

NNT : 2016SACLS055

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 569

Innovation thérapeutique: du fondamental à l'appliqué

Discipline: Pharmacotechnie et biopharmacie

Par

**Mr. Walhan ALSHAER**

**Fonctionnalisation de liposomes par des aptamères  
pour le ciblage actif des cellules cancéreuses**

Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry, le 21/3/2016

**Composition du Jury :**

Prof. Patrick COUVREUR	(Université Paris-Sud)	Président
Prof. Elias FATTAL	(Université Paris-Sud)	Directeur de thèse
Dr. Hervé HILLAIREAU	(Université Paris-Sud)	Co-directeur de thèse
Prof. Karine ANDRIEUX	(Université Paris Descartes)	Rapporteur
Dr. Khuloud AL-JAMAL	(King's College London)	Rapporteur
Prof. Said ISMAIL	(University of Jordan)	Examineur
Dr. Frédéric DUCONGE	(CEA, Institut d'imagerie biomédicale)	Examineur

## Introduction générale

*L'utilisation de nanotechnologies pour le traitement du cancer est en constante progression. Cette stratégie permet d'améliorer les résultats thérapeutiques en diminuant les effets secondaires des chimiothérapies anti-tumorales conventionnelles, et en augmentant leur ciblage vers les tumeurs. Pour améliorer ce ciblage, une approche actuellement en développement consiste à concevoir des nanoparticules chargées en principe actif et fonctionnalisées par des ligands de ciblage, choisis pour leur interaction avec des molécules biologiques ou des récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses. Les aptamères sont des ligands de nature nucléique caractérisés par une forte affinité de fixation et une excellente spécificité vis-à-vis de leurs cibles, et présentant de faibles toxicité et immunogénicité. La fonctionnalisation de nanoparticules par des aptamères représente donc une stratégie de délivrance de principes actifs prometteuse et innovante pour améliorer le ciblage des tumeurs.*

*Le récepteur CD44 a été décrit comme un biomarqueur tumoral important, particulièrement dans le cas des cellules souches cancéreuses, qui constituent une population cellulaire capable de renouvellement, de prolifération et de différenciation en nombreuses cellules tumorales. Plusieurs études conduites par l'équipe du Pr Elias Fattal ont montré l'intérêt de l'acide hyaluronique comme ligand de ciblage pour l'adressage de petites molécules ou de macromolécules à des cellules surexprimant CD44. Cependant, l'acide hyaluronique exogène peut dans certains cas présenter une activité pro-angiogénique ou inflammatoire, et manquer de spécificité. L'objectif de ce travail est de concevoir un nouveau type de nanovecteur reposant sur l'utilisation d'un aptamère anti-CD44 conjugué à des liposomes PEGylés encapsulant des siRNA modèles, et d'en évaluer l'efficacité in vitro et in vivo.*

*Ce manuscrit comporte deux parties :*

*La première partie passe en revue la littérature sur les aptamères et les récentes avancées dans les thérapies ciblées du cancer utilisant les aptamères, notamment les nanoparticules fonctionnalisées par des aptamères et les conjugués entre molécules actives et aptamères.*

*La seconde partie décrit les résultats expérimentaux obtenus et se divise en trois chapitres :*

- *Le premier chapitre décrit la sélection in vitro d'aptamères d'ARN dirigés contre la protéine CD44. Il comprend i) la conception de motifs d'ADN, ii) l'amplification de cet ADN par PCR, iii) la transcription in vitro de la bibliothèque d'ADN en ARN, iv) la fixation et l'isolement des aptamères fixés à la protéine CD44, v) le clonage, le séquençage et la caractérisation des séquences d'aptamères fixées, vi) les mesures d'affinité, vii) l'évaluation de la capacité de fixation au niveau cellulaire, et viii) l'évaluation de la stabilité des aptamères. Ce chapitre a été publié dans *Journal of Nucleic Acid Therapeutics* en 2013.*
- *Le deuxième chapitre décrit la fonctionnalisation de surface de liposomes PEGylés par un aptamère anti-CD44 sélectionné au chapitre 1 et leur interaction avec plusieurs modèles cellulaires exprimant CD44. Ce chapitre comprend i) la préparation et la caractérisation des liposomes, ii) l'optimisation de la chimie de greffage de l'aptamère anti-CD44 à la surface des liposomes, iii) les mesures d'affinité vis-à-vis de la protéine CD44 de l'aptamère libre et de l'aptamère conjugué aux liposomes, iv) l'étude de la capture des différents liposomes par les cellules et iv) l'analyse de leur potentiel inflammatoire. Ce chapitre a été fait l'objet d'une publication dans *Bioconjugate Chemistry* en 2015.*
- *Le troisième chapitre décrit l'efficacité d'extinction génique ds liposomes fonctionnalisés par l'aptamère anti-CD44 sélectionné et chargés en siRNA, in vitro et in vivo. Ce chapitre comprend i) l'encapsulation des*

*siRNA dans les liposomes PEGylés et son optimisation, ii) la fonctionnalisation des liposomes chargés en siRNA avec l'aptamère anti-CD44 par post-insertion, iii) l'évaluation de l'extinction génique in vitro, iv) la mise en place d'un modèle murin de cancer du sein humain par xénogreffe orthotopique, v) l'évaluation de la capacité d'extinction génique in vivo par la mesure de l'activité luciférase en bioluminescence et par Q-PCR. Ce chapitre a été écrit sous la forme d'un article de recherche en vue d'une soumission pour publication.*

*À la fin du manuscrit, les résultats obtenus font l'objet d'une discussion générale et plusieurs perspectives sont proposées.*

*Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'Institut Galien Paris-Sud, sous la direction du Pr Elias Fattal et du Dr Hervé Hillaireau. La partie correspondant à la sélection de l'aptamère a fait l'objet d'une collaboration entre le Pr Said Ismail à l'Université de Jordanie et l'équipe du Pr Elias Fattal. Cette thèse a été financée par la société pharmaceutique ALHIKMA et Campus France en Jordanie.*

# *Travaux Antérieurs*

---

## *Les aptamères dans le ciblage et le traitement des tumeurs*

### *Résumé*

*Les aptamères sont des ligands de type nucléique caractérisés par une forte affinité et une forte spécificité pour leurs cibles. Le processus de sélection est maîtrisable, la modification chimique est aisée et leur taille est petite. Par conséquent, les aptamères sont des molécules attrayantes pour le développement de thérapies anticancéreuses innovantes. Ce chapitre se concentre sur les avancées récentes dans l'utilisation des aptamères comme ligands de ciblage pour la fonctionnalisation de nanovecteurs, mais également comme molécules pharmacologiquement actives (agonistes comme antagonistes) pour le traitement des tumeurs.*

# *Travaux expérimentaux*

---

## *Chapitre 1*

### *Sélection in vitro d'aptamères d'ARN modifiés dirigés contre CD44, marqueur des cellules souches cancéreuses*

#### *Résumé*

*Les cellules souches cancéreuses (CSCs) sont une sous-population de cellules tumorales possédant la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en diverses cellules qui constituent la masse tumorale. La glycoprotéine de surface CD44 est l'un des marqueurs les plus communément employés pour identifier les CSCs. Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques sélectionnés à partir de pools de séquences aléatoires et qui peuvent se lier à un large éventail de cibles avec une affinité et une spécificité élevées. Dans cette étude, la technique d'évolution systématique des ligands par enrichissement exponentielle (SELEX) a été employée pour isoler des aptamères d'ARN à partir d'une bibliothèque d'environ  $10^{14}$  ARN modifiés par des 2-F-pyrimidines, en utilisant une protéine CD44 recombinante humaine complète. Après 11 tours itératifs de SELEX, les aptamères sélectionnés ont été clonés et séquencés, conduisant à l'identification de trois séquences différentes. L'affinité et la spécificité de liaison de l'aptamère majoritaire ont été évaluées sur plusieurs modèles cellulaires représentatifs du cancer du sein exprimant CD44 : MDA-MB-231,*

*MCF7 et T47D. L'aptamère sélectionné (Apt1) est capable de se fixer spécifiquement à ces cellules cancéreuses comme l'ont montré les analyses en cytométrie en flux et en microscopie de fluorescence, avec une intensité corrélée au niveau d'expression du CD44 à la surface de ces cellules. Cet aptamère peut donc être utilisé pour le ciblage des cellules CD44<sup>+</sup>, y compris les cellules souches cancéreuses, en vue de la détection, du tri, et de l'enrichissement cellulaire, ainsi que pour la fonctionnalisation de nanovecteurs de principes actifs.*

*Ce chapitre a été publié dans Journal of Nucleic Acids Therapeutics en 2013 comme auteurs. Authors Nidaa Ababneh, Walhan Alshaer, Omar Allozi, Azmi Mahafzah, Mohammed El-Khateeb, Herve´ Hillaireau, Magali Noiray, Elias Fattal, and Said Ismail.*

# *Travaux expérimentaux*

---

## *Chapitre 2*

### *Fonctionnalisation de liposomes avec un aptamère anti-CD44 pour le ciblage sélectif des cellules cancéreuses*

#### *Résumé*

*Dans cette étude, l'aptamère Apt1 à base d'ARN modifié par des 2'-F-pyrimidines, précédemment sélectionné pour son affinité pour CD44, a été conjugué à la surface de liposomes PEGylés en utilisant une réaction de type thiol-maléimide. Cette conjugaison a été confirmée par le changement de taille et de potentiel zéta et par électrophorèse sur gel d'agarose, et a été quantifiée en utilisant un dérivé fluorescent d'Apt1. L'affinité d'Apt1 pour CD44 a été améliorée par la conjugaison aux liposomes par rapport à l'aptamère libre. La capture cellulaire des liposomes fonctionnalisés a été évaluée par cytométrie en flux et par microscopie confocale sur deux lignées cellulaires CD44<sup>+</sup>, A549 (cancer du poumon humain) et MDA-MB-231 (cancer du sein humain), et a été comparée à une lignée cellulaire CD44<sup>-</sup> de fibroblastes embryonnaires de souris (NIH/3T3). Les résultats ont montré une capture cellulaire doublée des liposomes fonctionnalisés par rapport aux liposomes nus, mais seulement sur les cellules CD44<sup>+</sup>. En conclusion, nous démontrons la possibilité de conjuguer un aptamère anti-CD44 à la surface de liposomes, permettant d'augmenter préférentiellement leur capture par des cellules cancéreuses exprimant CD44. De tels liposomes constituent des nanovecteurs prometteurs pour le ciblage*



*actifs de tumeurs surexprimant CD44.*

*Ce chapitre a été publié dans Bioconjugate Chemistry en 2014, avec comme auteurs Walhan ALSHAER, Hervé HILLAIREAU, Juliette VERGNAUD, Said ISMAIL, Elias FATTAL.*

# *Travaux expérimentaux*

---

## *Chapitre 3*

*Extinction génique ciblée dans un modèle de cancer du sein exprimant CD44 à l'aide de liposomes chargés en siRNA et fonctionnalisés par un aptamère*

### *Résumé*

*Dans ce chapitre, nous décrivons un système de délivrance de gènes pour le ciblage actif des cellules exprimant CD44, reposant sur l'utilisation de l'aptamère anti-CD44 Apt1 et de siRNA dirigés contre le gène rapporteur de la luciférase (luc2). Ainsi, un siRNA anti-luc2 a été complexé à la protamine pour former des polyplexes (siRNA/prot) à leur tour encapsulés dans les liposomes PEGylés préformés, aboutissant à des liposomes contenant environ 0,62 nmol de siRNA par mg de lipides (siRNA/prot  $\subset$  lip). L'aptamère Apt1 a été conjugué à un phospholipide modifié puis introduit sur la surface des liposomes par post-insertion. Les liposomes résultants, fonctionnalisés par Apt1 et chargés en siRNA (siRNA/prot  $\subset$  lip-Apt1), présentent une taille de  $137 \pm 3$  nm et un potentiel zeta de  $-26.8 \pm 2,3$  mV. Ces liposomes ont montré une inhibition spécifique de l'expression de luc2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231-luc2-GFP plus élevée comparée aux liposomes non fonctionnalisés siRNA/prot  $\subset$  lip. Pour évaluer la capacité d'extinction génique in vivo, un modèle murin de xélogreffe orthotopique de cancer du sein humain a été mis au point en implantant les cellules MDA-MB-231-luc2-GFP chez des souris*

*« nude » femelles. Les liposomes siRNA/prot  $\subset$  lip-Apt1 ont montré une inhibition prolongée de l'expression de luc2 comparés aux liposomes siRNA/prot  $\subset$  lip après des administrations intraveineuses uniques ou répétées, ce qui a été confirmé par une extinction plus importante de l'ARNm de luc2 dans les cellules des tumeurs réséquées. En conclusion, nous montrons la possibilité de conjuguer un aptamère à des liposomes contenant un siRNA en vue d'une extinction génique efficace dans des cellules tumorales CD44<sup>+</sup> in vivo, ceci dans la perspective d'éteindre des gènes spécifiques de pathologies cancéreuses.*

*Ce chapitre est écrit sous la forme d'un article de recherche en vue d'une publication, avec pour auteurs Walhan ALSHAER, Hervé HILLAIREAU, Ilaria BERTOLINI, Juliette VERGNAUD, Simona MURA, Claudine DELOMENIE, Félix SAUVAGE, Said ISMAIL, Elias FATTAL.*

## Conclusion

### **Fonctionnalisation de liposomes par des aptamères pour le ciblage actif des cellules cancéreuses**

**Mots clés :** Aptamères, CD44, Liposomes, siARN, Délivrance ciblée

Dans ce travail, nous avons réussi à sélectionner par la méthode SELEX un aptamère ARN modifié nommé Apt1, celui-ci se lie avec une haute affinité à la protéine du récepteur CD44. L'aptamère sélectionné a été modifié avec de la 2'-F-pyrimidine pour augmenter sa stabilité contre les nucléases et améliorer son action biologique. Cet aptamère a été ensuite fonctionnalisé sur des liposomes et des séquences de siRNA ont été encapsulées à l'intérieur. Ce système permet un ciblage actif des cellules tumorales exprimant le récepteur CD-44 pour une délivrance ciblée des siRNA *in vitro* et *in vivo*. Une telle fonctionnalisation a été réalisée par une conjugaison chimique de type thiol- maléimide entre le 3'-thiol modifié de Apt1 et le maléimide fonctionnalisé à la surface des liposomes. Les liposomes formulés présentent une forte affinité pour les cellules exprimant le CD44 sans déclencher de réponse inflammatoire indésirable au sein de ces cellules. En outre, les données de cette étude montrent que l'inhibition du gène ciblé par le siARN est augmentée *in vitro* et *in vivo* grâce à notre liposome couplé à l'aptamère. Le ciblage des siRNA par ce système de ciblage actif peut être utilisé pour le traitement de tumeurs exprimant le récepteur CD44 et inhiber la croissance tumorale *in vivo*. L'étape suivante consiste à charger ce système de délivrance de siRNA par d'autres séquences qui permettent de réprimer des gènes de la maladie.