was subsequently investigated. BrIBAM-modified silica particles with varied template sizes (1.11  $\mu\text{m}$ , 585, 304 and 147 nm) were coated with INS and HSA, and then covalently cross-linked with DSP. After template removal, INS and HSA capsules, dispersed in water, were formed. Fig. 4A and B show fluorescence microscopy images of dispersed DSP-cross-linked BrIBAM-INS and BrIBAM-HSA capsules obtained from 1.11  $\mu\text{m}$  templates. AFM images of the protein capsules from all of the template sizes (Fig. 4C–F for INS and Fig. 4G–J for HSA) show individual DSP cross-linked BrIBAM-protein capsules for both INS and HSA. These results demonstrate the efficiency and tunability afforded by the process for the preparation of submicron-sized

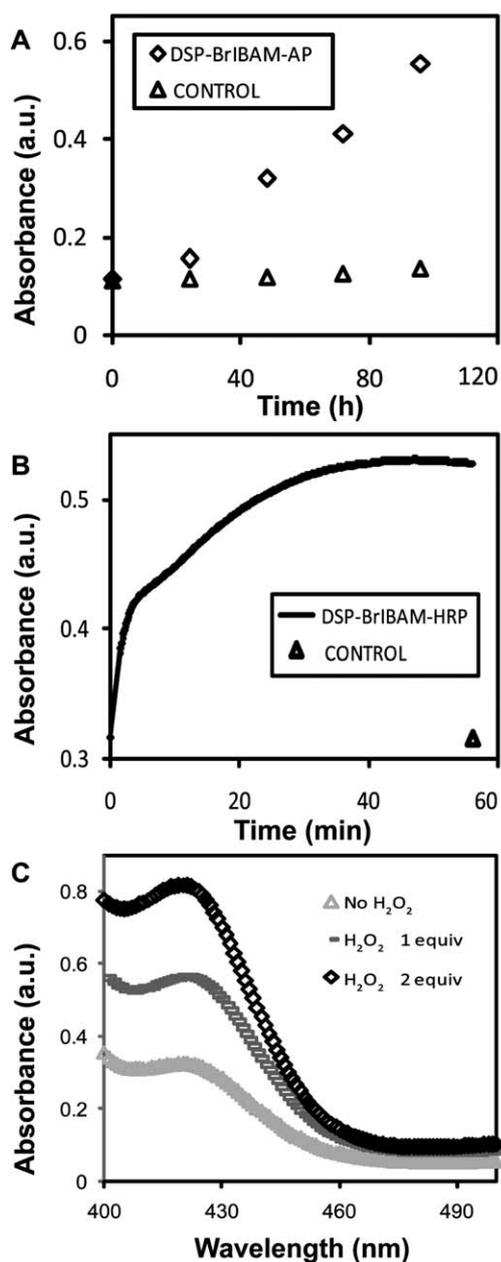


**Fig. 4** Fluorescence microscopy images of (A) DSP-cross-linked BrIBAM-INS and (B) DSP cross-linked BrIBAM-HSA capsules (dispersed in water), obtained from 1.11  $\mu\text{m}$  diameter template particles. AFM images of air-dried DSP-cross-linked BrIBAM-INS (C–F) and DSP-cross-linked BrIBAM-HSA (G–J) capsules, prepared from silica templates of different sizes (1.11  $\mu\text{m}$ , 585, 304 and 147 nm, respectively). Scale bars are 5  $\mu\text{m}$  for images (A) and (B) and 500 nm for images (C–J).

capsules. The sizes of these DSP cross-linked BrIBAM-protein capsules were determined by AFM analysis for all of the four template sizes employed (see details in Table S6A and B†). Respective sizes of  $856 \pm 81$ ,  $542 \pm 41$ ,  $367 \pm 59$  and  $324 \pm 51$  nm were determined for INS capsules, whereas respective sizes of  $1212 \pm 79$ ,  $739 \pm 134$ ,  $393 \pm 11$  and  $243 \pm 50$  nm were determined for HSA capsules. Comparison of the wall thicknesses for DSP cross-linked BrIBAM-INS capsules and DSP cross-linked BrIBAM-HSA capsules for 500 nm and 5  $\mu\text{m}$  diameter particles yielded similar results for both sizes (*ca.*  $7 \pm 2$  nm), indicating the reproducibility of the process when using significantly different template sizes.

### Biological functionality of the protein capsules

The biological functionality of the DSP cross-linked BrIBAM-protein capsules was assessed by investigating the enzymatic activity of the AP and HRP capsules (obtained from 3  $\mu\text{m}$  templates). DSP-BrIBAM-AP capsules were incubated with a solution of *p*-nitrophenylphosphate (PNP) substrate ( $1.7 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $\text{NaHCO}_3$  buffer 0.05 M, pH = 8.5). Fig. 5A shows the conversion of PNP into *p*-nitrophenol (PN) (and a phosphate ion) catalyzed by the DSP-BrIBAM-AP capsules added to a PNP substrate solution and followed by UV/Vis spectrophotometry at  $\lambda = 410 \text{ nm}$  (see UV-Vis spectra in Fig. S3†). A linear evolution with time is observed, indicating a continuous and regular enzymatic catalytic conversion, whereas no conversion is observed in the absence of DSP-BrIBAM-AP capsules (control experiment). The DSP-BrIBAM-HRP capsules were incubated with a solution of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), a



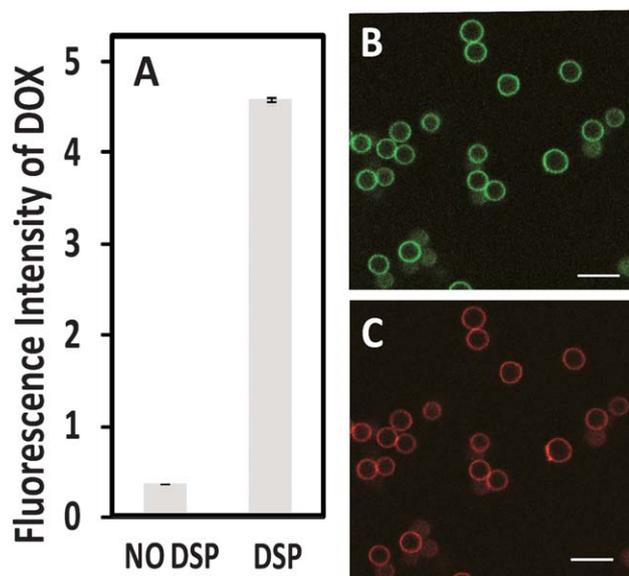
**Fig. 5** (A) Conversion of PNP into *p*-nitrophenol and a phosphate ion catalyzed by the DSP-BrIBAM-AP capsules, as followed by UV/Vis spectrophotometry ( $\lambda = 410$  nm). (B) ABTS oxidation catalyzed by the DSP-BrIBAM-HRP capsules after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by UV/Vis spectrophotometry ( $\lambda = 405$  nm). (C) Evolution of the absorbance spectra of ABTS after 2 consecutive additions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of DSP-BrIBAM-HRP capsules.

peroxidase substrate suitable for use in ELISA procedures (1 mg mL<sup>-1</sup> in phosphate-citrate buffer 0.02 M, pH = 5.0). The oxidation of ABTS by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catalyzed by HRP enzyme leads to a green colored oxidized product (maximum absorption at  $\lambda = 420$  nm). Fig. 5B shows the kinetics of ABTS oxidation catalyzed by the DSP-BrIBAM-HRP capsules after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as followed by UV/Vis spectrophotometry at  $\lambda = 405$  nm. Rapid evolution of the catalytic oxidation of ABTS is monitored (*ca.* 45

min), plateauing after 40 min. This is attributed to the total consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Control experiments without DSP-BrIBAM-HRP capsules show no evolution of the absorbance during this period, confirming that DSP-BrIBAM-HRP capsules effectively catalyzed the oxidation of ABTS. Further addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused reinitiation of the enzymatic catalysis of the DSP-BrIBAM-HRP capsules with a similar amplitude to that of the first kinetic experiment, as observed by the evolution of the absorbance of ABTS after 2 consecutive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions (Fig. 5C). Therefore, these data demonstrate for these two types of enzyme capsules (AP and HRP) that the combination of the HF treatment, the use of BrIBAM, and the DSP cross-linking did not deactivate their bio-functionality, highlighting the potential of such protein capsules as bioresponsive micro/nanosystems. Our previous studies have shown that the use of HF did not deactivate biological activity<sup>54-57</sup> nor make the capsules cytotoxic.<sup>57-59</sup>

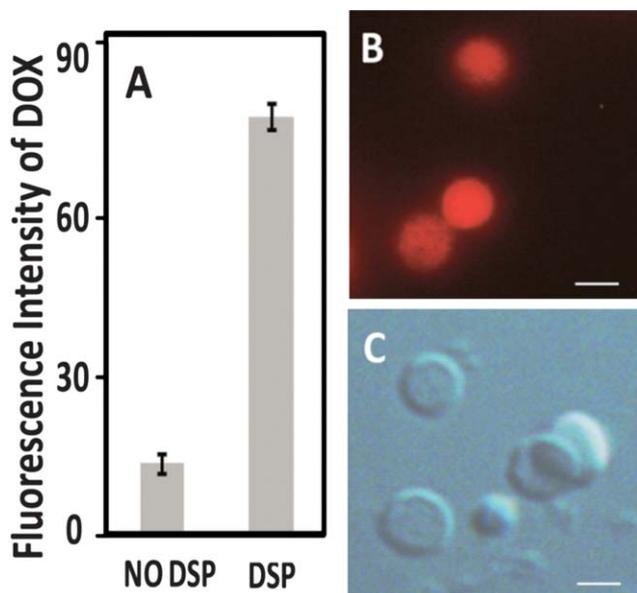
#### Doxorubicin functionalization of the protein capsules

To assess the potential of the protein capsules for drug functionalization and delivery, we investigated the possibility to attach doxorubicin (DOX), an aminated anticancer drug, to DSP-BrIBAM-HSA capsules *via* direct conjugation to the protein surface with unreacted succinimidylester (NHS) of the DSP linker (Fig. 1B). We hypothesized that part of the DSP linkers did not fully bridge the protein chains by the two sides, leading to free NHS moieties after covalent cross-linking. The presence of free NHS groups after DSP cross-linking of proteins has already been reported.<sup>60</sup> Moreover, as the DSP linker has a disulfide bridge in its spacer arm, this strategy may constitute a promising route to release attached DOX by reductive cleavage. Non-cross-linked (control experiments) and DSP cross-linked BrIBAM-HSA-coated silica particles were incubated with a DOX solution for 1 h (0.1 mg mL<sup>-1</sup> in water at pH 6) and then extensively washed with water. DOX is a red-fluorescent molecule (excitation/emission *ca.* 480/580 nm) and its presence can be detected by fluorescence microscopy or flow cytometry. Flow cytometry measurements (Fig. 6A) show high levels of fluorescence intensity measurements for DOX incubated with DSP cross-linked BrIBAM-HSA-coated silica particles, whereas control experiments performed without DSP cross-linking led to a negligible level of fluorescence (*ca.* 15 times lower). In further experiments, HSA was fluorescently labeled with FITC, and after silica template removal, well-dispersed, homogeneous green and red-fluorescent DSP cross-linked BrIBAM-HSA-FITC capsules with bound DOX were formed (see confocal microscopy images in the green and in the red channels, respectively, of Fig. 6B and C). This result clearly demonstrates the essential role of the DSP cross-linker to functionalize the protein capsules with DOX. This method was also applied to mesoporous silica (MS) instead of solid silica templates to form protein replica spheres loaded with DOX after template removal. Replica spheres have an internal polymeric network whereas capsules have a central void. Such architectures are alternative delivery vehicles.<sup>61,62</sup> BrIBAM-modified MS spheres (4.5  $\mu$ m diameter, *ca.* 100 nm pore size) were incubated with HSA (non-fluorescently labeled) followed by covalent cross-linking with DSP and subsequent incubation with DOX (1 h), as described above. Fluorescence intensity data obtained from flow cytometry analysis (Fig. 7A)



**Fig. 6** (A) Fluorescence intensities measured by flow cytometry of non-cross-linked (control experiments) and covalently DSP cross-linked BrIBAM-HSA-coated silica particles incubated with DOX. CLSM images of DOX bound to DSP-cross-linked BrIBAM-HSA-FITC capsules observed in the green (B) and in the red (C) channels. Scale bars are 5  $\mu\text{m}$  for images (B) and (C).

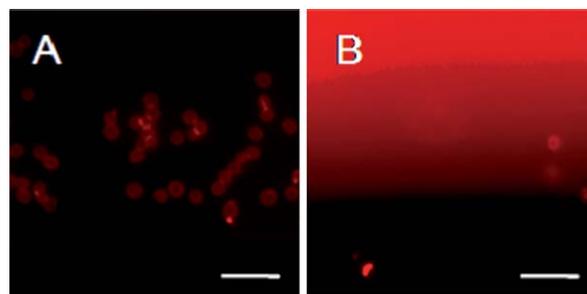
confirmed the higher amount of DOX present inside the BrIBAM-HSA-coated MS spheres after DSP cross-linking compared to the control experiment without DSP cross-linking (*ca.* 6 times lower). Fluorescence microscopy imaging of DOX-incubated DSP cross-linked BrIBAM-HSA MS spheres shows



**Fig. 7** (A) Fluorescence intensities measured by flow cytometry of non-cross-linked (control experiments) and covalently DSP-cross-linked BrIBAM-HSA-coated MS particles incubated with DOX. (B) Fluorescence and (C) bright field microscopy images of DOX functionalized DSP cross-linked BrIBAM-HSA replica spheres formed after template removal. Scale bars are 3  $\mu\text{m}$  for images (B) and (C).

homogeneous loading of the drug within the MS spheres (Fig. S4A†) whereas control experiments performed without DSP cross-linking led to a negligible amount of embedded DOX, as indicated by the absence of red fluorescence within the MS spheres (Fig. S4B†). Dissolution of the template with HF buffer yielded homogeneous DOX-loaded, DSP cross-linked BrIBAM-HSA replica spheres (Fig. 7B and C for fluorescence and bright field microscopy images, respectively) with *ca.* 30% shrinkage compared to the initial template. These data again confirmed the crucial role of the DSP cross-linker for DOX attachment to the protein assembly. To verify that the DOX was covalently conjugated with the unreacted NHS of the DSP linkers, we investigated DOX release under reducing conditions *via* disulfide bond cleavage. The DOX-functionalized DSP-BrIBAM-HSA capsules were incubated with solutions of DTT (0.5 M) or GSH (5 mM) (reducing agents) in PBS buffer (pH 7.2). GSH mimics the biological reductive conditions of the cytosol.<sup>63</sup> Fluorescence microscopy images performed with the same parameters show that control capsules incubated in PBS (pH 7.2) present a non-detectable release of DOX in solution after 6 h incubation (Fig. 8A); however, protein capsules incubated with DTT (6 h) or GSH (3 h) show the formation of strong red fluorescence in solution (Fig. 8B and Fig. S5†, respectively, for DTT and GSH). These results demonstrate that DOX from the protein capsules has been released in solution upon DTT or GSH action, which likely results from the reductive cleavage of the DSP disulfide bridges between DOX and proteins. However, we observed that even after 34 h incubation in reducing solutions, a significant amount of DOX was still attached to the protein capsules, suggesting that not all of the DOX was bound through conjugation to free NHS sites of the DSP linkers.

In order to evaluate the relative amount of DOX conjugated *via* unreacted NHS-moieties, we pre-incubated DSP cross-linked BrIBAM-HSA-coated silica particles with solutions of amine scavengers (1 h) followed by washing with water before DOX incubation (1 h). Thus, ethanolamine (ETA, 400 equiv.), 11-azido-3,6,9-trioxaundecane-1-amine (PEG-NH<sub>2</sub>, 120 equiv.), and tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris, 10 000 equiv.) were respectively added in a large excess to saturate all of the free NHS sites and to prevent any additional conjugation of DOX to the protein surface. Flow cytometry experiments (Fig. S6†) were performed on silica particles to measure the fluorescence of DOX bound to the DSP cross-linked BrIBAM HSA-coated particles. These data indicated that after incubation with the amine



**Fig. 8** Fluorescence microscopy images (taken with the same acquisition parameters – excitation and detector gains) of DOX-functionalized HSA capsules after 6 h incubation (A) in PBS buffer (pH 7.2) and (B) in DTT 0.5 M in PBS buffer. Scale bars are 15  $\mu\text{m}$ .

scavengers, only a decrease of *ca.* 30–40% of the DOX fluorescence occurred, compared with the control (without scavengers), suggesting that *ca.* 60–70% of the DOX was not bound *via* NHS conjugation. DOX may therefore also be adhered through physical interaction to the DSP cross-linked protein assembly, such as hydrophobic association. Elucidation of the DOX binding mechanism is under progress and will require a detailed investigation.

Finally, to demonstrate the potential for full release of DOX from the protein capsules in biological conditions, we assessed the action of proteases (0.5 mg mL<sup>-1</sup>, in PBS buffer at pH 7.2) to degrade the protein capsules and consequently release the DOX. The DOX-functionalized protein capsules were incubated with proteases at 37 °C for 3 h. Fluorescence microscopy shows protein capsules with a strong red fluorescence in solution corresponding to enzymatically degraded polypeptidic fragments bound with DOX (Fig. S7A†). After 34 h, fluorescence microscopy analysis indicates that a large majority of the protein capsules (≥80%) are degraded, leading to a significant release of DOX from these protein capsules (Fig. S7B†).

## Conclusions

The combination of intermolecular binding with BrIBAM and covalent bridging with DSP linkers was shown to be successful for the preparation of stabilized ultrathin protein capsules without deactivation of their biofunctionality. This strategy allows the facile preparation of submicron-sized protein capsules as small as *ca.* 200 nm, which could be potential candidates for biomedical applications. Moreover, the DSP-cross-linked BrIBAM–HSA ccapsules were functionalized with the aminated therapeutic DOX, which was released under biological reducing conditions (such as 5 mM GSH). DOX release can also be achieved through protein capsule biodegradation by exposure to proteases. We anticipate that this strategy of protein assembly and post-functionalization will constitute a promising route for engineering targeted drug delivery vehicles by functionalizing such protein carriers with other biomolecules, *e.g.*, cell-receptor ligands and cell penetrating peptides.

## Acknowledgements

This work was supported by the Australian Research Council under the Federation Fellowship (F.C., FF0776078) and Discovery Project (F.C., DP1094147) schemes. P. Senn is gratefully acknowledged for assistance with confocal microscopy and L. Jierry for fruitful discussions. ESI† is available online from Wiley InterScience or from the author.

## Notes and references

- M. Onda, Y. Lvov, K. Ariga and T. Kunitake, *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, **82**, 502–506.
- A. D. Price, A. N. Zelikin, K. L. Wark and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 720–723.
- D. Mertz, C. Vogt, J. Hemmerle, C. Debry, J.-C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavalle, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 8324–8331.
- D. Mertz, C. Vogt, J. Hemmerle, J. Mutterer, V. Ball, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavalle, *Nat. Mater.*, 2009, **8**, 731–735.
- W. Qi, X. H. Yan, L. Juan, Y. Cui, Y. Yang and J. B. Li, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1212–1216.
- A. Narvaez, G. Suarez, I. C. Popescu, I. Katakis and E. Dominguez, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, **15**, 43–52.
- X. Cui, R. Pei, Z. Wang, F. Yang, Y. Ma, S. Dong and X. Yang, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 59–67.
- J. Voros, J. J. Ramsden, G. Csucs, I. Szendro, S. M. De Paul, M. Textor and N. D. Spencer, *Biomaterials*, 2002, **23**, 3699–3710.
- S. Sivakumar, K. L. Wark, J. K. Gupta, N. L. Abbott and F. Caruso, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 2260–2265.
- P. Lavalle, J. C. Voegel, D. Vautier, B. Senger, P. Schaaf and V. Ball, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 1191–1221.
- P. M. Mendes, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2512–2529.
- M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Muller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov and S. Minko, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 101–113.
- W. Tong, C. Gao and H. Möhwald, *Colloid Polym. Sci.*, 2008, **286**, 1103–1109.
- D. Mertz, J. Hemmerle, F. Boulmedais, J. C. Voegel, P. Lavalle and P. Schaaf, *Soft Matter*, 2007, **3**, 1413–1420.
- D. Mertz, J. Hemmerle, J. Mutterer, S. Ollivier, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavalle, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 657–662.
- M. M. J. Kamphuis, A. P. R. Johnston, G. K. Such, H. H. Dam, R. A. Evans, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath and F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15881–15883.
- C. Cortez, E. Tomaskovic-Crook, J. A. P. R. B. Radt, S. H. Cody, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 1998–2003.
- D. M. Lynn, *Soft Matter*, 2006, **2**, 269–273.
- Z. Y. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 3203–3224.
- A. N. Zelikin, *ACS Nano*, 2010, **4**, 2494–2509.
- T. P. J. Knowles, T. W. Oppenheim, A. K. Buell, D. Y. Chirgadze and M. E. Welland, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 204–207.
- S. Toksoz and M. O. Guler, *Nano Today*, 2009, **4**, 458–469.
- R. V. Uljin and A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 664–675.
- S. Zhang, D. M. Marini, W. Hwang and S. Santoso, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6**, 865–871.
- E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1263–1269.
- K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1869–1880.
- L. Mi, S. Fischer, B. Chung, S. Sundelacruz and J. L. Harden, *Biomacromolecules*, 2005, **7**, 38–47.
- W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz and D. A. Tirrell, *Science*, 1998, 389–392.
- Z. An, G. Lu, H. Möhwald and J. Li, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 5848–5852.
- Z. An, H. Möhwald and J. Li, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 580–585.
- Z. An, C. Tao, G. Lu, H. Möhwald, S. Zheng, Y. Cui and J. Li, *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 2514–2519.
- N. G. Balabushevich, O. P. Tiourina, D. V. Volodkin, N. I. Larionova and G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 1191–1197.
- O. P. Tiourina and G. B. Sukhorukov, *Int. J. Pharm.*, 2002, **242**, 155–161.
- O. Shchepelina, I. Drachuk, M. K. Gupta, J. Lin and V. V. Tsukruk, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 4655–4660.
- S. Aime, L. Frullano and S. Geninatti Crich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1017–1019.
- M. L. Flenniken, L. O. Liepold, B. E. Crowley, D. A. Willits, M. J. Young and T. Douglas, *Chem. Commun.*, 2005, 447–449.
- M. L. Flenniken, D. A. Willits, S. Brumfield, M. J. Young and T. Douglas, *Nano Lett.*, 2003, **3**, 1573–1576.
- M. Uchida, M. L. Flenniken, M. Allen, D. A. Willits, B. E. Crowley, S. Brumfield, A. F. Willis, L. Jackiw, M. Jutila, M. J. Young and T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16626–16633.
- H. Wu, M. H. Engelhard, J. Wang, D. R. Fisher and Y. Lin, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 1779–1783.
- L. Beaulieu, L. Savoie, P. Paquin and M. Subirade, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 239–248.
- K. Fujioka, Y. Takada, S. Sato and T. Miyata, *J. Controlled Release*, 1995, **33**, 307–315.
- A. J. Kuijpers, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, L. A. Brouwer, G. H. M. Engbers, J. Krijgsveld, S. A. J. Zaat, J. Dankert and J. Feijen, *Biomaterials*, 2000, **21**, 1763–1772.
- A. J. Kuijpers, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, G. H. M. Engbers, J. Krijgsveld, S. A. J. Zaat, J. Dankert and J. Feijen, *J. Controlled Release*, 2000, **67**, 323–336.
- M. Maeda, S. Tani, A. Sano and K. Fujioka, *J. Controlled Release*, 1999, **62**, 313–324.

- 45 F. Kratz, *J. Controlled Release*, 2008, **132**, 171–183.
- 46 T. K. Lee, T. D. Sokoloski and G. P. Royer, *Science*, 1981, 233–235.
- 47 W. Lu, J. Wan, Z. She and X. Jiang, *J. Controlled Release*, 2007, **118**, 38–53.
- 48 M. Yan, J. J. Du, Z. Gu, M. Liang, Y. F. Hu, W. J. Zhang, S. Priceman, L. L. Wu, Z. H. Zhou, Z. Liu, T. Segura, Y. Tang and Y. F. Lu, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 48–53.
- 49 G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, S. Schatt, W. Maier-Borst and D. L. Heene, *Anti-Cancer Drugs*, 1997, **8**, 677–685.
- 50 G. Stehle, A. Wunder, H. Sinn, H. H. Schrenk, S. Schatt, E. Frei, G. Hartung, W. Maier-Borst and D. L. Heene, *Anti-Cancer Drugs*, 1997, **8**, 835–844.
- 51 D. Mertz, P. Tan, Y. Wang, T. K. Goh, A. Blencowe and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 5668–5673.
- 52 A. J. Lomant and G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.*, 1976, **104**, 243–261.
- 53 W. Tong, C. Gao and H. Möhwald, *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 4610–4616.
- 54 B. Städler, R. Chandrawati, A. D. Price, S. F. Chong, K. Breheney, A. Postma, L. A. Connal, A. N. Zelikin and F. Caruso, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 4359–4362.
- 55 C. R. Kinnane, K. Wark, G. K. Such, A. P. R. Johnston and F. Caruso, *Small*, 2009, **5**, 444–448.
- 56 A. P. R. Johnston, A. N. Zelikin and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3727–3730.
- 57 D. Mertz, J. Cui, Y. Yan, G. Devlin, C. Chaubaroux, A. Dochter, R. Alles, P. Lavalle, J. C. Voegel, A. Blencowe, P. Auffinger and F. Caruso, *ACS Nano*, 2012, DOI: 10.1021/nn302024t.
- 58 M. K. M. Leung, G. K. Such, A. P. R. Johnston, D. P. Biswas, Z. Zhu, Y. Yan, J.-F. Lutz and F. Caruso, *Small*, 2011, **7**, 1075–1085.
- 59 Y. Yan, A. P. R. Johnston, S. J. Dodds, M. M. J. Kamphuis, C. Ferguson, R. G. Parton, E. C. Nice, J. K. Heath and F. Caruso, *ACS Nano*, 2010, **4**, 2928–2936.
- 60 O. K. Bernhard, M. M. Sheil and A. L. Cunningham, *Biochemistry*, 2003, **43**, 256–264.
- 61 Y. Wang and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 795.
- 62 D. Mertz, C. J. Ochs, Z. Zhu, L. Lee, S. N. Guntari, G. K. Such, T. K. Goh, L. A. Connal, A. Blencowe, G. G. Qiao and F. Caruso, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12601–12603.
- 63 K. Liang, G. K. Such, Z. Zhu, Y. Yan, H. Lomas and F. Caruso, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, H273–H277.

**Publication n°3: Protein Capsules Assembled via Isobutyramide Grafts: Sequential Growth, Biofunctionalization, and Cellular Uptake.** Damien Mertz, Jiwei Cui, Yan Yan, Glyn Devlin, Christophe Chaubaroux, Alexandre Dochter, Roxane Alles, Philippe Laval, Jean Claude Voegel, Anton Blencowe, Pascal Auffinger, and Frank Caruso. ACS Nano 2012; 6 (9): 7584-94.

Le travail présenté concerne l'assemblage séquentiel de protéines par adsorption alternée d'albumine sérique humaine (HSA) et de greffages chimiques par le bromoisobutyramide (BrIBAM) ou l'isobutyramide (IBAM). Cette méthode, permettant la construction de films protéiques non covalents de taille nanométrique contrôlée, sur des particules de silice. De plus, une fois le cœur de silice dissout, des capsules protéiques d'épaisseur contrôlée et variable et de grande stabilité mécanique sont obtenues. Ces capsules, non cytotoxiques *in vitro*, et pouvant être fonctionnalisées avec différentes molécules bioactives, présentent une entrée cellulaire dépendante de l'épaisseur de leur paroi, l'utilisation de BrIBAM engendrant une épaisseur plus importante. Ces éléments font de ces capsules protéiques un vecteur prometteur pour la « délivrance » de drogues.

**Ma participation :** réalisation d'expériences complémentaires de cytométrie en flux participant à la caractérisation des capsules.

# Protein Capsules Assembled *via* Isobutyramide Grafts: Sequential Growth, Biofunctionalization, and Cellular Uptake

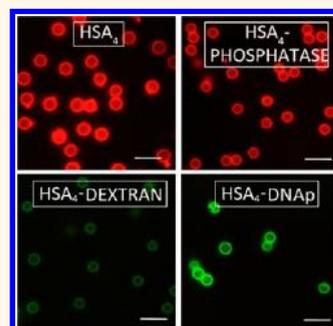
Damien Mertz,<sup>†</sup> Jiwei Cui,<sup>†</sup> Yan Yan,<sup>†</sup> Glyn Devlin,<sup>\*</sup> Christophe Chaubaroux,<sup>§</sup> Alexandre Dochter,<sup>‡</sup> Roxane Alles,<sup>†</sup> Philippe Lavallo,<sup>§</sup> Jean Claude Voegel,<sup>§</sup> Anton Blencowe,<sup>†</sup> Pascal Auffinger,<sup>#</sup> and Frank Caruso<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia, <sup>\*</sup>Australian Synchrotron, Clayton, Victoria 3168, Australia, <sup>§</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 977, Faculté de chirurgie dentaire, Université de Strasbourg, 67085 Strasbourg, France, <sup>‡</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UPR22, Institut Charles Sadron, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg, France, <sup>¶</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 748, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France, and <sup>#</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, IBMC, CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

The native properties of proteins, including biocompatibility, biodegradability, and biofunctionality, render them attractive for the fabrication of tailored architectures aimed at biomedical applications. The use of proteins in tissue engineering, biosensing, and drug delivery has led to significant interest in many areas aimed at studying and developing coatings,<sup>1–6</sup> capsules,<sup>7–12</sup> and self-assembled nanostructures.<sup>13–17</sup> Strategies for protein assembly can be classified into those that employ covalent and noncovalent interactions. Covalent cross-linking of protein assemblies can enhance their mechanical stability, as demonstrated by layer-by-layer (LbL)-assembled protein capsules cross-linked with glutaraldehyde.<sup>18–20</sup> However, the use of covalent cross-linkers leads to permanent bonds, preventing capsule disassembly, and, in some cases, has been shown to introduce cytotoxicity.<sup>21–23</sup> As an alternative, noncovalent interactions (e.g., amphiphilic forces, electrostatic interactions, hydrogen bonding and/or hydrophobic interactions) have been extensively used for the preparation of various protein-based architectures, including self-assembled peptidic structures,<sup>13–15,17,24</sup> hydrogels,<sup>25–28</sup> films,<sup>29,30</sup> and particles.<sup>31–33</sup> Identifying novel combinations of noncovalent interactions between proteins and ligands, polymers or colloids will facilitate the development of next-generation protein-based architectures.

Human serum albumin (HSA,  $M_w \approx 66$  kDa) is a globular protein composed of 585 amino

**ABSTRACT** We report the sequential assembly of proteins *via* the alternating physical adsorption of human serum albumin (HSA) and chemical grafting with isobutyramide (IBAM) or bromoisobutyramide (BriBAM) groups. This approach, performed on silica template particles, leads to the formation of noncovalent protein films with controlled growth at the nanometer



scale. Further, after template removal, hollow protein capsules with tunable wall thicknesses and high mechanical stability are obtained. The use of BriBAM, compared to IBAM grafts, leads to significantly thicker capsule walls, highlighting the influence of the bromine atoms in the assembly process, which is discussed in terms of a theoretical model of noncovalent interactions. Another feature of the process is the possibility to functionalize the HSA capsules with other biologically active macromolecules, including enzymes, polysaccharides, or DNA plasmids, demonstrating the versatility of this approach. We also report that BriBAM-HSA and IBAM-HSA capsules display negligible cytotoxicity *in vitro* with HeLa cells and that their cellular uptake is dependent on the thickness of the capsule walls. These findings support the potential use of these protein capsules in tailored biological applications such as drug delivery.

**KEYWORDS:** protein assembly · hollow capsules · noncovalent interactions · biofunctionalization · isobutyramide graft

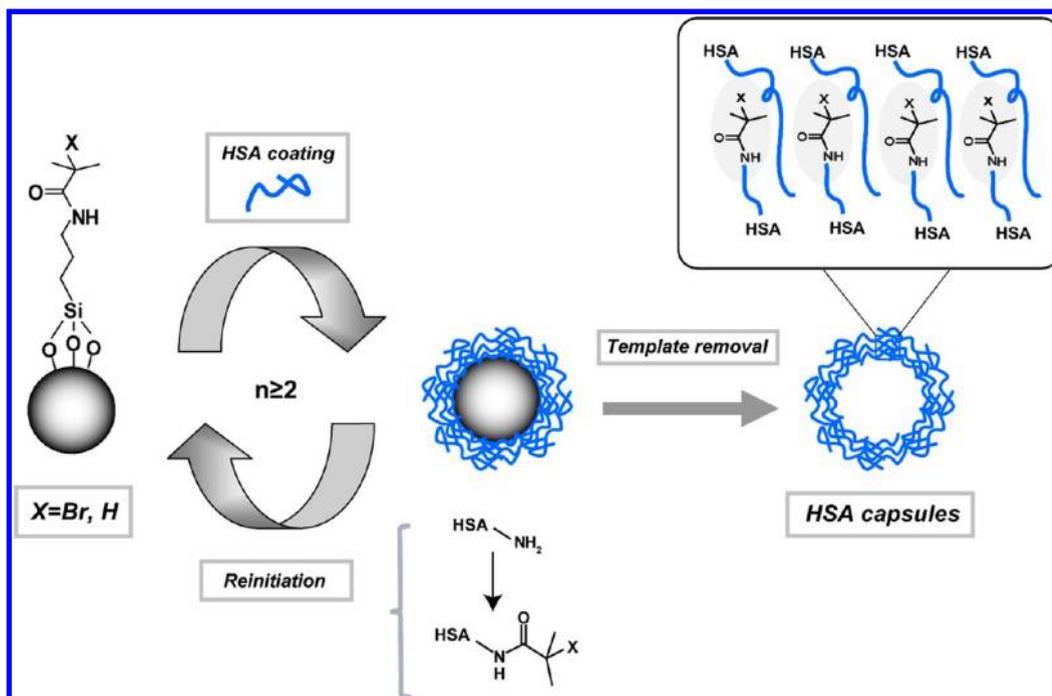
acids and constitutes the most abundant protein in human blood plasma. The biofunctionality of HSA is related to its role in transporting nutrient molecules, which results from its various binding properties.<sup>34,35</sup> The biological nature and availability of HSA makes it a promising building block for the preparation of biocompatible, biodegradable, and nonimmunogenic carriers.<sup>36,37</sup> Several studies have investigated the formation of

\* Address correspondence to fcaruso@unimelb.edu.au.

Received for review February 23, 2012 and accepted August 27, 2012.

Published online September 05, 2012  
10.1021/nn302024t

© 2012 American Chemical Society

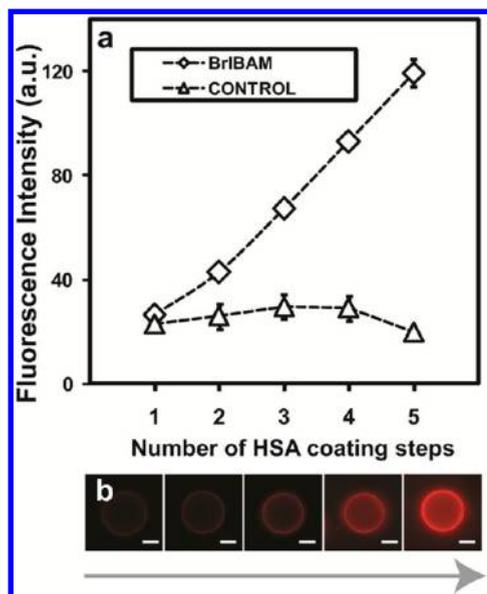


**Scheme 1.** Noncovalent protein assembly onto SiO<sub>2</sub> particles based upon the sequential adsorption of HSA and subsequent refunctionalization with BrIBAM or IBAM moieties to facilitate further protein adsorption. This process was repeated up to five times, leading to protein films with controlled growth profiles. Removal of the underlying template leads to stabilized protein capsules when two or more protein coating steps are performed. H-bonding (for IBAM and BrIBAM) and potentially halogen-bonding interactions with bromine (for BrIBAM) are proposed as the driving forces for the protein assemblies.

hollow capsules composed of HSA or bovine serum albumin (BSA) through noncovalent interactions. Lu *et al.* reported the one-step formation of *ca.* 100  $\mu\text{m}$  diameter HSA microcapsules through the pendent drop technique.<sup>38</sup> The hollow HSA capsules were obtained by protein adsorption onto the surfaces of organic droplets produced at a chloroform/water interface at the tip of a capillary followed by evaporation of the organic phase. However, this process does not allow the size and thickness of such capsules to be tuned. An *et al.* reported the LbL electrostatic assembly of HSA and  $\alpha$ -dimyristoyl-phosphatitic acid onto melamine formaldehyde resin or polystyrene colloidal particles to form lipid–protein microcapsules after core removal.<sup>39,40</sup> Detailed information was provided on the charge, thickness, and internal structure of the capsules, with further studies also demonstrating the pH-responsiveness of the protein–lipid capsules.<sup>41</sup> Recently, we reported a novel and versatile approach for the preparation of noncovalent protein and biopolymer free-standing architectures.<sup>42</sup> The process consists of the single-step adsorption of biopolymers onto silica particles chemically modified with bromoisobutyramide (BrIBAM: a brominated derivative of isobutyramide (IBAM)) followed by template removal. The driving force for assembly was demonstrated to be related to noncovalent interactions between the biopolymers and the BrIBAM moieties. Specifically, noncovalent interactions with the amide groups *via* H-bonding and with the bromine atoms *via* halogen bonding were suggested. While the formation of free-standing

protein-based hollow capsules was achieved from a single protein coating step, the capsules displayed moderate mechanical stability. Furthermore, the film thickness was found to be related to the dimensions of the adsorbed biopolymer layer and as such could not be tuned.

Herein, we report the assembly of noncovalent protein films *via* the sequential adsorption of HSA intermittently refunctionalized with isobutyramide derivative grafts (BrIBAM or IBAM moieties) on silica (SiO<sub>2</sub>) particles (Scheme 1). Moreover, after SiO<sub>2</sub> template removal, mechanically stable protein capsules with nanometer scale controlled thickness are obtained without the need for covalent cross-linking between the protein chains. Mechanically dispersible protein capsules in aqueous media are obtained from only two protein coating steps, which constitutes a significant gain in stability compared to polymer capsules formed by other methods. Protein capsules made *via* this process are shown to disassemble upon exposure to external stimuli, such as aqueous (urea) or organic (acetone) media. A network of H-bonds and possibly halogen-bonds may explain the formation of the thicker BrIBAM-HSA capsules compared to the IBAM-HSA capsules. Another advantage of the process is the versatile biofunctionalization, as is demonstrated by coating the protein capsules (IBAM-HSA and BrIBAM-HSA) with other biological macromolecules such as alkaline phosphatase (AP), dextran (DEX), and plasmid DNA (DNAP). The retention of biological functionality of such biopolymer hybrid capsules is shown

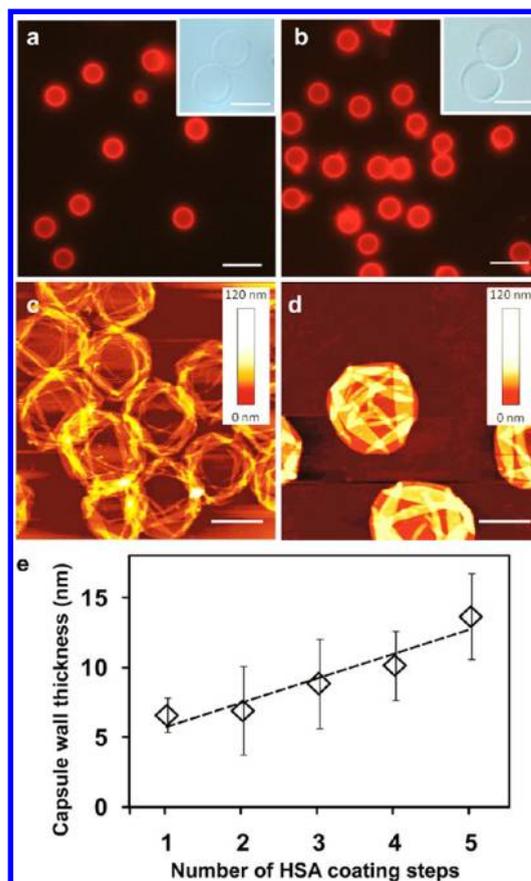


**Figure 1.** Growth of BrIBAM-HSA films on SiO<sub>2</sub> particles. (a) Evolution of the fluorescence intensity with increasing number of HSA-RITC coating steps, as followed by flow cytometry. (b) Fluorescence microscopy images of BrIBAM-HSA films deposited onto SiO<sub>2</sub> particles as a function of the number of HSA coating steps (from left to right,  $n = 1-5$ ). Scale bars are 2  $\mu\text{m}$ .

with AP-functionalized HSA capsules, which retain their enzymatic activity. Negligible cytotoxicity of the two types of protein capsules (*i.e.*, BrIBAM-HSA and IBAM-HSA) toward HeLa cells is demonstrated, and the influence of capsule wall thickness on capsule cellular association is reported.

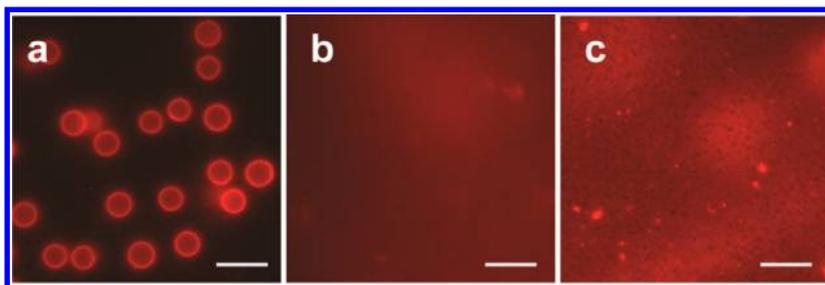
## RESULTS AND DISCUSSION

**Formation of BrIBAM-HSA Capsules.** Protein film growth through HSA adsorption and refunctionalization with BrIBAM moieties on nonporous silica (SiO<sub>2</sub>) particles were followed by flow cytometry. Fluorescently labeled HSA-rhodamine isothiocyanate (RITC) was adsorbed for 30 min onto BrIBAM-modified SiO<sub>2</sub> particles (5  $\mu\text{m}$  diameter) to generate the first protein coating. The protein surface was then functionalized with BrIBAM groups by the addition of an excess of 2-bromoisoobutyl bromide, which reacts with the pendent amine groups of the lysine or arginine residues of the protein, converting them into BrIBAM moieties. Subsequently, a second HSA coating was deposited over 30 min by adsorption onto the BrIBAM-functionalized HSA surface. This coating process was repeated up to five times to form a film denoted (BrIBAM-HSA)<sub>5</sub>. Fluorescence intensity data obtained from flow cytometry (Figure 1a) illustrate the near-linear and continuous growth of the protein film on SiO<sub>2</sub> particles with increasing number of HSA coating steps. The initial fluorescence intensity of SiO<sub>2</sub> particles ( $26 \pm 1$  au) after the first HSA coating step ( $n = 1$ ) increased by *ca.* 23 au increments per protein coating step until a final



**Figure 2.** Fluorescence microscopy images of BrIBAM-HSA capsules initially templated onto 5  $\mu\text{m}$  diameter SiO<sub>2</sub> particles after (a)  $n = 2$  and (b)  $n = 5$  HSA-RITC coating steps. Insets show bright field microscopy images of the capsules. AFM images of the BrIBAM-HSA capsules initially templated onto 3  $\mu\text{m}$  diameter SiO<sub>2</sub> particles in the dried state after (c)  $n = 2$  and (d)  $n = 5$  HSA coating steps. (e) Evolution of the capsule wall thickness as a function of the number of HSA coating steps, as determined from AFM z-profile analysis. Scale bars are 10  $\mu\text{m}$  for fluorescence microscopy images, 5  $\mu\text{m}$  for bright field microscopy images, and 2  $\mu\text{m}$  for AFM images.

fluorescence intensity of  $119 \pm 5$  au was achieved after the fifth HSA coating step ( $n = 5$ ). Flow cytometry experiments of control particles produced using the same conditions, but without intermittent functionalization of the surface with BrIBAM groups, revealed no significant increase in fluorescence intensity (Figure 1a), thus confirming the key role of the BrIBAM moieties in driving the assembly and growth of the protein film. Fluorescence microscopy images (Figure 1b) of the protein-coated particles after each HSA coating step reveal regular protein deposition onto the SiO<sub>2</sub> particles, as shown by the increase in the fluorescence of the particles with each coating step. Removal of the underlying SiO<sub>2</sub> template from the BrIBAM-HSA coated particles after each coating step ( $n = 2-5$ ) yielded homogeneous and well-dispersed BrIBAM-protein hollow capsules with negligible shrinkage (see Figure 2a,b for fluorescence and bright field microscopy images of capsules after  $n = 2$



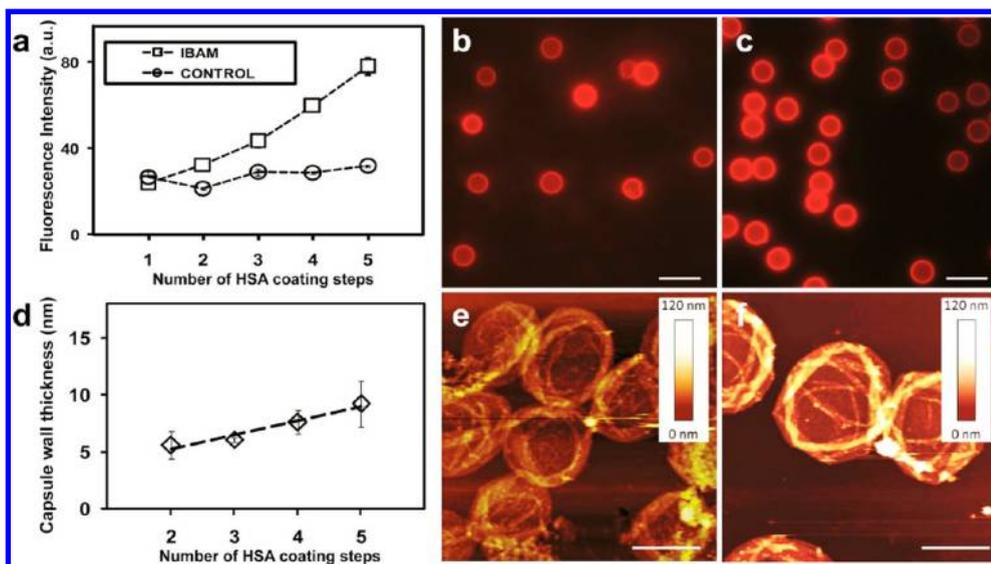
**Figure 3.** Disassembly of BrIBAM-HSA capsules imaged by fluorescence microscopy. (BrIBAM-HSA)<sub>3</sub> capsules (a) dispersed in water, (b) incubated with acetone (ca. 1 min), and (c) incubated with urea (3 M aqueous solution) (ca. 4 h). Scale bars are 10  $\mu$ m.

and 5 coating steps). Atomic force microscopy (AFM) images (Figure 2c,d) of the protein capsules in the dried state for  $n = 2$  and 5 HSA coating steps show homogeneous structures with significantly higher densities compared with our previously reported capsules prepared by a single HSA adsorption step onto BrIBAM modified surfaces.<sup>42</sup> The capsule wall thickness with HSA coating step (Figure 2e), as determined by AFM z-profile analysis (Supporting Information, Figure S1), linearly increases, which is consistent with the flow cytometry data and fluorescence microscopy images (Figure 1). The wall thickness of the protein capsules ranged from ca.  $6 \pm 2$  nm for the first HSA coating to ca.  $14 \pm 3$  nm after five HSA coatings, with an average thickness increment of ca. 2 nm per HSA coating (for  $n = 1-5$ ). Uniform film growth is attributed to a regular and consistent functionalization of the protein lysine or arginine groups with BrIBAM moieties after each HSA coating step.

Previously, we demonstrated that BrIBAM interactions with proteins and other biopolymers occur through noncovalent interactions and that both the isobutyramide and bromine substituted BrIBAM moieties play a role in the cohesive process.<sup>42</sup> Therefore, the noncovalent nature of the sequential BrIBAM-HSA capsules was investigated by assessing their intermolecular disassembly. (BrIBAM-HSA)<sub>3</sub> capsules were incubated with solutions of either acetone or urea (3 M aqueous solutions). In both cases, complete disassembly was observed with protein release into solution occurring rapidly with acetone (<1 min) and more slowly with urea (ca. 4 h) (Figure 3). These results are similar to those we previously reported for BrIBAM-HSA capsules obtained with one HSA coating step, confirming that the interactions between HSA and BrIBAM-functionalized HSA are noncovalent in nature and are readily disrupted by acetone or urea.

**BrIBAM versus IBAM.** The role of the bromine atoms attached to the isobutyramide groups in the assembly of the protein films was experimentally assessed by using the bromine-free IBAM groups. Thus, the same procedure as that described for the BrIBAM studies was employed, with the exception that isobutyryl chloride was used in place of 2-bromoisobutyryl bromide. Initially, HSA was adsorbed onto IBAM-functionalized SiO<sub>2</sub>

particles and then the lysine and arginine groups of the surface-coated protein were refunctionalized with IBAM groups *via* reaction with isobutyryl chloride followed by further protein adsorption. The protein film growth *via* HSA adsorption and IBAM refunctionalization was followed by flow cytometry (Figure 4a). Similar to the BrIBAM system, a near-linear increase in fluorescence intensity with increasing number of HSA coating steps was monitored. However, comparison of the fluorescence intensity increments obtained per coating step from flow cytometry for the BrIBAM and IBAM systems (performed with the same acquisition parameters) indicates a significantly lower slope for the IBAM system (ca. 13 au) compared to the BrIBAM system (ca. 23 au). Over five coating steps, the fluorescence intensity of the (IBAM-HSA)<sub>5</sub> films ( $78 \pm 4$  au) was ca. 30% less than that for the (BrIBAM-HSA)<sub>5</sub> films. These results suggest that the IBAM approach is suitable for the assembly and growth of protein films, although significantly less protein is adsorbed (30% less after five coating steps) compared with the BrIBAM approach. Removal of the SiO<sub>2</sub> templates from the IBAM-HSA coated particles for  $n = 2$  and 5 yielded homogeneous and well-dispersed HSA hollow capsules with negligible shrinkage (Figure 4b,c and Supporting Information, Figure S2). AFM images recorded in the dried state (Figure 4e,f) show homogeneous capsules (for  $n = 2$  and 5 HSA coating steps). AFM z-profile analysis (Supporting Information, Figure S3) revealed thinner capsule walls (see thickness graph in Figure 4d) for the IBAM-HSA capsules ( $5.5 \pm 2$  nm for  $n = 2$ ,  $10 \pm 2$  nm for  $n = 5$ ) compared to their BrIBAM-HSA analogues ( $7 \pm 3$  nm for  $n = 2$ ,  $14 \pm 3$  nm for  $n = 5$ ) (Figure 2c,d). Interestingly, when only one HSA coating is assembled on IBAM-modified SiO<sub>2</sub> particles, capsules are not observed (Figure S4). In contrast, two HSA coatings yield (IBAM-HSA)<sub>2</sub> capsules and may constitute a suitable alternative to BrIBAM-HSA capsules when the presence of bromine atoms is not desired. IBAM-mediated binding most likely results from a dense network of hydrogen bonds between the IBAM moieties and the peptide backbone of the proteins. The flow cytometry results and AFM analysis clearly emphasize the simultaneous roles of the amide and bromide functionalities to form noncovalent



**Figure 4.** Growth of IBAM-HSA films and capsules. (a) Evolution of the fluorescence intensity with increasing number of HSA-RITC coating steps on SiO<sub>2</sub> particles, as followed by flow cytometry. Fluorescence microscopy images of IBAM-HSA capsules initially templated onto 5 μm diameter SiO<sub>2</sub> particles after (b)  $n = 2$  and (c)  $n = 5$  HSA-RITC coating steps. (d) Evolution of the capsule wall thickness as a function of the number of HSA coating steps, as determined from AFM z-profile analysis. AFM images of IBAM-HSA capsules initially templated onto 3 μm diameter SiO<sub>2</sub> particles in the dried state after (e)  $n = 2$  and (f)  $n = 5$  HSA coating steps. Scale bars are 10 μm for fluorescence microscopy images and 2 μm for AFM images.

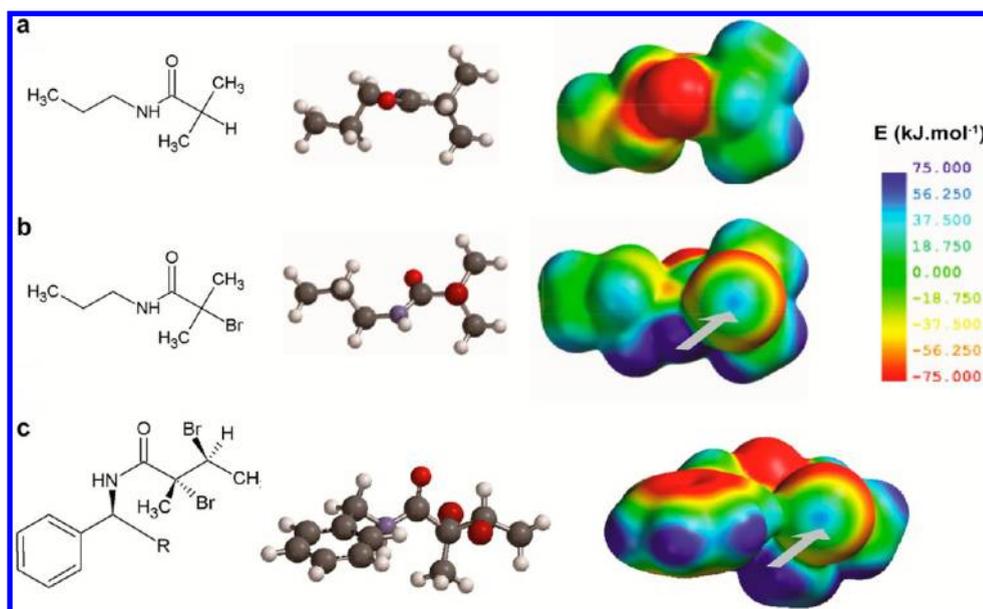
interactions generated within the BrIBAM-HSA and IBAM-HSA assemblies.

To assess the wettability of the BrIBAM and IBAM grafts, water contact angle measurements of silicon slides grafted with BrIBAM and IBAM moieties were performed. Similar values of  $52 \pm 3^\circ$  and  $56 \pm 1^\circ$  were measured for the BrIBAM and IBAM films, respectively, whereas blank silicon slides (control experiments) possessed a lower contact angle value of  $22 \pm 2^\circ$  (Supporting Information, Figure S5). These results demonstrate that BrIBAM and IBAM grafts have a similar and quite significant hydrophobicity, and that the Br atom from the BrIBAM moiety does not increase the hydrophobicity of the films.

**Noncovalent Interactions.** Recently, the implication of the larger halogen atoms (Cl, Br, and I) in the formation of halogen bonds that are able to compete with hydrogen bonds in biological systems has been assessed.<sup>43–50</sup> Here, we calculated the electrostatic potential surfaces of bromine and hydrogen atoms by using the Hartree–Fock quantum model (Figure 5a,b) for the BrIBAM and IBAM compounds. A positive value of the electrostatic potential ( $50 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) calculated at the top of the bromine atom reveals an electron-deficient region (referred to as a “sigma-hole”) that is able to interact favorably with electron donating groups such as oxygen atom lone pairs characteristic of carbonyl groups.<sup>43</sup> In comparison, alkyl hydrogen atoms, such as the methine proton from IBAM, are not able to establish strong bonding interactions with electron donors. This suggests that the bromine extremity of BrIBAM behaves as a Lewis acid that may interact with electron donors present in the HSA proteins. Moreover, such

atomic charge distribution is very similar to that obtained with models of halogenated compounds forming halogen bonds with proteins. Numerous electron donor atoms are present in the polypeptide chains of proteins (N, O, and S) and the most common halogen-bonds encountered between proteins complexed with halogenated compounds involve the oxygen atoms on the protein carbonyl groups.<sup>43,47–49</sup> A recent X-ray crystallography study on dibromo-amide modified taxane bound to tubulin revealed a short and highly directed Br–O contact ( $3.17 \text{ \AA}$ , angle C–Br···O of  $173^\circ$ ) that was identified as a halogen-bond.<sup>50</sup> Figure 5c shows the electrostatic potential surfaces of the dibromo-amide modified taxane that were mapped *via* the same Hartree–Fock model used above. Comparison of the electrostatic potential surfaces for the bromine atom of the dibromo-amide modified taxane forming a halogen-bond with BrIBAM indicates very similar atomic charge distributions and values of electrostatic potential (*ca.*  $51 \text{ kJ mol}^{-1}$  calculated at the top of the bromine). As a result of the theoretical insights obtained through these calculations and data gathered from the literature, we postulate that bromine atoms play a role, through halogen-bonding, in the formation of the thicker BrIBAM-HSA films ( $\sim 30\%$ ) when compared with IBAM-HSA films.

**Biofunctionalization.** Biofunctionalization of the BrIBAM-HSA and IBAM-HSA protein films with other biological macromolecules after subsequent reinitiation with BrIBAM or IBAM grafts was investigated with fluorescently labeled alkaline phosphatase (RITC-labeled, AP-RITC), dextran (fluorescein isothiocyanate-labeled, DEX-FITC) and DNA plasmid (stained with



**Figure 5.** Chemical structures (Lewis and 3D) and *ab initio* electrostatic potential surfaces of (a) an IBAM moiety, (b) a BrIBAM moiety, and (c) a dibromo-amide modified taxane establishing a halogen-bond within tubulin (3.17 Å, angle C–Br...O of 173°).<sup>45</sup> The C–H (IBAM) and equivalent C–Br (BrIBAM) bonds are shown perpendicular to the page. The C–Br bonds of the dibromo-amide modified taxane are also shown perpendicular to the page and the Br establishing a halogen-bond is represented in the front. R represents a part of the brominated taxane molecule distant from the halogen bond. The potential energies are presented in the  $-75$  to  $+75$  kJ mol<sup>-1</sup> range to emphasize the variation in electrostatic potential associated with the halogen atom. The gray arrows point to positive electrostatic potentials at the apex of the bromine atoms and are indicative of the presence of an electron-deficient region (also referred to as a sigma-hole) that are able to establish favorable interactions with electron donating groups such as the lone pairs of carbonyl groups.

green fluorescent YOYO-1, a high affinity nucleic acid stain, DNaP-YOYO). Flow cytometry experiments performed on SiO<sub>2</sub> templates (Figure 6a) coated with (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub> or (IBAM-HSA)<sub>4</sub> protein films indicate that the three biopolymers AP, DEX, and DNaP adsorbed onto the reinitiated protein surface. Moreover, significantly less biopolymer was adsorbed when coated onto IBAM surfaces compared to BrIBAM surfaces (*ca.* 30, 50, and 35% less for AP, DEX, and DNaP, respectively). These results are consistent with the presence of a higher amount of the BrIBAM grafts (compared to IBAM) resulting from a higher protein quantity and thickness, as observed above. Better retention of the biopolymers due to possible interactions with the bromine atoms may also explain this effect. Figure 6b,d show the resulting (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub> capsules functionalized with AP, DEX, and DNaP, respectively. Similar biofunctionalized IBAM-HSA capsules were also obtained (Supporting Information, Figure S6). Retention of the biological functionality of the adsorbed outer layer was assessed using AP-functionalized BrIBAM-HSA capsules. The continuous and linear conversion of *p*-nitrophenylphosphate (PNP) into *p*-nitrophenol (PN) catalyzed by the AP-functionalized BrIBAM-HSA capsules and followed in solution by UV/Vis spectrophotometry (at  $\lambda = 410$  nm, maximum absorption of PN) demonstrates that the adsorbed AP enzymes retain their activity (Figure 6e). Control experiments without any AP coating indicated that neither BrIBAM grafts nor HSA protein promoted

the conversion of PNP into PN. The enzymatic activity of the equivalent amount of alkaline phosphatase with that contained in the AP-functionalized BrIBAM-HSA capsules was also investigated in bulk solution (see details in Supporting Information, Figure S7). The reaction kinetics were found to be considerably faster (*ca.* 150 times) compared with the AP-functionalized BrIBAM-HSA capsules. This effect may be explained by the fact that for the free enzyme in bulk solution, the enzymatic sites are more accessible compared to enzymes and HSA associated within the protein capsule wall.

**Cytotoxicity Studies.** Smaller SiO<sub>2</sub> particle templates (1.11 and 0.585  $\mu$ m diameter) were employed for the formation of HSA capsules with more suitable sizes for biomedical applications and cellular interactions<sup>36,51,52</sup> (*i.e.*,  $\leq 1$   $\mu$ m). The same process as described previously was employed to prepare (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub> and (IBAM-HSA)<sub>4</sub> capsules. After template removal, the capsules were well-defined and readily dispersed in aqueous buffer, thus demonstrating the versatility of the process to tune the size of the capsules. Transmission electronic microscopy (TEM) images of these capsules in the dried state confirmed homogeneous structures with diameters of *ca.* 1 and 0.5  $\mu$ m for both BrIBAM-HSA (Figure 7a,b) and IBAM-HSA (Figure 7c,d) capsules. To assess the effect of these BrIBAM-HSA and IBAM-HSA capsules on cell viability, an MTT assay was conducted by incubating various doses of the two types of HSA capsules (with sizes of 1 and 0.5  $\mu$ m) with HeLa cells (Figure 7e). The results demonstrate that even at a

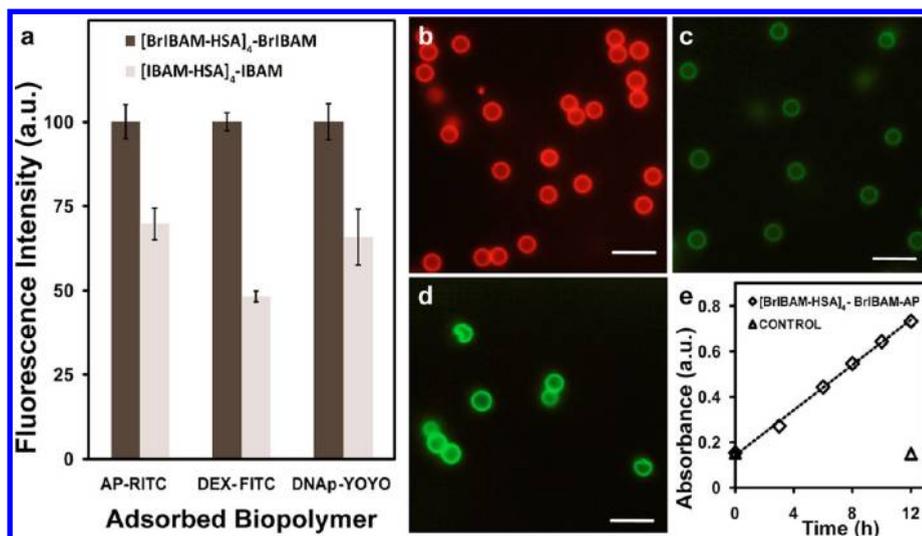


Figure 6. Biofunctionalization of BrIBAM-HSA and IBAM-HSA protein films with biological macromolecules. (a) Comparison followed by flow cytometry of the relative adsorption content of AP, DEX, and DNAP adsorbed onto  $(\text{BrIBAM-HSA})_4\text{-BrIBAM}$  and  $(\text{IBAM-HSA})_4\text{-IBAM}$  protein films coated onto silica templates. Fluorescence intensities are normalized for clarity. Fluorescence microscopy images of  $(\text{BrIBAM-HSA})_4\text{-BrIBAM}$  capsules functionalized with (b) AP-RITC, (c) DEX-FITC, and (d) DNAP-YOYO. Scale bars are  $8\ \mu\text{m}$ . (e) Kinetic plot of the conversion of PNP into PN and a phosphate ion catalyzed by the  $(\text{BrIBAM-HSA})_4\text{-BrIBAM-AP}$  capsules and followed by UV/Vis spectrophotometry at 410 nm.

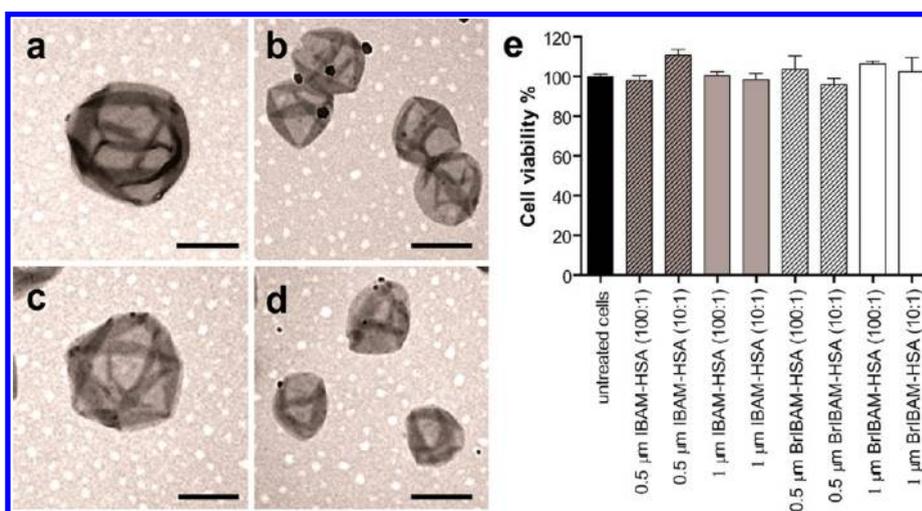
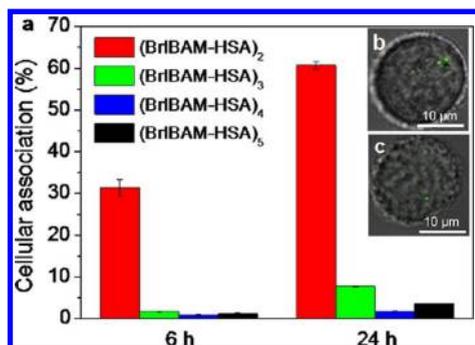


Figure 7. TEM images of  $(\text{BrIBAM-HSA})_4$  capsules with diameters of (a) 1 and (b)  $0.5\ \mu\text{m}$ . TEM images of  $(\text{IBAM-HSA})_4$  capsules with diameters of (c) 1 and (d)  $0.5\ \mu\text{m}$ . Scale bars are  $0.5\ \mu\text{m}$ . (e) Cell viability of HeLa cells incubated with  $(\text{IBAM-HSA})_4$  ( $0.5$  and  $1\ \mu\text{m}$  diameter) and  $(\text{BrIBAM-HSA})_4$  ( $0.5$  and  $1\ \mu\text{m}$  diameter) capsules at different capsule/cell ratios (100:1 and 10:1) for 24 h, as measured by an MTT assay. Cell viability is normalized as a percentage of untreated cells. The data are presented with the mean and standard error of two independent experiments, each performed in triplicate.

high dose (ca. 100 capsules per cell), the cell viability and metabolic activity after an incubation period of 24 h are not significantly affected by the capsules (compared with untreated cells), suggesting no significant cytotoxicity. Following this initial study on cell viability in the presence of the capsules, further investigations *in vitro* and *in vivo* will be required to fully assess the biocompatibility of these capsules.

**Cellular Association with BrIBAM-HSA Capsules.** We next investigated the effect of capsule wall thickness on cellular association. AlexaFluor (AF) 488-labeled BrIBAM-HSA capsules ( $1\ \mu\text{m}$  in diameter) with different

HSA layer numbers (from 2 to 5) were incubated with HeLa cells at a capsule-to-cell ratio of 100:1. The extent of cellular association at 6 and 24 h was evaluated using flow cytometry. It was shown that approximately 32% and 63% of the cells were associated with  $(\text{BrIBAM-HSA})_2$  capsules after incubation for 6 and 24 h, respectively, which is significantly higher than the other multilayered  $(\text{BrIBAM-HSA})_n$  capsules with  $n = 3-5$  for the same time periods (Figure 8a). The higher extent of  $(\text{BrIBAM-HSA})_2$  capsule internalization was confirmed by deconvolution fluorescence microscopy imaging. Microscopy images show that significantly



**Figure 8.** Interaction of AF488-labeled BrIBAM-HSA capsules composed of different layer numbers with HeLa cells for 6 and 24 h incubation at 37 °C. (a) Percentage of cells associated with capsules was quantified by flow cytometry. Data are the mean  $\pm$  standard deviation. At least 5000 cells were analyzed in each experiment. Representative images of cells internalized with (b) (BrIBAM-HSA)<sub>2</sub> or (c) (BrIBAM-HSA)<sub>5</sub> capsules are shown.

more (BrIBAM-HSA)<sub>2</sub> capsules (Figure 8b) were internalized in HeLa cells compared with (BrIBAM-HSA)<sub>5</sub> capsules (Figure 8c). Previous studies have demonstrated that the internalization of hollow capsules involves capsule deformation.<sup>53,54</sup> Furthermore, Fery *et al.* reported that the stiffness of polyelectrolyte capsule shells is proportional to the square of the shell thickness.<sup>55,56</sup> We postulate that the (BrIBAM-HSA)<sub>2</sub> capsules are the most flexible among the series of HSA capsules studied, favoring deformation and resulting in enhanced cellular uptake. Taken together, these results show that the sequential assembly of HSA capsules *via* BrIBAM grafts affords control over cellular uptake of the capsules. This opens the way for possibilities in biomedical applications, such as targeted drug delivery, where the balance between improved biodistribution and high rate of drug administration are closely linked with cellular uptake.

## METHODS

**Materials.** 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS), ethanol (EtOH), ammonium hydroxide solution (28 wt % in water), isobutyryl chloride (IBC), 2-bromoisobutyryl bromide (BrIB), triethylamine (Et<sub>3</sub>N), *N,N*-dimethylformamide (DMF), rhodamine B isothiocyanate (RITC), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), dimethylsulfoxide (DMSO), acetone, urea, hydrofluoric acid (HF, 48 wt % in H<sub>2</sub>O), ammonium fluoride, poly(ethylene imine) (PEI), human serum albumin (HSA), alkaline phosphatase (AP) from bovine intestinal mucosa, *p*-nitrophenylphosphate (PNP), and FITC labeled dextran (FITC-DEX) (*M<sub>w</sub>* = 70 kDa) were obtained from Sigma-Aldrich and used as received. DNA plasmid (DNAP) was provided by A.W. Püschel (Münster Universität, Germany) (pBK-ha-NRP1). Nonporous silica particles of various sizes (5 wt % suspensions, average diameters of 5.35, 3.25, 1.11, and 0.585  $\mu$ m) were obtained from Microparticles GmbH (Berlin, Germany). YOYO-1 iodide DNA-stain, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Alexa Fluor 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (AF488), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), and (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) were purchased from Invitrogen and used as received.

## CONCLUSION

The preparation of sequentially assembled noncovalent protein films based on the physical adsorption of HSA and chemical refunctionalization with isobutyramide grafts (*i.e.*, isobutyramide or bromoisobutyramide) was reported. This approach allows for the formation of protein films with controlled growth profiles onto silica particles that, after template removal, yield hollow protein capsules with controllable wall thicknesses. These protein capsules displayed no significant cytotoxicity toward HeLa cells and their capsule wall thickness was found to influence their cellular uptake of HSA capsules, suggesting that the sequential assembly approach has significant potential for tailored cell studies. Versatile biofunctionalization of such protein capsules was demonstrated with the efficient formation of AP-, DEX-, and DNA plasmid-coated protein capsules that maintain biofunctionality, as demonstrated with AP-functionalized BrIBAM-HSA capsules. On the basis of the differences observed for the BrIBAM-HSA and IBAM-HSA systems, the driving force for protein assembly was hypothesized to result from a network of hydrogen- and halogen-bonding interactions arising from the amide groups and bromine atoms, respectively. Understanding the processes associated with the cohesion of such protein assemblies is of primary importance to develop smart bioresponsive materials. Current investigations are focused on elucidating the local structure of the protein films, including the degree of organization and electronic environment at the molecular/atomic level around the BrIBAM and IBAM moieties. In addition, functionalization of the capsules with cell-targeting biomolecules (*e.g.*, sugars or aptamers) and therapeutic drugs is under investigation.

**Fluorescent Labeling of HSA and AP.** HSA was fluorescently labeled with RITC using a HSA:RITC mole ratio of 1:2. RITC was dissolved in DMSO (10 mg mL<sup>-1</sup>) and gently mixed with a solution of HSA (10 mg mL<sup>-1</sup>) dissolved in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH 8.5) for 1 h. An identical procedure was employed for AP-RITC. HSA-RITC and AP-RITC were purified by size exclusion chromatography (SEC). The SEC column was equilibrated with Milli-Q water (20 mL) and then loaded with the concentrated protein solutions. The purified HSA-RITC and AP-RITC were then collected by eluting with Milli-Q water. For cell association experiments, HSA was labeled with AF488. Briefly, 30 mg of HSA was dissolved in 50 mM PBS buffer (pH 7.4). The mixture was stirred for 3 h and dialyzed against Milli-Q water to purify the AF488-labeled HSA. The labeled HSA was freeze-dried and stored at 4 °C before use.

**Bromoisobutyramide (BrIBAM)- and Isobutyramide (IBAM)-Modified Silica Particles.** Nonporous silica particles (200  $\mu$ L, 5 wt % in EtOH) were dispersed in a solution of EtOH (500  $\mu$ L) containing ammonium hydroxide solution (30  $\mu$ L, 30 wt % in water) and APTS (125  $\mu$ L). After 2 h, the amino-modified particles were isolated *via* centrifugation and washed with EtOH (1  $\times$  200  $\mu$ L) and DMF (3  $\times$  200  $\mu$ L). A solution containing BrIB (65  $\mu$ L) in anhydrous DMF (400  $\mu$ L) was added dropwise to the amino-modified silica

particles previously dispersed in a solution of DMF (400  $\mu\text{L}$ ) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (40  $\mu\text{L}$ ). After 2 h, Milli-Q water (200  $\mu\text{L}$ ) was added to dissolve the formed precipitates, and the resulting particles were isolated *via* centrifugation and washed with DMF (3  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ). The same procedure was used to prepare IBAM-modified silica particles with the exception that IBC (55  $\mu\text{L}$ ) was used in place of BrIB.

**Protein Coating and Refunctionalization Processes.** BrIBAM- and IBAM-modified silica particles dispersed in DMF (100  $\mu\text{L}$ , 5 wt %) were added to aqueous solutions of HSA-RITC (1.0 mL, 0.25 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) and allowed to stand for 30 min, followed by centrifugation and washing with Milli-Q water (1 mL). The resulting BrIBAM-HSA and IBAM-HSA coated particles ( $n = 1$  coating step) were washed with anhydrous DMF (3  $\times$  100  $\mu\text{L}$ ) and redispersed in a solution of DMF (200  $\mu\text{L}$ ) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (20  $\mu\text{L}$ ). Separately, BrIB (32  $\mu\text{L}$ ) and IBC (27  $\mu\text{L}$ ) were dissolved in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) and slowly added to the previously dispersed BrIBAM-HSA and IBAM-HSA coated particles, respectively. After 2 h, Milli-Q water (100  $\mu\text{L}$ ) was added to dissolve the formed precipitates and the resulting particles were isolated *via* centrifugation and washed with DMF (3  $\times$  100  $\mu\text{L}$ ). A second HSA coating step was performed by addition of the particles to a fresh solution of HSA-RITC (1.0 mL, 0.25 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) in Milli-Q water for 30 min followed by centrifugation and washing with Milli-Q water (1 mL). After analysis, these HSA-coated particles ( $n = 2$  coating steps) were refunctionalized with BrIBAM and IBAM moieties and HSA coating was repeated according to the above procedure to afford particles with up to five HSA coatings ( $n = 5$ ).

**Biofunctionalization.** (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub> coated particles were first refunctionalized with BrIBAM moieties *via* the protocol described above and subsequently biofunctionalized by the adsorption (1 h) of AP-RITC (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), DEX-FITC (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), or DNAP (0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) in Milli-Q water (1 mL) followed by centrifugation and washing with Milli-Q water (1 mL). YOYO-1 aqueous solution (10000 fold dilution) as a green fluorescent DNA stain was added for 20 min to the (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub>-BrIBAM-DNAP coated particles (0.1 wt %) followed by particle washing with Milli-Q water. (IBAM-HSA)<sub>4</sub> coated particles were refunctionalized with IBAM moieties and biofunctionalized *via* the same procedure.

**Preparation of HSA and HSA-biopolymer (AP, DEX, or DNA) Capsules.** *Caution! This method utilized HF which is highly toxic and great care must be taken when handling.*

For one HSA coating ( $n = 1$ ), the BrIBAM-HSA coated particles (1  $\mu\text{L}$ , 0.5 wt %) were deposited onto a PEI-coated slide (glass, silicon, or gold wafer) and brought into contact with ammonium fluoride (8 M) buffered HF (2 M) ( $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$ , 1  $\mu\text{L}$ , pH 5) for 1 min, followed by extensive rinsing of the slide with Milli-Q water. For  $n \geq 2$  HSA coating steps ( $n = 2-5$ ), BrIBAM-HSA coated particles (100  $\mu\text{L}$ , 1 wt %) and IBAM-HSA coated particles (100  $\mu\text{L}$ , 1 wt %) were added to ammonium fluoride (250  $\mu\text{L}$ , 8 M) buffered HF (2 M, pH 4) and mixed very gently for 2 min. The resulting capsules were then centrifuged at low speed (1800–2000  $g$ ) for 15 min and washed with Milli-Q water (3  $\times$  50  $\mu\text{L}$ ). The process is identical to that used for the HSA-biopolymer capsules.

**Measurement of Enzymatic Activity of HSA-AP Capsules.** Enzymatic activity of (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub>-BrIBAM-AP capsules was detected by using *p*-nitrophenylphosphate (PNP). The PNP solution (1 mL) at a concentration of 1.7 mg  $\text{mL}^{-1}$  in 0.05 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH = 8.5) was brought in contact with the (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub>-BrIBAM-AP capsules and the subsequent formation of *p*-nitrophenol (PN) and a phosphate ion by enzymatic conversion of PNP was followed by UV/Vis spectrophotometry at  $\lambda = 410$  nm (maximum absorption).

**Cell Viability Experiments.** HeLa cells were cultured in DMEM media containing 10% FBS at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Cell viability was measured by reduction of MTT, as described previously.<sup>57</sup> Briefly, HeLa cells were seeded at  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well plates and incubated with capsules at various ratios in 200  $\mu\text{L}$  of growth media for 24 h. After treatment, cells were further incubated with fresh medium containing MTT (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) for 4 h. The resulting blue formazan was solubilized using 150  $\mu\text{L}$  of acidified isopropyl alcohol (0.04 N HCl), and the absorbance at 570 nm was measured with a plate reader (Multiskan Ascent, Thermo Scientific). The cell viability of treated cells was normalized as a percentage of untreated cells. The mean  $\pm$  the standard errors were

calculated from two independent experiments performed in triplicate.

**Cellular Association Experiments.** HeLa cells were plated at  $7.5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates. AF488-labeled HSA capsules with various layers of HSA (from 2 to 5 layers) were added to the cells at a capsule-to-cell ratio of 100:1. The cells were incubated with the capsules at 37 °C for 6 and 24 h. After the treatment, the cells were washed with DPBS three times, trypsinized, and resuspended in DPBS. The cellular association was analyzed by flow cytometry. Experiments were performed in duplicate, and at least 5000 cells were analyzed in each experiment.

**Characterization Methods. Flow Cytometry.** A Cyflow Space (Partec GmbH) flow cytometer using an excitation wavelength of 488 nm (emission filter of 560–590 nm) was used to follow the growth of the BrIBAM-HSA-RITC and IBAM-HSA-RITC films on silica particles in Milli-Q water (pH 5.8). Flow cytometry graphs show evolution of fluorescence intensity (au) with the number of HSA coating steps. At least 20000 particles were analyzed in each experiment. A Miltenyi flow cytometer using an excitation wavelength of 488 nm (emission filters of 490–520 nm and 560–590 nm) was used to compare the relative amount of fluorescently labeled AP-RITC, DEX-FITC, and YOYO-1 stained DNAP onto (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub> and (IBAM-HSA)<sub>4</sub> coated silica particles. At least 20000 particles were analyzed in each experiment.

**Bright Field and Fluorescence Microscopy.** Images of the protein-coated silica particles and protein capsules were taken using an Olympus IX71 inverted fluorescence microscope equipped with a DIC slider (U-DICT, Olympus), the corresponding filter sets, and a 60 $\times$  oil immersion objective (Olympus UPL20/0.5NA, W.D. 1.6).

**Atomic Force Microscopy (AFM).** The imaged protein capsules were deposited onto PEI-coated silicon wafers, rinsed extensively with Milli-Q water, and allowed to air-dry. AFM scans of the capsules were carried out with a JPK NanoWizard2 Bio-AFM and with a D3000 Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, CA). Typical scans were conducted in intermittent contact mode (AC mode) with silicon cantilevers (NSC/CSC) (MikroMasch, Bulgaria) using the accompanying JPK image processing software and in contact mode with a silicon nitride tip (model MSCT-AUHW, Veeco, Santa Barbara, CA) using the accompanying Veeco processing software.

**Contact Angle Measurements.** Contact angle was measured on a Digidrop (Romans, France) apparatus. Three droplets of pure water (2  $\mu\text{L}$ ) were deposited and analyzed for each sample.

**UV/Vis Spectrophotometry.** A SAFAS (Monaco) spectrophotometer was used to measure evolution of the absorbance as a function of the time of *p*-nitrophenol (PN) formation catalyzed by the (BrIBAM-HSA)<sub>4</sub>-BrIBAM-AP capsules in  $\text{NaHCO}_3$  buffer solution (pH 8.5, 0.05 M).

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** HSA capsules were deposited onto Formvar-coated copper grids, rinsed extensively with Milli-Q water, and allowed to dry in air. TEM analysis was carried out with a Philips CM120 BiotWIN instrument operated at 120 kV.

**Theoretical Study: Mapping of Electrostatic Potential Surface (Hartree–Fock Model).** The methodology used here is similar to that used in a study describing the importance of halogen bonds in biological systems.<sup>48</sup> Molecular models of the BrIBAM and IBAM moieties were constructed and their geometries optimized at the 3-21G<sup>(\*)</sup> Hartree–Fock level (Figure 5). Electrostatic potential surfaces were generated by mapping the 3-21G<sup>(\*)</sup> electrostatic potentials onto surfaces of molecular electron density (0.002 electron per  $\text{\AA}^3$ ) by using the SPARTAN program (Wave function, Irvine, CA). Note that the 3-21G<sup>(\*)</sup> basis set was used because the 6-31G<sup>(\*)</sup> basis set and above are incomplete for bromine atoms. The limitations related to the use of electrostatic potential surfaces are discussed at length by Mecozzi *et al.* who demonstrated their usefulness in providing quantitative guidelines for evaluating the ability of aromatic compounds to form cation– $\pi$  interactions.<sup>58</sup>

**Conflict of Interest:** The authors declare no competing financial interest.

**Acknowledgment.** This work was supported by the Australian Research Council under the Discovery (F.C.) and Federation

Fellowship (F.C.) schemes. We thank R. Curtain, A. Grant, and T. Gengenbach for helpful discussions regarding analysis techniques. F. Boulmedais, P. Schaaf and J. Best are thanked for helpful discussion. J. Aitken is acknowledged for preliminary analysis of EXAFS spectra performed at the Australian Synchrotron, Melbourne.

*Supporting Information Available:* AFM images and z-profile analysis of BrIBAM-HSA and IBAM-HSA capsules, bright field images of IBAM-HSA capsules, contact angle measurements, fluorescence microscopy images of IBAM-HSA biofunctionalized capsules with AP, DEX, and DNAP and enzymatic activity of alkaline phosphatase in solution. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES AND NOTES

- Vörös, J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 553–561.
- Hook, F.; Vörös, J.; Rodahl, M.; Kurrat, R.; Boni, P.; Ramsden, J. J.; Textor, M.; Spencer, N. D.; Tengvall, P.; Gold, J.; *et al.* A Comparative Study of Protein Adsorption on Titanium Oxide Surfaces Using *in Situ* Ellipsometry, Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy, and Quartz Crystal Microbalance/Dissipation. *Colloids Surf., B-Biointerfaces* **2002**, *24*, 155–170.
- Ladam, G.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Voegel, J.-C. Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films. *Langmuir* **2001**, *17*, 878–882.
- Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117–6123.
- Mertz, D.; Vogt, C.; Hemmerle, J.; Mutterer, J.; Ball, V.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Lavalle, P. Mechanotransductive Surfaces for Reversible Biocatalysis Activation. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 731–735.
- Mertz, D.; Vogt, C.; Hemmerle, J.; Debry, C.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Lavalle, P. Tailored Design of Mechanically Sensitive Biocatalytic Assemblies Based on Polyelectrolyte Multilayers. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 8324–8331.
- Balabushevich, N. G.; Tiourina, O. P.; Volodkin, D. V.; Larionova, N. I.; Sukhorukov, G. B. Loading the Multilayer Dextran Sulfate/Protamine Microsized Capsules with Peroxidase. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1191–1197.
- Tiourina, O. P.; Sukhorukov, G. B. Multilayer Alginate/Protamine Microsized Capsules: Encapsulation of  $\alpha$ -Chymotrypsin and Controlled Release Study. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 155–161.
- Duan, L.; He, Q.; Wang, K. W.; Yan, X. H.; Cui, Y.; Möhwald, H.; Li, J. B. Adenosine Triphosphate Biosynthesis Catalyzed by FOF1 ATP Synthase Assembled in Polymer Microcapsules. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6996–7000.
- Li, J.; Möhwald, H.; An, Z.; Lu, G. Molecular Assembly of Biomimetic Microcapsules. *Soft Matter* **2005**, *1*, 259–264.
- Song, W.; He, Q.; Cui, Y.; Möhwald, H.; Diez, S.; Li, J. Assembled Capsules Transportation Driven by Motor Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *379*, 175–178.
- Shchepelina, O.; Drachuk, I.; Gupta, M. K.; Lin, J.; Tsukruk, V. V. Silk-on-Silk Layer-by-Layer Microcapsules. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4655–4660.
- Gazit, E. Self-Assembled Peptide Nanostructures: The Design of Molecular Building Blocks and Their Technological Utilization. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1263–1269.
- Knowles, T. P. J.; Oppenheim, T. W.; Buell, A. K.; Chirgadze, D. Y.; Welland, M. E. Nanostructured Films from Hierarchical Self-Assembly of Amyloidogenic Proteins. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 204–207.
- Ulijn, R. V.; Smith, A. M. Designing Peptide-Based Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664–675.
- Toksoz, S.; Guler, M. O. Self-Assembled Peptidic Nanostructures. *Nano Today* **2009**, *4*, 458–469.
- Zhang, S.; Marini, D. M.; Hwang, W.; Santoso, S. Design of Nanostructured Biological Materials through Self-Assembly of Peptides and Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 865–871.
- Duan, L.; He, Q.; Yan, X.; Cui, Y.; Wang, K.; Li, J. Hemoglobin Protein Hollow Shells Fabricated through Covalent Layer-by-Layer Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 357–362.
- Qi, W.; Yan, X. H.; Juan, L.; Cui, Y.; Yang, Y.; Li, J. B. Glucose-Sensitive Microcapsules from Glutaraldehyde Cross-Linked Hemoglobin and Glucose Oxidase. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1212–1216.
- Tong, W.; Gao, C.; Möhwald, H. pH-Responsive Protein Microcapsules Fabricated via Glutaraldehyde Mediated Covalent Layer-by-Layer Assembly. *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286*, 1103–1109.
- Furst, W.; Banerjee, A. Release of Glutaraldehyde from an Albumin–Glutaraldehyde Tissue Adhesive Causes Significant *In Vitro* and *In Vivo* Toxicity. *Ann. Thorac. Surg.* **2005**, *79*, 1522–1528.
- Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 13–36.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19–34.
- Mart, R. J.; Osborne, R. D.; Stevens, M. M.; Ulijn, R. V. Peptide-Based Stimuli-Responsive Biomaterials. *Soft Matter* **2006**, *2*, 822–835.
- Mi, L.; Fischer, S.; Chung, B.; Sundelacruz, S.; Harden, J. L. Self-Assembling Protein Hydrogels with Modular Integrin Binding Domains. *Biomacromolecules* **2005**, *7*, 38–47.
- Wang, C.; Stewart, R. J.; Kopecek, J. Hybrid Hydrogels Assembled from Synthetic Polymers and Coiled-Coil Protein Domains. *Nature* **1999**, *397*, 417–420.
- Westhaus, E.; Messersmith, P. B. Triggered Release of Calcium from Lipid Vesicles: A Bioinspired Strategy for Rapid Gelation of Polysaccharide and Protein Hydrogels. *Biomaterials* **2001**, *22*, 453–462.
- Brandl, F.; Sommer, F.; Goepferich, A. Rational Design of Hydrogels for Tissue Engineering: Impact of Physical Factors on Cell Behavior. *Biomaterials* **2007**, *28*, 134–146.
- Kim, B.; Lam, C. N.; Olsen, B. D. Nanopatterned Protein Films Directed by Ionic Complexation with Water-Soluble Diblock Copolymers. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4572–4580.
- Ji, J.; Li, B.; Zhong, W.-H. An Ultraelastic Poly(ethylene oxide)/Soy Protein Film with Fully Amorphous Structure. *Macromolecules* **2012**, *45*, 602–606.
- Dierendonck, M.; De Koker, S.; De Rycke, R.; Bogaert, P.; Grooten, J.; Vervae, C.; Remon, J. P.; De Geest, B. G. Single-Step Formation of Degradable Intracellular Biomolecule Microreactors. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6886–6893.
- Volodkin, D. V.; von Klitzing, R.; Möhwald, H. Pure Protein Microspheres by Calcium Carbonate Templating. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9258–9261.
- Volodkin, D. V.; Schmidt, S.; Fernandes, P.; Larionova, N. I.; Sukhorukov, G. B.; Duschl, C.; Möhwald, H.; von Klitzing, R. One-Step Formulation of Protein Microparticles with Tailored Properties: Hard Templating at Soft Conditions. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 1914–1922.
- Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787–796.
- Varshney, A.; Sen, P.; Ahmad, E.; Rehan, M.; Subbarao, N.; Khan, R. H. Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo be Utilized? *Chirality* **2010**, *22*, 77–87.
- Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 615–627.
- Kratz, F. Albumin as a Drug Carrier: Design of Prodrugs, Drug Conjugates and Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 171–183.
- Lu, G.; An, Z.; Tao, C.; Li, J. Microcapsule Assembly of Human Serum Albumin at the Liquid/Liquid Interface by the Pendant Drop Technique. *Langmuir* **2004**, *20*, 8401–8403.

39. An, Z.; Lu, G.; Möhwald, H.; Li, J. Self-Assembly of Human Serum Albumin (HSA) and L- $\alpha$ -Dimyristoylphosphatidic Acid (DMPA) Microcapsules for Controlled Drug Release. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 5848–5852.
40. An, Z.; Tao, C.; Lu, G.; Möhwald, H.; Zheng, S.; Cui, Y.; Li, J. Fabrication and Characterization of Human Serum Albumin and L- $\alpha$ -Dimyristoylphosphatidic Acid Microcapsules Based on Template Technique. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 2514–2519.
41. An, Z.; Möhwald, H.; Li, J. pH Controlled Permeability of Lipid/Protein Biomimetic Microcapsules. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 580–585.
42. Mertz, D.; Tan, P.; Wang, Y.; Goh, T. K.; Blencowe, A.; Caruso, F. Bromoisobutyramide as an Intermolecular Surface Binder for the Preparation of Free-Standing Biopolymer Assemblies. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5668–5673.
43. Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. Halogen Bonds in Biological Molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 16789–16794.
44. Metrangolo, P.; Resnati, G.; Pilati, T.; Liantonio, R.; Meyer, F. Engineering Functional Materials by Halogen Bonding. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 1–15.
45. Metrangolo, P.; Meyer, F.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. Halogen Bonding in Supramolecular Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6114–6127.
46. Metrangolo, P.; Resnati, G. Chemistry—Halogen versus Hydrogen. *Science* **2008**, *321*, 918–919.
47. Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J.; *et al.* Systematic Investigation of Halogen Bonding in Protein–Ligand Interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 314–318.
48. Lu, Y.; Wang, Y.; Zhu, W. Nonbonding Interactions of Organic Halogens in Biological Systems: Implications for Drug Discovery and Biomolecular Design. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *12*, 4543–4551.
49. Parisini, E.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. Halogen Bonding In Halocarbon–Protein Complexes: A Structural Survey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2267–2278.
50. Jiang, Y.; Alcaraz, A. A.; Chen, J. M.; Kobayashi, H.; Lu, Y. J.; Snyder, J. P. Diastereomers of Dibromo-7-epi-10-deacetylcephalomannine: Crowded and Cytotoxic Taxanes Exhibit Halogen Bonds. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1891–1899.
51. Becker, A. L.; Johnston, A. P. R.; Caruso, F. Layer-by-Layer-Assembled Capsules and Films for Therapeutic Delivery. *Small* **2010**, *6*, 1836–1852.
52. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles *via* the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 159–169.
53. Javier, M. A.; Kreft, O.; Semmling, M.; Kempter, S.; Skirtach, A. G.; Bruns, O. T.; del Pino, P.; Bedard, M. F.; Rädler, J.; Käs, J.; *et al.* Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4281–4287.
54. Yan, Y.; Johnston, A. P. R.; Dodds, S. J.; Kamphuis, M. M. J.; Ferguson, C.; Parton, R. G.; Nice, E. C.; Heath, J. K.; Caruso, F. Uptake and Intracellular Fate of Disulfide-Bonded Polymer Hydrogel Capsules for Doxorubicin Delivery to Colorectal Cancer Cells. *ACS Nano* **2010**, *4*, 2928–2936.
55. Elsner, N.; Dubreuil, F.; Weinkamer, R.; Wasicek, M.; Fischer, F. D.; Fery, A.; Grundke, K.; Stamm, M.; Adler, H.-J. Mechanical Properties of Freestanding Polyelectrolyte Capsules: A Quantitative Approach Based on Shell Theory. In *Characterization of Polymer Surfaces and Thin Films*; Grundke, K., Stamm, M., Adler, H.-J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, 2006; pp 117–123.
56. Fery, A.; Weinkamer, R. Mechanical Properties of Micro- and Nanocapsules: Single-Capsule Measurements. *Polymer* **2007**, *48*, 7221–7235.
57. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
58. Mecozzi, S.; West, A. P.; Dougherty, D. A. Cation- $\pi$  Interactions in Aromatics of Biological and Medicinal Interest:

Electrostatic Potential Surfaces as a Useful Qualitative Guide. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 10566–10571.

**Publication n°4 : Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C.** Isabel Fofana, Fei Xiao, Christine Thumann, Roxane Alles, Laurent Mailly, Eric Robinet, Nicolas Meyer, Mickaël Schaeffer, François Habersetzer, Michel Doffoël, Pieter Leyssen, Johan Neyts, Mirjam B. Zeisel and Thomas F. Baumert. **(Manuscrit soumis à Hepatology)**

Nous avons souhaité étudier l'efficacité antivirale ainsi que la toxicité d'inhibiteurs de l'entrée du HCV (tels que CD81, SR-BI, et CLDN-1) en combinaison avec différentes molécules antivirales (IFN-  $\alpha$ , DAA, HTA) *in vitro*. Pour cela, nous avons réalisé un screening d'un grand nombre de combinaisons de ces molécules et d'anticorps ciblant les inhibiteurs d'entrée, mettant en évidence la présence de synergie d'inhibition marquée entre certaines molécules à différentes concentrations sans toxicité remarquable. Ces résultats suggèrent le développement de nouvelles stratégies antivirales basées sur ces synergies.

**Ma participation :** réalisation d'une partie des expériences de combinaisons, maîtrise et mise en place de séquences d'actions à l'aide d'un logiciel pour programmer un robot afin d'automatiser une partie du screening.

# Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C

Isabel Fofana<sup>1,2\*</sup>, Fei Xiao<sup>1,2\*</sup>, Christine Thumann<sup>1,2</sup>, Roxane Alles<sup>1,2,3</sup>, Laurent Maily<sup>1,2</sup>,  
Eric Robinet<sup>1,2</sup>, Nicolas Meyer<sup>4</sup>, Mickaël Schaeffer<sup>4</sup>, François Habersetzer<sup>1,2,5</sup>,  
Michel Doffoël<sup>1,2,5</sup>, Pieter Leyssen<sup>6</sup>, Johan Neyts<sup>6</sup>, Mirjam B. Zeisel<sup>1,2</sup> and  
Thomas F. Baumert<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1110, Strasbourg, France, <sup>2</sup>University of Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>3</sup>Inserm, U977, Strasbourg, France, <sup>4</sup>Pôle de Santé Publique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>5</sup>Pôle Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>6</sup>Rega Institute for Medical Research, KULeuven, Leuven, Belgium.

\*contributed equally

**Word count:** title – 113 characters, abstract – 248 words, text – 4,948 words, 6 figures, 1 table

**Correspondence:** Prof. Thomas F. Baumert, M. D., Inserm Unit 1110, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; Phone: (+33) 3 68 85 37 03, Fax: (+33) 3 68 85 37 24, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr

**Keywords:** host-targeting agents; resistance; transplantation; treatment

**Abbreviations:** CI - combination index; CLDN - claudin; CTRL - control; DAA - direct-acting antiviral; HCV - hepatitis C virus; HCVcc - cell culture-derived HCV; HTA - host-targeting agent; IC – inhibitory concentration; IFN - interferon; mAb - monoclonal antibody; MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PKI – protein kinase inhibitor.

## Author contribution

I.F. and F.X. contributed equally to this work. T. F. B. initiated, designed and supervised research. I.F., F.X., C.T., R.A., L.M., E.R., P.L., J.N., M.B.Z. and T.F.B. performed research. I.F., F.X., C.T., R.A., L.M., E.R., P.L., J.N., M.B.Z. and T.F.B. analyzed data. N.M. and M.S. performed statistical analyses. F.H. and M.D. provided reagents. I.F., M.B.Z. and T.F.B. wrote the paper.

## Grant support

This work was supported by Inserm, University of Strasbourg, the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT, INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2009 and 2012, EU FP7 HepaMab), ANRS (2011/132, 2012/239, 2013/108), Laboratoire d'excellence LabEx HEPSYS (Investissement d'Avenir; ANR-10-LAB-28), the Institut Hospitalo-Universitaire Mix-Surg and the Direction Générale de l'Offre de Soins (A12027MS). The group in Leuven was funded by a grant from the Fund for Scientific Research (FWO) (G.0728.09N) and KULeuven GOA 10/014.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest. Inserm and the University of Strasbourg have filed patent applications on the synergy of interferons, direct-acting antivirals and entry inhibitors as well as SR-BI-specific antibodies, erlotinib, dasatinib for prevention and treatment of HCV infection. Inserm, University of Strasbourg and Genovac have filed a patent application for claudin-1 specific-antibodies for prevention and treatment of HCV infection.

## ABSTRACT

There is an unmet medical need for novel strategies for prevention of hepatitis C virus (HCV) graft infection following liver transplantation and a need to develop more efficient and better tolerated combination therapies for chronic infection in particular for difficult-to-treat patients. Although having improved the overall outcome of HCV therapy, triple combination treatment has limitations. Viral entry is a promising target for antiviral therapy. We and others have shown that compounds targeting HCV cell entry factors efficiently inhibit infection in a pan-genotypic manner and are efficient against escape variants. Aiming to explore the role of entry inhibitors for future clinical development, we investigated the antiviral efficacy and toxicity of entry inhibitors in combination with DAAs or other host-targeting agents (HTAs) in cell culture models. Screening a large series of combinations of entry inhibitors with DAAs or other HTAs, we uncovered novel combinations of antivirals for prevention and treatment of HCV infection. Combinations including CD81-, SR-BI- or claudin-1-specific antibodies or small molecule inhibitors erlotinib and dasatinib were characterized by a marked and synergistic inhibition of HCV infection over a broad range of concentrations with undetectable toxicity in experimental designs for prevention and treatment. **Conclusion:** Our results provide a rationale for the development of antiviral strategies combining entry inhibitors with DAAs or HTAs by taking advantage of synergy. The uncovered combinations provide perspectives for efficient strategies to prevent liver graft infection and novel IFN- $\alpha$  free regimens for difficult-to-treat patients.

## INTRODUCTION

The new standard-of-care (SOC) in chronic genotype 1 hepatitis C virus (HCV) infection consists of pegylated interferon- $\alpha$  (PEG-IFN- $\alpha$ ), ribavirin (RBV) and a protease inhibitor - telaprevir or boceprevir<sup>1</sup>. Although markedly improving the sustained virologic response rate<sup>1-5</sup>, an important limitation of protease inhibitors remains their low genetic barrier for resistance. This limitation results in the emergence of drug-escape mutants during long-term treatment<sup>6, 7</sup>. Moreover, protease inhibitors are associated with significant side effects, in addition to the considerable side effects of IFN- $\alpha$  and RBV<sup>8</sup> and are not licensed for non HCV-1 genotypes. A large number of other direct-acting antivirals (DAAs) are evaluated in combination with PEG-IFN- $\alpha$  or in IFN-free regimens with or without RBV<sup>1, 9, 10</sup>. Eradication of HCV in IFN-free regimens has been demonstrated in clinical trials<sup>8</sup>. Nevertheless, viral breakthroughs due to the selection of HCV resistant-variants to the administered DAAs and differences in virologic outcomes for different genotypes and subtypes have been reported<sup>8</sup>. Furthermore, several of these drugs are associated with side effects and raise issues related to drug-drug interactions<sup>8</sup>. Finally, there is increasing evidence that DAA-based therapies appear to be less effective in difficult-to-treat patients, such as partial non-responders or null-responders to prior PEG-IFN- $\alpha$ /RBV therapy, patients with advanced liver disease, and transplant, HIV/HCV-coinfected, hemodialyzed, or immune-compromised patients<sup>6, 11</sup>.

Among the most difficult-to-treat patient groups are individuals with HCV-induced end-stage liver disease undergoing liver transplantation (LT)<sup>12-14</sup>. Due to viral evasion from host immune responses and absence of preventive antiviral strategies, graft re-infection is universal. Moreover, IFN-based therapies have limited efficacy and tolerability in LT recipients<sup>12</sup>. The use of telaprevir and boceprevir is limited by drug-drug interactions if combined with immunosuppressive agents<sup>15, 16</sup>. Furthermore, emergence of resistant strains will certainly be higher in these patients because of lower efficacy of SOC and greater need for dose adjustments<sup>12</sup>. These challenges define a need for novel combinations of therapeutics, ideally targeting complementary steps of the viral life cycle, with improved efficacy and safety.

A promising antiviral target complementary to targets of SOC and DAAs is viral cell entry. HCV entry is the first step of virus-host cell interactions and is required for dissemination and

maintenance of infection<sup>17</sup>. Viral entry plays an important role for pathogenesis of HCV infection, especially during HCV re-infection of the graft after LT<sup>18, 19</sup>. Targets for entry inhibitors include CD81, scavenger receptor class B type I (SR-BI), tight junction proteins claudin-1 (CLDN1) and occludin (OCLN), epidermal growth factor receptor (EGFR)<sup>17</sup>, HRas<sup>20</sup> and NPC1L1<sup>21</sup>. Entry inhibitors exhibit a broad pan-genotypic activity<sup>19, 21-30</sup>. By acting through a complementary mechanism of action (MOA), entry inhibitors may synergistically act with SOC. To explore the future application of entry inhibitors for combination therapy in IFN- $\alpha$ -sparing regimens, we investigated the antiviral efficacy of entry inhibitors in combination with DAAs or other host-targeting agents (HTAs) in state-of-the-art cell culture models.

## MATERIAL AND METHODS

**Cell lines.** Huh7.5.1 cells and primary human hepatocyte (PHH) culture has been described<sup>22</sup>.

**Antibodies and inhibitors.** CLDN1- (OM-7D3-B3)<sup>31</sup>, SR-BI- (NK-8H5-E3)<sup>23</sup> and CD81- (QV-6A8-F2C4)<sup>25</sup> mAbs have been described. Erlotinib and dasatinib were from LC Laboratories, IFN- $\alpha$ 2a and IFN- $\alpha$ 2b from Roche and Merck. Alisporivir, telaprevir, boceprevir, danoprevir, simeprevir, daclatasvir, mericitabine and sofosbuvir were synthesized by Acme Bioscience.

**Analysis of antiviral activity of compounds and combinations on HCV infection.** Each compound was tested individually or in combination with a second compound using the HCVcc-Huh7.5.1 model<sup>23, 32</sup>. Production of HCVcc has been described<sup>22</sup>. For prophylactic/prevention combination experiments, Huh7.5.1 cells were pre-incubated with IFN- $\alpha$ , DAAs or HTAs for 1h at 37°C before incubation for 4h at 37°C with HCVcc and both compounds. For therapeutic/treatment combination experiments, Huh7.5.1 cells were infected with HCVcc during 5d to establish chronic persistent HCV infection before adding compounds for additional 5d<sup>32</sup>. Viral infection was analyzed by assessing luciferase activity<sup>19, 22, 31</sup>.

**Analysis of synergy.** Synergy was assessed by two independent methods: the Combination Index (CI)<sup>33</sup> and/or the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>. A CI <0.9, 0.9-1.1, and >1.1 indicates synergy, additivity, and antagonism, respectively<sup>33</sup>. For the method of Prichard and Shipman, a surface >20% above the zero plane indicates synergy and a surface <20% below the zero plane indicates antagonism<sup>34</sup>. Validity of the assay and methods were confirmed by non-synergistic or antagonistic combinations.

**Toxicity assays.** Huh7.5.1 cells and PHH were incubated with compounds for 48h and/or 5d<sup>31, 32</sup>. Cytotoxic effects were analyzed using MTT assay<sup>22, 31</sup> and anti-Fas antibody as positive control<sup>31</sup>.

**Statistical analysis.** Statistical analysis and Combinations Indexes estimations have been run under Bayesian paradigm. Results are given as mean and [95% credible interval]. Data were analyzed by IC (50/75/90). Group comparisons were based on the mean difference. Normality was assessed with a Shapiro-Wilk test. When required, data transformation was used to reach normality. Each data set was analyzed using hierarchical (mixed) model with fixed group effects and random treatment effect as described<sup>35</sup>. The whole dataset was analyzed using a two-stage hierarchical model, with the fixed group effects and two random effects which were treatment and IC (50/75/90), in order to take account of both levels of repeated measurements. Dummy variables, representing the IC studied (50/75/90) had also been considered as fixed effects to test differences between CI in each case. For all of these models, uninformative priors for coefficients were used: Gaussian distributions with mean 0 and precision 0.001, Gamma distribution with parameters 0.1 and 0.1 for the model precision. Hyperpriors for random effects

were also uninformative: Normal with mean 0 and precision 0.001, and a uniform distribution (0,100) for dispersion parameters. Assumption of homogeneous dispersions in random effects was respected. Computations were run with R 3.00 and WinBUGS 1.4. For each analysis, a single MCMC chain with 5000 iterations as burn-in and 100 000 iterations was used to generate the posterior distribution. Convergence was checked and present in every case. Unless otherwise stated, results are shown as means  $\pm$  SEM from three independent experiments performed in triplicate. For the method of Prichard and Shipman, one representative experiment performed in triplicate is shown.

## RESULTS

**Synergy of entry inhibitors and DAAs uncovers novel combinations for IFN-free regimens.** A major effort of current drug development is to develop IFN-free treatments based on the combination of DAAs with or without RBV<sup>9</sup>. Addressing these concepts, we studied the combined antiviral effect of entry inhibitors with clinically licensed protease inhibitors telaprevir<sup>4, 5</sup> and boceprevir<sup>2, 3</sup>, and second-wave first-generation protease inhibitors simeprevir and danoprevir<sup>36, 37</sup> in the HCVcc model. The antiviral effect of each molecule was tested alone or in combination to determine the Combination Index (CI). Combination of telaprevir or boceprevir with a sub-IC<sub>50</sub> concentration of all entry inhibitors tested - which exerts only minimal inhibition on HCV infection - resulted in synergy with CIs of 0.48-0.71 at IC<sub>90</sub> (Fig. 1A, Supporting Table 1). Calculation of 95% credible intervals indicates that the differences between CI values did not occur by chance (Fig. 1A, Supporting Table 1). Synergy was also observed at IC<sub>50</sub> and IC<sub>75</sub> (Fig. 1A, Supporting Table 1). Inversely, combination of telaprevir and boceprevir was additive (CI of 0.94, 95% confidence interval [0.84-1.04]; Fig. 1A) confirming the validity of the assay. Second-wave protease inhibitors have a higher genetic barrier for resistance. However, single amino acid substitutions confer drug resistance *in vivo*<sup>8</sup>. Importantly, several telaprevir- and boceprevir-resistant mutations confer cross-resistance to these second-wave protease inhibitors<sup>8</sup>. Combination of simeprevir or danoprevir with entry inhibitors resulted in synergy at all inhibitory concentrations (CIs of 0.06-0.65 at IC<sub>90</sub>; Fig. 1A, Supporting Table 1), demonstrating the relevance of adding an entry inhibitor to improve antiviral efficacy in preventing HCV infection. Highly effective combinations included *inter alia* combinations of telaprevir with erlotinib (Fig. 2A), and boceprevir or simeprevir with anti-CLDN1 mAb (Fig. 2B-C).

A number of NS5A and polymerase inhibitors have reached early- to late-stage clinical development. The first NS5A inhibitor, daclatasvir<sup>38</sup>, has potent antiviral activity against HCV-1 in mono- and combination therapy<sup>39, 40</sup>. However, its genetic barrier to resistance is low and resistant variants emerge without imposing loss of *in vivo* viral fitness<sup>38</sup>. Marked synergy at all inhibitory concentrations was observed for combination of daclatasvir with entry inhibitors (CIs of 0.27-0.89 at IC<sub>90</sub>; Fig. 1B, Supporting Table 1C). Effective combinations included *inter alia* combinations of daclatasvir and anti-SR-BI, anti-CLDN1 mAbs or erlotinib decreasing its IC<sub>50</sub> up to 60-fold (Fig. 3A-C).

Finally, we investigated synergy between entry inhibitors and the polymerase inhibitor sofosbuvir<sup>41</sup>. Sofosbuvir is in clinical development and has the potential to become the cornerstone for an efficacious, all-oral combination regimen for many HCV-infected patients<sup>42, 43</sup>. Combination of sofosbuvir with entry inhibitors resulted in synergy at all inhibitory concentrations (CIs of 0.41-0.61 at IC<sub>90</sub>; Fig. 1C, Fig. 4A-B,D-E, Supporting Table 1). Potent combinations included *inter alia* combinations of sofosbuvir and anti-SR-BI or anti-CLDN1 mAbs, decreasing its IC<sub>50</sub> up to 18-fold, and combinations of sofosbuvir with erlotinib or dasatinib decreasing its IC<sub>50</sub> up to 210-fold (Fig. 4A-B, D-E). These data demonstrate the potential of combining sofosbuvir with entry inhibitors to improve its antiviral activity. Similar results were obtained when combining mericitabine<sup>37</sup> with entry inhibitors (CIs of 0.18-0.68 at IC<sub>90</sub>; Fig. 1C, Supporting Table 1).

To further confirm synergy over a broad range of concentrations of two compounds, we performed combinations of each DAA with a defined entry inhibitor testing a full checker-board of compound dose-response curves<sup>34</sup>. Particularly, combinations of low doses of two compounds resulted in an antiviral effect well above the expected value (Fig. 2D-F, Fig. 3D-F, Fig. 4C,F). These results demonstrate that adding an entry inhibitor markedly increases the antiviral activity of different DAAs currently evaluated in IFN-free regimens thereby defining novel antiviral combinations for further preclinical and clinical development in IFN-free regimens.

**Combination of HTAs results in a synergistic antiviral effect.** It is still not clear whether DAA-based therapies will be effective and safe in difficult-to-treat populations including patients with co-morbidity, complex co-medication or immunosuppression or patients undergoing LT. Combinations of HTAs are a promising alternative to DAAs for IFN-sparing regimens, allowing increasing the genetic barrier to resistance. The clinically most advanced HTA is cyclophilin A inhibitor alisporivir<sup>44</sup>. Combination of alisporivir with entry inhibitors resulted in a marked synergy (CIs of 0.19-0.69 at IC<sub>75</sub> and 0.06-0.50 at IC<sub>50</sub>; Fig. 5D, Supporting Table 2). Effective combinations included *inter alia* alisporivir and erlotinib or anti-CLDN1 mAb (Fig. 5E). Indeed, very low concentrations of these entry inhibitors markedly increased the antiviral effect of alisporivir decreasing its IC<sub>50</sub> up to 3,000-fold. Synergy of alisporivir and anti-CLDN1 mAb was confirmed using the method of Prichard and Shipman (Fig. 5F). Taken together, these data demonstrate the promise of combining HTAs acting on complementary steps of the viral life cycle and open perspectives for HTA-based DAA or IFN-free regimens. These combinations may be of particular interest for patients who are resistant to SOC or cannot tolerate SOC or combinations of DAAs. Furthermore, combinations of entry inhibitors such as receptor-specific mAbs and erlotinib or dasatinib resulted in synergy on HCVcc infection at all inhibitory concentrations (CIs of 0.13-0.68 at IC<sub>90</sub>; Fig. 5A-C, Supporting Table 2). Conversely, combination of anti-CLDN1 and anti-CD81 mAbs resulted in additivity (CI of 0.95, 95% credible interval [0.85-1.06] at IC<sub>90</sub>; Fig. 5A).

**Entry inhibitors potentiate the antiviral activity of IFN- $\alpha$  in a synergistic manner.** Since IFN- $\alpha$  is the key component of current SOC, we also investigated whether HCV entry inhibitors potentiate the antiviral activity of interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) by combining an entry inhibitor with IFN- $\alpha$ 2a or IFN- $\alpha$ 2b. Combination of IFN- $\alpha$ 2a or IFN- $\alpha$ 2b with a sub-IC<sub>50</sub> concentration of receptor-specific monoclonal antibody (mAb) resulted in a synergistic activity at IC<sub>90</sub> in inhibiting HCVcc infection (CIs of 0.16-0.53) (Supporting Fig.1, Supporting Table 3). Synergy combining IFN- $\alpha$ 2a or IFN- $\alpha$ 2b with erlotinib has been described elsewhere<sup>32</sup>. Synergy was also observed at IC<sub>50</sub> and IC<sub>75</sub> for all combinations tested (Supporting Fig.1, Supporting Table 3). Conversely, in line with previously reported data<sup>45</sup> combination of IFN- $\alpha$ 2a or IFN- $\alpha$ 2b with sorafenib, a different protein kinase inhibitor (PKI) that inhibits the antiviral effects of interferon, resulted in antagonism (CI of 1.23; 95% credible interval [1.13-1.34] and 1.27, 95% credible interval [1.16-1.38]; Supporting Fig.1A-B, Supporting Table 3), demonstrating that the observed synergies are specific for the combinations and not related to technical issues of the model. Calculation of 95% credible intervals indicates that the differences between CI values did not occur by chance (Supporting Table 3). These data demonstrate that entry inhibitors enhance the antiviral activity of IFN- $\alpha$ .

**Synergy in experimental design for treatment of HCV infection.** Finally, to explore whether synergy between DAAs or HTAs and entry inhibitors also occurs in experimental approach mimicking treatment of chronic infection, we used a well established design of persistent infection<sup>32</sup>. Similar to the prevention design shown before, combinations of DAAs and alisporivir

with entry inhibitors also resulted in high synergy when compounds were added post-infection in chronically infected cells (Fig. 6).

**Absent toxicity of combinations in primary human hepatocytes.** Noteworthy, the uncovered combinations did not exhibit any detectable toxicity in PHH nor Huh7.5.1 cells neither in short or long term infection experiments (Table 1). In contrast, anti-Fas antibody or the well characterized kinase inhibitor flavopiridol resulted in easily detectable toxicity (Table 1). Taken together, these data demonstrate that the uncovered combinations have a favourable safety profile in cell culture models and primary cells providing the rationale for their further development.

## DISCUSSION

There is an unmet medical need for novel strategies for prevention of HCV graft infection following LT and a need to develop more efficient and better tolerated combination therapies for chronic infection<sup>1</sup>. Although having improved the overall outcome of HCV therapy, triple combination treatment has limitations. New therapeutic approaches including IFN- $\alpha$ -free DAA combination therapy are in late stage clinical development<sup>8, 39, 46</sup>. However, many DAAs are restricted to genotype 1 and their use in difficult-to-treat patients could be hindered by significant and potentially harmful drug-drug interactions<sup>15</sup>. Among the most promising DAAs are polymerase and NS5A inhibitors. Polymerase inhibitor sofosbuvir demonstrated potent antiviral activity with a high barrier for resistance when combined with SOC or ribavirin<sup>47, 48</sup>. However, recent phase III studies indicate that sofosbuvir and RBV had only limited efficacy against genotype 3 when compared with SOC, with lowest efficacy in cirrhotic patients<sup>42, 43</sup>. NS5A inhibitor daclatasvir shows potent pan-genotypic antiviral activity *in vitro*. However, combination of daclatasvir with protease inhibitors was associated with significant viral breakthrough rates<sup>8, 39</sup>. Thus, strong antiviral efficacy and high genetic barrier to resistance will remain key requirements for PEG-IFN- $\alpha$ -free regimens to avoid early treatment failure. Taken together, emerging data from late stage clinical trials suggest that the optimal combination for defined patient groups and viral genotypes still needs to be defined.

To address the limitations of SOC and DAAs, we evaluated the antiviral effect of combining entry inhibitors with IFN- $\alpha$ , DAAs or HTAs. Our results uncover novel combinations of entry inhibitors and IFN- $\alpha$ , DAAs or HTAs highlighted by marked synergy (Fig. 1-6, Table 1, Supporting Fig. 1, Supporting Tables 1-3). Synergy may increase the genetic barrier to resistance, allow shortening treatment schedules, lower the risk for adverse effects and reduce the doses of the single compounds. Since antiviral activity of compounds in the HCVcc model correlates well with clinical antiviral activity in patients<sup>6, 38</sup>, and synergy was robust and significant at IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> and IC<sub>90</sub>, at all concentrations tested and similar in experimental prevention and treatment designs, it is likely that the observed synergy is clinically relevant.

A challenge of current and future therapies remains the development of drug-resistant variants<sup>6</sup>. Combination of entry inhibitors with compounds targeting complementary steps of the viral life cycle may open a perspective to overcome antiviral resistance. Compared to the high variability of viral proteins targeted by DAAs, the variability of host factors targeted by HTAs is low<sup>17</sup>. By imposing a higher genetic barrier to resistance than DAAs, host-targeting entry inhibitors may avoid emergence of viral escape variants. Supporting this concept, we and others have shown that entry inhibitors potently inhibit highly infectious escape variants of HCV that are resistant to host neutralizing antibodies<sup>18, 19, 22-24, 31</sup>. Interestingly, the disease outcome for HIV infected individuals has significantly improved with the development of antiretroviral drugs targeting different steps of the viral life cycle including viral entry<sup>49, 50</sup>. Although viral variants resistant to HIV entry inhibitors have been described, there is no evidence of cross-resistance between different classes of antivirals<sup>49, 50</sup>. In contrast to HIV, co-receptor tropism/switch has not

been described for HCV as a potential mechanism for viral escape and successful antiviral therapy can definitively eradicate HCV from infected patients.

Given that HTAs interfere with host targets, there is theoretically a greater risk of cellular toxicity than with DAAs. Host targets CD81, SR-BI, CLDN1 and EGFR described in this study are expressed in various tissues and play important role in cell adhesion, lipid metabolism or signalling. Noteworthy, the large majority of licensed drugs in clinical use (e. g. in cardiovascular, inflammatory disease or oncology) targets host proteins and side effects are not necessarily more pronounced than in drugs targeting the virus<sup>17</sup>. Indeed, the EGFR inhibitor erlotinib, a clinically licensed drug for non-small-cell lung cancer has a favourable safety profile and is well tolerated lung cancer patients<sup>51</sup>. Moreover, clinical licensed HIV host-targeting entry inhibitors do not necessarily display more adverse events than antiretroviral drugs<sup>49, 50</sup>. Nevertheless, safety is an important issue and needs to be carefully addressed for both DAAs and HTAs.

A pan-genotypic, highly efficient, IFN-free regimen is the ultimate goal for HCV therapy. Compared to many DAAs which act in genotype-dependent manner, host-targeting entry inhibitors exhibit a broad pan-genotypic activity: examples include CLDN1-<sup>31</sup>, SR-BI-<sup>23, 24</sup> and CD81-specific<sup>25, 26</sup> mAbs, ITX-5061<sup>27</sup>, erlotinib<sup>22, 52</sup>, ezetimibe<sup>21</sup>, flavonoids<sup>29, 53</sup>, lectins<sup>30</sup>, phosphorothioate oligonucleotides<sup>54</sup> and silymarin<sup>55, 56</sup>. Thus, combination of entry inhibitors with DAAs may define novel options for patients with non-genotype 1 infections and simplify treatment regimens.

Entry inhibitors are ideally suited for prevention of HCV liver graft infection. Currently there is no option to protect HCV-negative grafts from re-infection while the clinical use of hepatitis B immune globulin (a well-characterized HBV entry inhibitor) in combination with nucleos(t)ide analogues has essentially eliminated HBV recurrence in LT patients<sup>12</sup>. Since HCV entry is a key mechanism for liver graft infection<sup>18, 19</sup>, the observed synergy between DAAs and entry inhibitors uncovers a promising opportunity for prevention of graft infection. The combination of host-targeting entry inhibitors with DAAs may be particularly attractive since the high variability of HCV has so far hampered the development of efficient cross-neutralizing anti-envelope antibodies<sup>8</sup>.

Interfering with HCV cell entry offers several targets at different steps of viral entry: blocking virus-target cell interaction during attachment, interfering with post-binding events such as CD81-CLDN1 associations or viral fusion<sup>17</sup>. Interestingly, combination of CLDN1-specific mAb and kinase inhibitors also showed synergy on HCV entry and infection. While CLDN1-specific antibodies and PKIs both interfere with CD81-CLDN1 co-receptor interactions, PKIs also interfere with glycoprotein-dependent viral fusion<sup>22</sup>. This additional and complementary MOA on membrane fusion of PKIs is most likely responsible for the synergistic effect. This concept is confirmed by the finding that combination of anti-CD81 and anti-CLDN1 mAbs, which target a similar step in the viral entry process, only exhibits an additive effect (Fig. 5A). Thus, these results define novel combinations of entry inhibitors for prevention of graft infection.

Interestingly, two entry inhibitors erlotinib (targeting EGFR and CD81-CLDN1 co-receptor associations) and ITX-5061 (targeting HCV-SR-BI interactions) have reached clinical development (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01835938 and NCT01292824). Collectively, novel combinations based on synergy uncovered in this study may widen the therapeutic arsenal against HCV infection for prevention of liver graft infection, treatment of difficult-to-treat-patients and provide alternatives for patients with contraindications to particular compounds of SOC or future IFN-free regimens.

### **Acknowledgements**

We thank R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) for providing plasmids for production of HCVcc, F.V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells, C. M. Rice (Rockefeller University, New York, NY), J. A. McKeating (University of

Birmingham, UK), D. Samuel (Inserm U785, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France), J.-M. Pawlotsky (Inserm U955, Henri Mondor Hospital, Créteil, France), T. Berg (University Hospital, Leipzig, Germany), R.T. Chung (Massachusetts General Hospital, Boston), M. Dandri (University Medical Center, Hamburg, Germany) for helpful discussions. We thank L. Heydmann (Inserm U1110) for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Hofmann WP, Zeuzem S. Hepatitis C in 2011: A new standard of care and the race towards IFN-free therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:67-68.
2. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1207-1217.
3. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1195-1206.
4. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;364:2405-2416.
5. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417-2428.
6. Pawlotsky JM. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 2011;53:1742-1751.
7. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;138:447-462.
8. Sarrazin C, Hezode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012;56 Suppl 1:S88-100.
9. Feld JJ. Is there a role for ribavirin in the era of hepatitis C virus direct-acting antivirals? *Gastroenterology* 2012;142:1356-1359.
10. Gelman MA, Glenn JS. Mixing the right hepatitis C inhibitor cocktail. *Trends Mol Med* 2010.
11. Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P, Barreiro P. Treatment failure with new hepatitis C drugs. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:313-323.
12. Crespo G, Marino Z, Navasa M, Forns X. Viral hepatitis in liver transplantation. *Gastroenterology* 2012;142:1373-1383 e1371.
13. Fink SA, Jacobson IM. Managing patients with hepatitis B-related or hepatitis C-related decompensated cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:285-295.
14. Ciesek S, Wedemeyer H. Immunosuppression, liver injury and post-transplant HCV recurrence. *J Viral Hepat* 2012;19:1-8.
15. Garg V, van Heeswijk R, Lee JE, Alves K, Nadkarni P, Luo X. Effect of telaprevir on the pharmacokinetics of cyclosporine and tacrolimus. *Hepatology* 2011;54:20-27.
16. Charlton M. Telaprevir, boceprevir, cytochrome P450 and immunosuppressive agents--a potentially lethal cocktail. *Hepatology* 2011;54:3-5.
17. Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J Hepatol* 2013;58:375-384.
18. Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, Carolla P, Meuleman P, Leroux-Roels G, Patel AH, et al. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp Med* 2010;207:2019-2031.
19. Fofana I, Fafi-Kremer S, Carolla P, Fauvelle C, Zahid MN, Turek M, Heydmann L, et al. Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology* 2012;143:223-233 e229.

20. Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, Thumann C, Harris HJ, Barnes A, Florentin J, et al. HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 2013;13:302-313.
21. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012;18:281-285.
22. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589-595.
23. Zahid MN, Turek M, Xiao F, Thi VL, Guerin M, Fofana I, Bachellier P, et al. The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology* 2013;57:492-504.
24. Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Slowikowski MP, Fafi-Kremer S, et al. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *Journal of Hepatology* 2012;57:17-23.
25. Fofana I, Xiao F, Thumann C, Turek M, Zona L, Tawar RG, Grunert F, et al. A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS ONE* 2013;8:e64221.
26. Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H, Leroux-Roels G. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 2008;48:1761-1768.
27. Syder AJ, Lee H, Zeisel MB, Grove J, Soulier E, Macdonald J, Chow S, et al. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 2011;54:48-55.
28. Haid S, Novodomska A, Gentzsch J, Grethe C, Geuenich S, Bankwitz D, Chhatwal P, et al. A Plant-Derived Flavonoid Inhibits Entry of All HCV Genotypes Into Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 2012.
29. Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V, Hober D, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2012;55:720-729.
30. Meuleman P, Albecka A, Belouzard S, Vercauteren K, Verhoye L, Wychowski C, Leroux-Roels G, et al. Griffithsin has antiviral activity against hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5159-5167.
31. Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, et al. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;39:953-964.
32. Lupberger J, Duong FH, Fofana I, Zona L, Xiao F, Thumann C, Durand SC, et al. EGFR signaling impairs the antiviral activity of interferon-alpha. *Hepatology* 2013.
33. Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res* 2004;10:7994-8004.
34. Prichard MN, Shipman C, Jr. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* 1990;14:181-205.
35. Wyles DL, Kaihara KA, Vaida F, Schooley RT. Synergy of small molecular inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets. *J Virol* 2007;81:3005-3008.
36. Reesink HW, Fanning GC, Farha KA, Weegink C, Van Vliet A, Van 't Klooster G, Lenz O, et al. Rapid HCV-RNA decline with once daily TMC435: a phase I study in healthy volunteers and hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2010;138:913-921.
37. Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, Ipe D, et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2010;376:1467-1475.

38. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010;465:96-100.
39. Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, Reindollar R, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 2012;366:216-224.
40. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012;55:742-748.
41. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, Hindes RG, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N Engl J Med* 2013;368:34-44.
42. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013;368:1878-1887.
43. Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, Yoshida EM, Rodriguez-Torres M, Sulkowski MS, Shiffman ML, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N Engl J Med* 2013;368:1867-1877.
44. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, et al. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 2009;49:1460-1468.
45. Himmelsbach K, Hildt E. The kinase inhibitor Sorafenib impairs the antiviral effect of interferon alpha on hepatitis C virus replication. *Eur J Cell Biol* 2013;92:12-20.
46. Welsch C, Zeuzem S. Will interferon-free regimens prevail? *Gastroenterology* 2012;142:1351-1355.
47. Lawitz E, Lalezari JP, Hassanein T, Kowdley KV, Poordad FF, Sheikh AM, Afdhal NH, et al. Sofosbuvir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin for non-cirrhotic, treatment-naive patients with genotypes 1, 2, and 3 hepatitis C infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 2013;13:401-408.
48. Kowdley KV, Lawitz E, Crespo I, Hassanein T, Davis MN, DeMicco M, Bernstein DE, et al. Sofosbuvir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin for treatment-naive patients with hepatitis C genotype-1 infection (ATOMIC): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2013;381:2100-2107.
49. Henrich TJ, Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. *Curr Opin Virol* 2013;3:51-57.
50. Sharma AK, George V, Valiathan R, Pilakka-Kanthikeel S, Pallikkuth S. Inhibitors of HIV-1 entry and integration: recent developments and impact on treatment. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2013;7:151-161.
51. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132.
52. Diao J, Pantua H, Ngu H, Komuves L, Diehl L, Schaefer G, Kapadia SB. Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* 2012;86:10935-10949.
53. Haid S, Novodomska A, Gentzsch J, Grethe C, Geuenich S, Bankwitz D, Chhatwal P, et al. A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology* 2012;143:213-222 e215.
54. Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, et al. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 2009;137:673-681.

55. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010;51:1912-1921.

56. Marino Z, Crespo G, D'Amato M, Brambilla N, Giacobelli G, Rovati L, Costa J, et al. Intravenous silibinin monotherapy shows significant antiviral activity in HCV-infected patients in the peri-transplantation period. *J Hepatol* 2013;58:415-420.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. Combination of DAAs and entry inhibitors results in a synergistic activity in preventing HCV infection.** Huh7.5.1 cells were pre-incubated for 1h with serial concentrations of (A) telaprevir, boceprevir, simeprevir or danoprevir, (B) daclatasvir or (C) mericitabine or sofosbuvir and 0.01  $\mu\text{g/ml}$  of receptor-specific (anti-CD81, anti-SR-BI or anti-CLDN1) mAbs or 0.1  $\mu\text{M}$  PKIs (erlotinib or dasatinib) before incubation with HCVcc Luc-Jc1 in the presence of both compounds. HCVcc infection was analyzed by luciferase activity as described<sup>31</sup>. The CIs at  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{75}$  and  $\text{IC}_{90}$  are indicated in Supporting Table 1. Means  $\pm$  95% credible intervals from three independent experiments performed in triplicate are shown.

**Fig. 2. Antiviral synergy of entry and protease inhibitors.** Combination (A) telaprevir and erlotinib, (B) boceprevir or (C) simeprevir and anti-CLDN1 mAb was performed as described in Fig. 1. (D-F) Synergy was confirmed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>.

**Fig. 3. Synergy of entry inhibitors and daclatasvir.** Combination of daclatasvir and (A) anti-SR-BI mAb, (B) anti-CLDN1 mAb or (C) erlotinib was performed as described in Fig. 1. (D-F) Synergy was confirmed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>.

**Fig. 4. Entry inhibitors enhance the antiviral activity of sofosbuvir in a synergistic manner.** Combination of sofosbuvir and (A) anti-SR-BI mAb, (B) anti-CLDN1 mAb, (D) dasatinib or (E) erlotinib was performed as described in Fig. 1. (C,F) Synergy was confirmed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>.

**Fig. 5. Synergy of HTAs on HCV infection.** (A) Combination of receptor-specific (anti-CD81, anti-SR-BI or anti-CLDN1) mAbs and PKIs (erlotinib or dasatinib) was performed as described in Fig. 1 and the CIs at  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{75}$  and  $\text{IC}_{90}$  are indicated in Supporting Table 2. Means  $\pm$  95% credible intervals from three independent experiments performed in triplicate are shown. (B) Combination of anti-CLDN1 mAb and dasatinib (left) or erlotinib (right). (C) Synergy was confirmed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>. (D) Combination of alisporivir and entry inhibitors was performed as described in Fig. 1 and the CIs at  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{75}$  and  $\text{IC}_{90}$  are indicated in Supporting Table 2. Means  $\pm$  95% credible intervals from three independent experiments performed in triplicate are shown. (E) Combination of alisporivir with erlotinib (left) or anti-CLDN1 mAb (right). (F) Synergy was confirmed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>.

**Fig. 6. Combination of DAAs, HTAs and entry inhibitors results in synergy in treatment of established HCV infection.** Huh7.5.1 cells were infected for 5d with HCVcc prior to treatment with DAAs or alisporivir and entry inhibitors as described in Material and Methods. Synergy between (A) telaprevir and anti-CLDN1 mAb (left) or erlotinib (right), (B) daclatasvir and anti-SRBI mAb (left) or anti-CLDN1 mAb (right), (D) sofosbuvir and anti-CLDN1 mAb (left) or erlotinib (right), (E) alisporivir and anti-SRBI (left) or anti-CLDN1 mAb (right) was assessed using the method of Prichard and Shipman<sup>34</sup>.

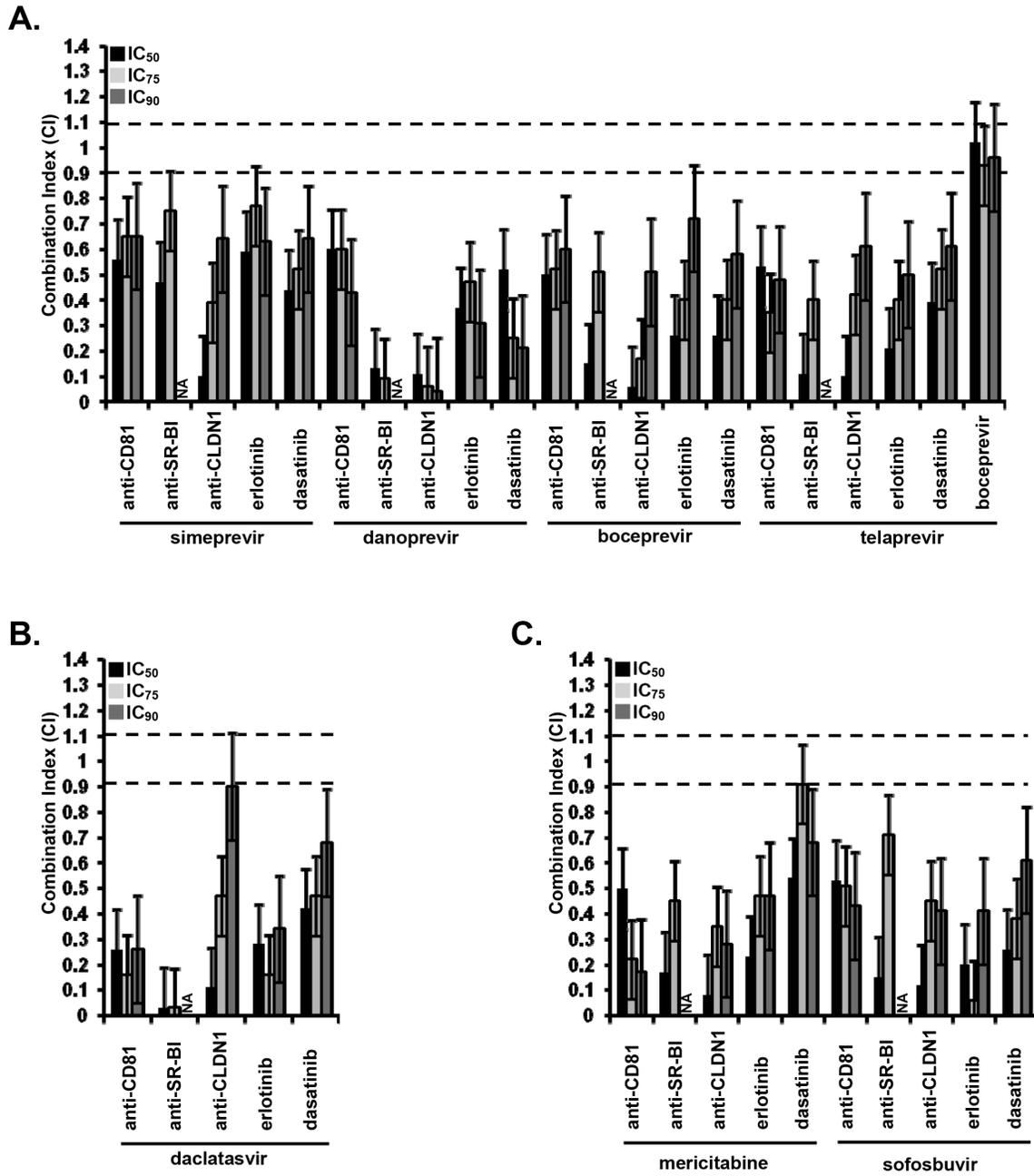


Figure 1

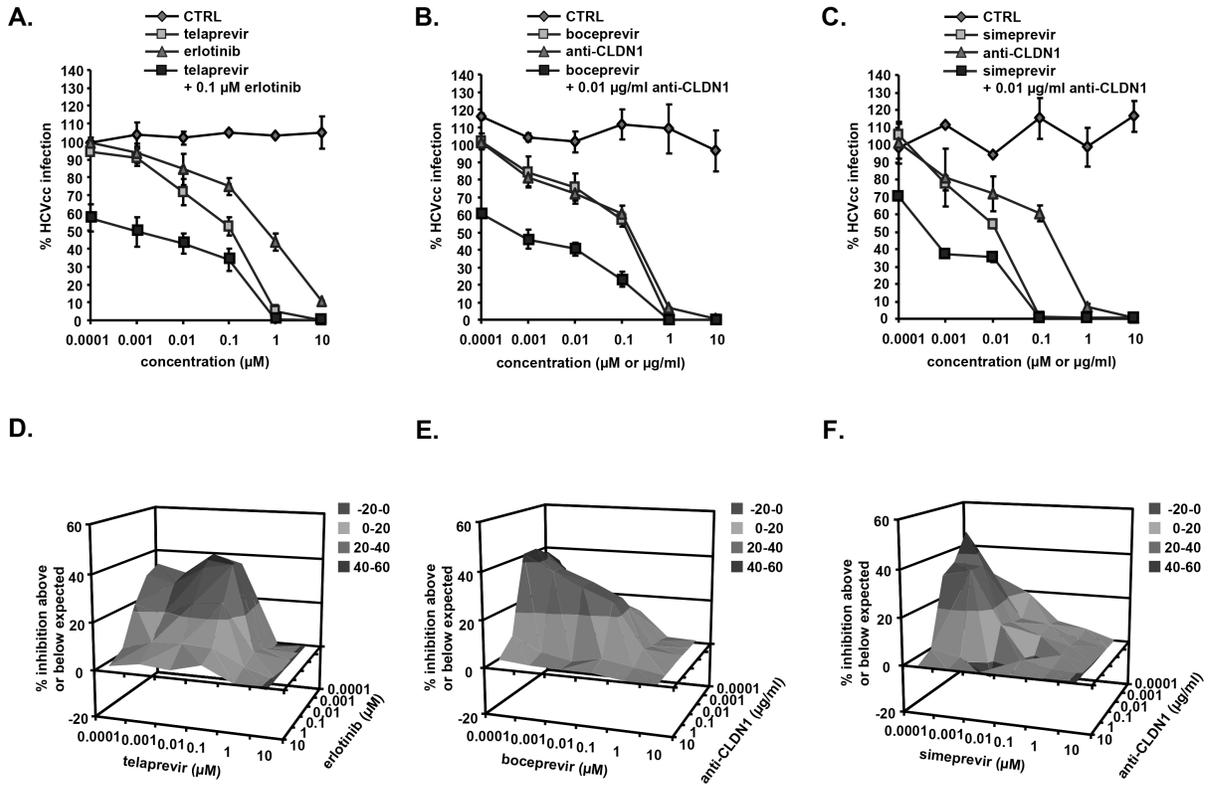


Figure 2

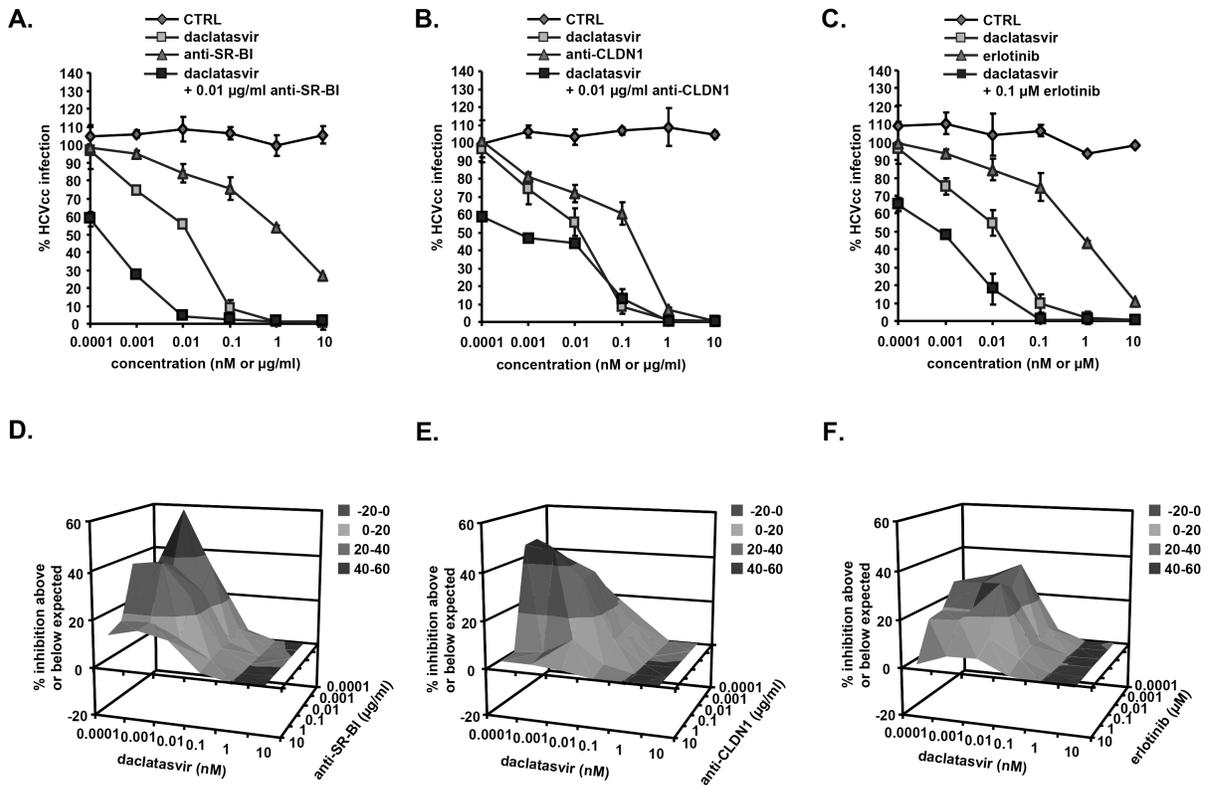


Figure 3

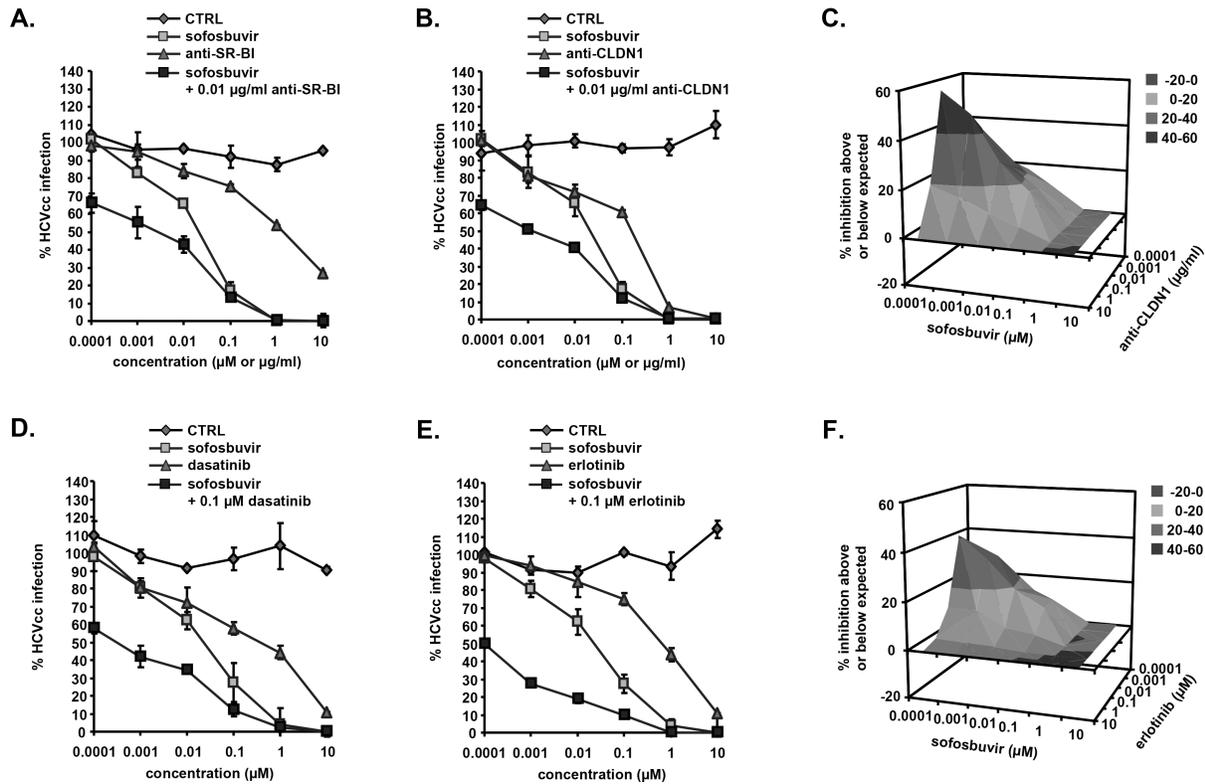


Figure 4

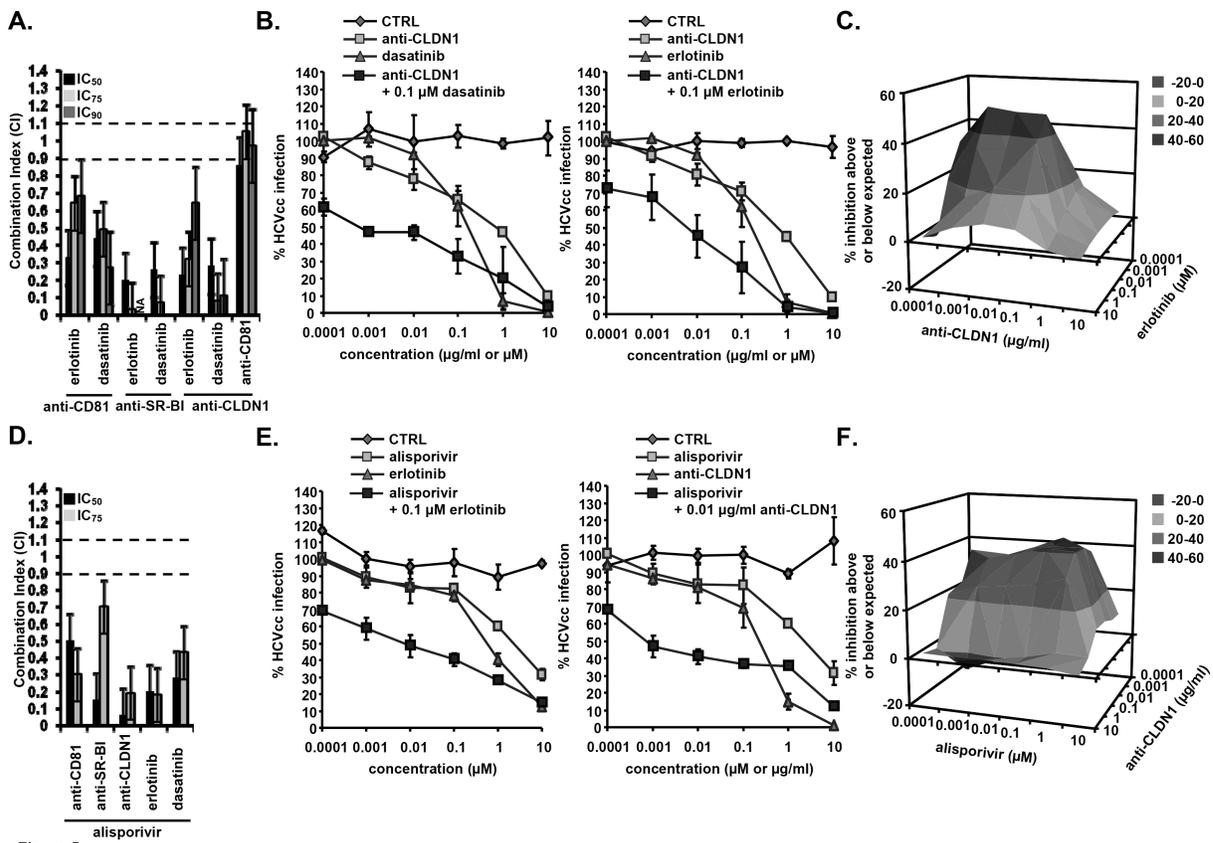


Figure 5

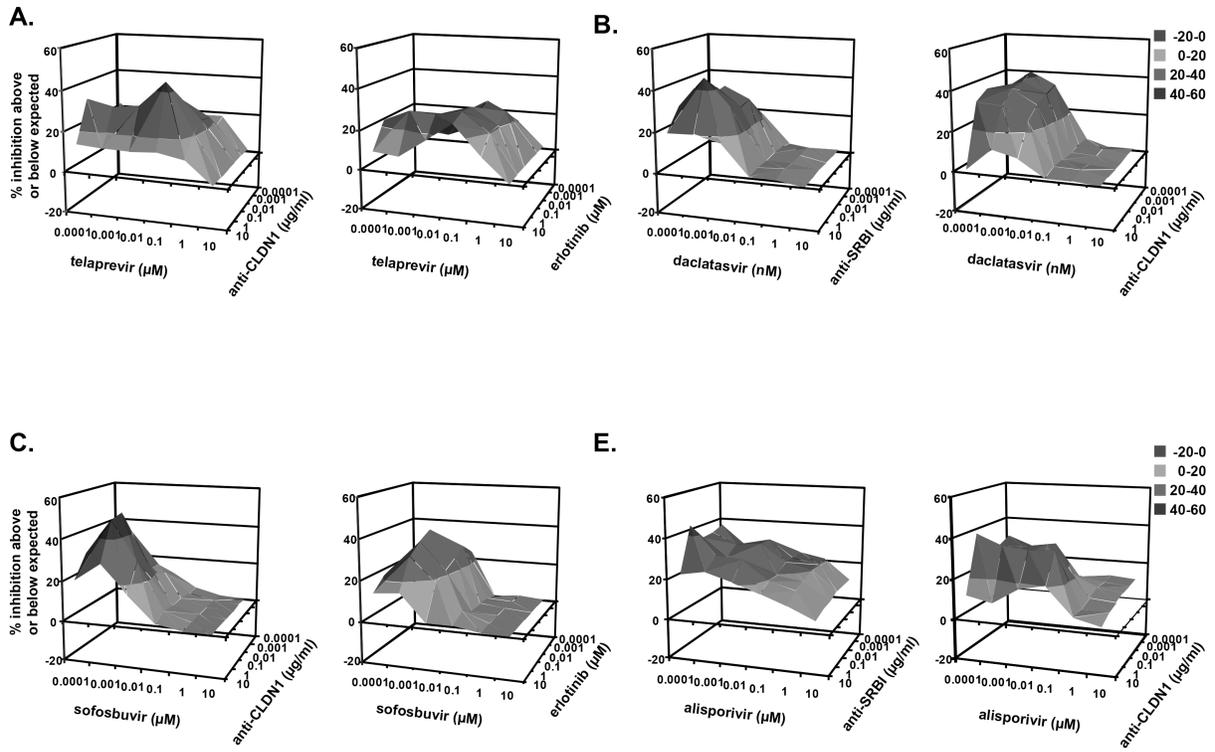


Figure 6

**Roxane SAAD (ALLES)**  
**Développement de nouveaux  
nanovecteurs pour les  
thérapies anti-HCV/HCC**

## Résumé

Ce travail concerne le développement d'un système de vectorisation nanoparticulaire pour l'interférence ARN, constituant une nouvelle proposition thérapeutique applicable à des pathologies virales ou tumorales, et possiblement complémentaire aux traitements existants. La vectorisation de siRNA est ici basée sur l'enrobage multicouche de nanoparticules de phosphate de calcium, la multicouche étant constituée de dépôts alternés de PEI modifié et de siRNA. Ce système permet d'obtenir une efficacité de transfection des cellulaires cibles supérieure à celle des procédés conventionnels et une rémanence fonctionnelle *in vitro* jusqu'à neuf jours.

Les résultats d'interférence ARN obtenus ont permis notamment d'inhiber l'infection par le virus de l'hépatite C jusqu'à 99,95%, l'inhibition de l'expression d'une protéine intrinsèque jusqu'à 90,5%, et le ralentissement de la croissance cellulaire dans un modèle 3D mimant une tumeur hépatique jusqu'à 46,5%.

Ces nanoparticules pourraient présenter un intérêt majeur, en offrant une action à long terme et en résolvant la plupart des difficultés rencontrées en utilisant des siRNA en thérapie.

Mots-clés: Nanoparticules, siRNA, PEI, phosphate de calcium, HCV, HCC

## Summary

This work concerns the development of a nanoparticle vector system for RNA interference, constituting a new therapeutic option applicable to viral and tumor pathologies, and possibly complementary to existing treatments. siRNA vectorisation is here based on multilayer coating of calcium phosphate nanoparticles, the multilayer being constituted of alternate coatings of modified PEI and siRNA. This system triggers a better transfection efficiency of target cells than classic techniques, as well as a functional persistence up to 9 days *in vitro*.

RNA interference results using CPnp allowed inhibition of hepatitis C virus infection up to 99.95%, of intrinsic protein expression up to 90.5%, and of cell growth in a 3D model mimicking an hepatic tumor up to 46.5%.

These nanoparticles could be of major interest, by offering a long term action, and resolving most of the issues found in the use of siRNA in therapy.