



HAL
open science

Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de courtes séquences d'ARN interférents

Jonathan Bruniaux

► **To cite this version:**

Jonathan Bruniaux. Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de courtes séquences d'ARN interférents. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GREN025 . tel-01553465

HAL Id: tel-01553465

<https://theses.hal.science/tel-01553465>

Submitted on 3 Jul 2017

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie/Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

M. Jonathan BRUNIAUX

Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de courtes séquences d'ARN interférents

Thèse soutenue publiquement le **01 décembre 2014**,

Devant le jury composé de :

Dr. Xavier GIDROL

Directeur de recherche CEA-iRTSV Grenoble

Directeur de thèse

Dr. Nathalie MIGNET

Directeur de recherche CNRS, Université Paris Descartes

Président

Pr. Muriel BARBERI-HEYOB

Professeur des universités, Université de Lorraine

Rapporteur

Dr. Anna POLESSKAYA

Chargé de recherche CNRS, CEA-iBiTec Saclay

Rapporteur

Pr. Stéphanie BRIANÇON

Professeur CNRS, Université de Lyon

Examineur

Dr. Fabrice NAVARRO

Chargé de recherche CEA-LETI Grenoble

Encadrant

Dr. Éric SULPICE

Chargé de recherche CEA-iRTSVGrenoble

Encadrant



Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien apportés par de nombreuses personnes avec lesquelles j'ai eu la chance d'interagir au cours de ces dernières années. Je tiens donc, à travers ces quelques mots, à leur exprimer ma reconnaissance.

Un grand merci :

À Christine Peponnet et Xavier Gidrol qui ont cru en moi en appuyant ma candidature, me permettant ainsi de pouvoir effectuer cette thèse au sein du CEA. Xavier, en tant que directeur de thèse et chef de l'équipe Biomics, merci également d'avoir orienté ces travaux afin d'exploiter au mieux le potentiel de cette étude, et de m'avoir accueilli dans l'équipe.

À Françoise Vinet et Guillaume Delapierre qui m'ont accueilli dans le second laboratoire de cette collaboration, tour à tour le LFCM et le LBAM, où j'ai pu évoluer dans un environnement où je me suis parfaitement intégré, notamment grâce à une très bonne ambiance avec les thésards et jeunes post-doctorants.

À mes deux encadrants Éric Sulpice et Fabrice Navarro. Éric pour son temps passé à me former sur diverses techniques biologiques, notamment en début de thèse. Fabrice pour sa présence, son côté formateur, ses conseils et sa confiance, me prenant assez rapidement pour un chercheur à part entière dont l'avis et l'expertise importait. Merci beaucoup à tous les deux pour ces trois ans et demi.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance d'être en interaction avec deux laboratoires, profitant ainsi des compétences et des conseils de nombreuses personnes.

Je tiens donc à remercier l'équipe Biomics, en particulier Frédérique Mittler qui m'a accompagné tout au long de ces années. Merci pour ton soutien, ta bienveillance, les discussions sous le PSM, au FACS ou entre deux couloirs et ton apport expérimental qui m'a beaucoup aidé. Merci également aux autres membres de l'équipe Biomics pour leur bonne humeur (notamment musicale avec les BioMiss) et leur support au niveau des cultures cellulaires et lors des campagnes expérimentales de grande envergure, notamment Stéphanie Combe, Clément Milet et Cassandra Chatroux. Enfin, les expériences sur la culture tridimensionnelle m'ont permis d'interagir avec d'autres personnes de l'équipe Biomics, notamment Frédérique Kermarrec qui a pris beaucoup de temps pour moi, et je la remercie pour ceci. Je tiens également à témoigner ma reconnaissance à Nathalie Picollet D'hahan qui m'a permis d'interagir avec son équipe et à Monika Dolega pour ses quelques conseils sur les techniques de culture 3D.

Côté DTBS, de très nombreuses personnes m'ont beaucoup apporté également. Je tiens particulièrement à remercier la « team Navarro », la dream team, et les personnes qui sont devenus des amis la composant. Mathilde Menneteau, ma petite Mathilda, pour ton aide en biologie, mais surtout pour tout le reste : les délires, les innombrables discussions et ta bonne humeur (sourire à mes blagues nulles même quand tu es ronchon, c'est très classe). Thomas Courant, la foudre, toujours très disponible pour donner des conseils en chimie ou en physico-chimie, et qui a été sans conteste l'une des personnes importantes de cette aventure de par la parfaite entente et complicité qu'il s'est établi entre nous (en quelques mots pouvant être retranscrit, ça me semble difficile de décrire tout ton apport pendant cette thèse, mais tu sais déjà... mais ouiiii). Jessica Morlieras, ma voisine de bureau qui m'a plutôt bien supporté avec mes chansons entêtantes. Tu as su te fondre parfaitement dans notre groupe, tout en apportant ta folie non-négligeable (la pire ? peut être...) et ton imagination débordante. Fabien Abeille (dans la team par adoption mais ça compte), un vrai ami toujours présent pour donner un coup de main, rigoler ou faire des blagues sur des bureaux innocents.

Merci à Julien Gravier pour son apport et sa formation pour la formulation des nanoparticules. Anne-Claude Couffin pour son aide et son expertise en physico-chimie. Isabelle Texier et ses conseils, notamment en ce qui concerne les études sur le FRET. Marie Escudé, la maman du laboratoire, pour tes PEG sur-mesure et pour ta bonne humeur. Alan Hibbitts du pays de la Guinness, qui en peu de temps, m'a plus fait parler anglais qu'en toute une vie, et ça en vaut largement la peine.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer à travers cette thèse. François de Crecy pour l'élaboration du plan d'expérience et Thierry Bastogne pour son interprétation. Une complémentarité me permettant de comprendre l'énorme intérêt de ce type de démarche. Je souhaite également remercier Nicolas Gonzales pour son expertise sur l'imagerie hyperspectrale, un outil très intéressant. Enfin, Christophe Le Goaller pour son aide, sa disponibilité et son travail lors de l'établissement des trois brevets permis par ces travaux.

Bien sûr, les conditions de travail que j'ai connu au cours de cette thèse ont été directement dépendantes de la présence des personnes qui m'ont entouré au quotidien, et surtout de leur bonne humeur.

Les anciens... : Émilie, Marco, Koce, Prisca, Claire Tkt, Justine, Pauline, Aurély, Xavouz, Hélène, Coline, Raph

... et ceux présents jusqu'au bout : Fabien Bzz, Thomas, Mathilda, Jess, Fred Hi, Monika, Lisa, David, Claire, Antho, Marjo, PH, Alan, Alice ...

Merci à tous pour toutes les discussions, les bons moments, les délires, les chansons, les pauses, les after work, les jeudis Callaghan (avec bien sûr Manu, Marick et Marine) et surtout les blagues absolument pas drôles partagés ensemble. Si je l'osais, je ferais un discours version miss France pour dire que c'était une très belle aventure humaine (... *ah... j'ai osé... désolé*).

Enfin, je tiens à remercier les personnes non-scientifiques m'ayant accompagné au quotidien. Merci :

À Hajar, pour son soutien pendant la rédaction, même en étant loin, ses conseils et sa bonne humeur permanente ;

À Laura, ma petite alsacienne préférée, pour sa faculté à me changer les idées et à être toujours présente quand il le faut ;

À Yves, mon meilleur ami depuis presque 20 ans... on se comprend toujours aussi bien et ça fait très peur.

Et bien sûr, à toi ma Laura, ma meilleur amie. Ta présence quotidienne depuis ces nombreuses années à contribuer à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours épaulé, d'être toujours là et de me rendre meilleur.

ARNi = ARN interférence

miARN/siARN = *microARN/small interfering* ARN – courtes séquences d'ARN interférent

ARNm = ARN messenger

UTR = *UnTranslated Regions* – régions non-traduites d'un ARNm

PEI = PolyÉthylène Imine – polymère cationique

CPP = *Cell Penetrating Peptide* – peptide favorisant l'internalisation dans les cellules

SNALP = *Stable Nucleic Acid Lipid Carrier* – nanovecteur liposomal pour le transport de séquences d'acides nucléiques

SLN = *Solid Lipid Nanoparticles* – particules lipidiques possédant un cœur hydrophobe cristallin

NLC = *Nanostructured Lipid Carriers* – particules lipidiques possédant un cœur hydrophobe n'étant pas totalement cristallin

LNP/cLNP = *Lipid NanoParticles/cationic Lipid Nanoparticles* – Nanoparticules lipidiques

FXX = Formulation de nanoparticules LNP possédant un diamètre moyen de XX nanomètres

PEG = PolyÉthylène Glycol – polymère neutre

DOTAP = 1,2-DiOleoyl-3-TrimethylAmmonium-Propane – lipide cationique

DOPE = 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine – lipide fusogène

DLS = *Dynamic Light Scattering* – technique d'analyse spectroscopique par diffusion dynamique de la lumière

PDI = *PolyDispersity Index* – distribution d'une population de particules en taille

DOE = *Design Of Experiment* – plan d'expérience associé à une démarche mathématique

R² = coefficient de détermination – c'est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire, simple ou multiple. D'une valeur comprise entre 0 et 1, il mesure l'adéquation entre le modèle et les données observées.

rpm = rotation par minute

rapport molaire N/P = rapport du nombre de groupement ammonium N, provenant des lipides cationiques, sur le nombre de groupement phosphate P provenant des acides nucléiques – équivalent à un rapport « charge positive » sur « charge négative »

GFP = *Green Fluorescent Protein* – protéine de fluorescence verte

NGF = *Nerve Growth Factor* – facteur de croissance du tissu nerveux

WST-1 = *Water Soluble Tetrazolium salt* – sels de tétrazolium utilisés pour la détermination de l'activité mitochondriale lors de tests de cytotoxicité

LDH release = *Lactate DeHydrogenase release* – mesure permettant d'établir le niveau d'intégrité membranaire lors de tests de cytotoxicité

CFE = *Colony Forming Efficiency* – mesure de la capacité des cellules à former des colonies après incubation avec une molécule d'intérêt afin d'établir un profil de cytotoxicité

Résumé :

L'ARN interférence est un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel, capable de réguler l'expression des gènes. Ce mécanisme endogène, activé par l'intermédiaire d'ARN interférents, peut être détourné après transfection de courts fragments d'ARN synthétiques, notamment les siARN. Cette technique autorise ainsi le ciblage spécifique de l'ensemble des gènes composant le génome, dont l'extinction transitoire permet d'étudier à la fois leurs fonctions, mais aussi de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux biomarqueurs. Ce très fort potentiel pour la recherche *in vitro* se retrouve également *in vivo*, où l'ARN interférence peut être directement utilisé comme agent thérapeutique pour des situations pathologiques telles que les cancers, les infections ou les maladies systémiques. Cependant, la délivrance intra-cytoplasmique des ARN interférents exogènes est nécessaire pour déclencher ce mécanisme de régulation. À l'heure actuelle, en dépit de nombreuses méthodes de transfection développées dans la littérature, cette étape de délivrance reste une limite importante selon les applications envisagées.

En ce sens, ces travaux de thèse ont permis de développer un nouveau vecteur à base de nanoparticules lipidiques cationiques, les cLNP, dédié à la transfection cellulaire de siARN. Cette formulation de cLNP a été adaptée, à l'aide d'un plan d'expérience, d'une formulation neutre de LNP permettant l'encapsulation de molécules lipophiles pour des applications en imagerie de fluorescence et/ou de délivrance de médicaments liposolubles. Les caractérisations physico-chimiques des particules cLNP ont démontré une très forte stabilité colloïdale, à la fois pour dans les tampons aqueux et dans les milieux de culture cellulaire complétés par du sérum. En outre, ces nano-vecteurs se sont avérés extrêmement efficaces pour établir et conserver des liaisons électrostatiques avec des siARN, permettant ainsi d'obtenir rapidement des complexes démontrant une stabilité élevée dans le temps. Les efficacités d'inhibition fonctionnelle de ces nanoparticules ont été testées avec succès sur 3 lignées cellulaires différentes (PC3, HeLa et U2OS). L'ensemble des résultats obtenus confirme le fort potentiel de ce nouveau nano-vecteur, en termes d'inhibition fonctionnelle et d'absence de cytotoxicité, et le positionne parmi les meilleurs agents de transfection commerciaux testés. Ces caractéristiques sont complétées par des capacités de multi-modalité, dont la possibilité d'encapsuler dans le cœur des particules des drogues ou des fluorophores lipophiles. Enfin, des tests préliminaires réalisés sur des cellules considérées comme difficile à transfecter (cellules primaires, cellules non-adhérentes, neurones), ou sur des structures cellulaires tridimensionnelles plus complexes, ouvrent de nouvelles perspectives extrêmement prometteuses.

Abstract

RNA interference is a post-transcriptional inhibition mechanism, inducing the specific regulation of gene expression. This endogenous mechanism can be triggered by the transfection of exogenous interfering RNA fragments, including siRNA. This technique allows specific targeting of all the genes making up the genome, whose temporary extinction allows for the study of their function. This technique can also now be used to discover new therapeutic targets and new biomarkers. This strong research potential *in vitro* is also found *in vivo*, whereby RNA interference can be used directly as a therapeutic agent for pathological conditions such as cancer, infections or systemic diseases. However, the cytoplasmic accessibility of exogenous siRNA is required to trigger the mechanism of regulation. Currently, despite numerous transfection methods developed in the literature, this step in siRNA delivery remains an important limitation for any envisaged application.

Considering this limitation, this thesis aimed to develop a new cationic lipid-based carrier, cLNP, dedicated to cell transfection. Using a design of experiment, this formulation of cLNP was adapted from a neutral formulation encapsulating lipophilic molecules previously used for applications in fluorescence imaging and/or drug delivery. The physicochemical characterization of the cLNP particles showed strong colloidal stability, both in aqueous buffers and in cell culture media supplemented with serum. In addition, these nanovectors have proven extremely efficient in establishing and maintaining of electrostatic bonds with siRNA, thereby yielding complexes with high stability over time. Functional inhibition efficiencies of these nanoparticles have been successfully tested on three different cell lines (PC3, HeLa and U2OS). The overall results confirmed the high potential of this new nano-vector, in terms of functional inhibition and absence of cytotoxicity, and ranks among the better commercial transfection reagents tested. These features are complemented by multimodality abilities, including the encapsulation of drugs or lipophilic fluorophores. Finally, preliminary tests on difficult-to-transfect cells (primary cells, non-adherent cells, neurons) or three-dimensional cellular structures opened new promising perspectives.

Remerciements	3
Abréviations/Notations	7
Résumé	9
Abstract	11
Introduction	19
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre I. L'ARN interférence : du mécanisme naturel à l'outil pour la recherche	27
1. Le mécanisme d'ARNi	29
1.1. Généralités	29
1.1.1. De l'ADN à l'expression de la protéine	29
1.1.2. L'ARN messenger, cible de l'ARN interférence	31
1.2. Historique : découverte et compréhension du mécanisme d'ARNi.....	32
1.2.1. Les premières observations prometteuses.....	32
1.2.2. La compréhension de l'ARNi : vers le prix Nobel	32
1.3. Le fonctionnement du mécanisme d'ARNi	34
1.3.1. Le mécanisme endogène	34
1.3.2. Le détournement du mécanisme endogène : internalisation de molécules synthétiques exogènes	37
1.4. Conclusion	39
2. L'ARNi : un mécanisme aux multiples intérêts	39
2.1. Un outil pour la compréhension de la fonction des gènes	39
2.1.1. Un intérêt pour le diagnostic précoce : la recherche de biomarqueurs	40
2.1.1.1. Définition	40
2.1.1.2. La recherche de marqueurs biologiques dans les faits.....	41
2.1.2. Un intérêt pour préparer une approche curative : la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.....	41
2.1.2.1. Définition	41
2.1.2.2. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les faits.....	41
2.2. Un outil à visée thérapeutique	42
2.2.1. Définition	42
2.2.2. Les essais cliniques basés sur l'ARNi	43
2.3. Conclusion	45
3. Induction de l'ARNi : contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques	46
3.1. La stabilité des ARN interférents	46
3.2. La biodistribution	47
3.2.1. Une distribution non-spécifique	47
3.2.2. L'internalisation	48
3.2.3. L'accessibilité du compartiment cytoplasmique.....	49
3.2.3.1. Échappement endosomal par « appariement ionique ».....	50

3.2.3.2. Échappement endosomal par « effet pompe à protons »	51
3.2.4. Les effets secondaires potentiellement néfastes de l'utilisation des siARN	52
3.2.4.1. L'induction possible de réponses immunitaires	52
3.2.4.2. Les effets aspécifiques	53
3.2.4.3. La saturation des voies endogènes	54
3.3. Conclusion sur	54
4. Conclusion	55
Chapitre II. Les outils disponibles pour la transfection des siARN	65
1. Les méthodes de transfection physiques et chimiques	67
1.1. Les méthodes physiques	67
1.1.1. Par perturbation des membranes	67
1.1.2. Bombardement de gènes	71
1.1.3. Micro-injection	71
1.1.4. Conclusion sur les méthodes physiques	72
1.2. Méthodes de transfection de transfection après modifications chimiques des siARN	72
1.2.1. Modifications intrinsèques des siARN	73
1.2.1.1. Chimie sur le groupement phosphate	73
1.2.1.2. Chimie sur le ribose	74
1.2.2. Conjugaison à d'autres molécules	75
1.2.2.1. Groupements lipophiles	75
1.2.2.2. Groupements aptamères	76
1.2.2.3. Groupements peptidiques	77
1.2.3. Conclusion sur les modifications chimiques	77
1.3. Conclusion sur les stratégies de transfection physiques et chimiques	78
2. Les vecteurs pour la transfection de siARN	80
2.1. Les vecteurs viraux	80
2.1.1. Les différentes classes de vecteurs viraux	80
2.1.2. Conclusion sur les vecteurs viraux	82
2.2. Les vecteurs synthétiques pour la transfection de siARN	83
2.2.1. Les nanoparticules pour la transfection	83
2.2.2. Les classes de vecteurs synthétiques non-lipidiques	85
2.2.2.1. Les vecteurs inorganiques	85
2.2.2.2. Les vecteurs polymériques	87
2.2.2.3. Les vecteurs peptidiques	95
2.2.2.4. Conclusion sur les vecteurs synthétiques non-lipidiques	101
2.2.3. Les vecteurs synthétiques lipidiques	103
2.2.3.1. Les liposomes neutres	103
2.2.3.2. Les lipoplexes	104

2.2.3.3. Les nanoparticules lipidiques cationiques.....	109
2.2.3.4. Conclusion sur les vecteurs lipidiques synthétiques	111
3. Conclusion sur les moyens de transfection de siARN	113
4. Objectifs de la thèse.....	114
PARTIE EXPERIMENTALE	131
Matériels et méthodes.....	133
<i>Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer de siARN</i>	151
1. Les différentes classes de nanoparticules lipidiques.....	153
1.1. Les nanoémulsions.....	155
1.2. Les vecteurs lipidiques solides	156
1.3. Les nanovecteurs lipidiques nanostructurés	157
1.4. Conclusion sur les différentes classes de nanoparticules lipidiques.....	158
1.5. Les vecteurs développés au CEA-LETI : les LNP.....	159
2. Stratégie de modification des nanoparticules LNP	160
2.1. Approche par modification de surface des particules	160
2.2. Preuve de concept : les LNP pour la transfection	162
2.2.1. Formulation de particules cationiques cLNP	162
2.2.2. Résultats préliminaires en transfection fonctionnelle.....	166
2.2.3. Conclusion des essais préliminaires.....	168
2.3. Rationalisation de l'étude : développement d'un plan d'expérience.....	169
2.3.1. Plan mathématique	169
2.3.2. Mise en place du plan d'expérience	169
2.3.3. Optimisation du plan d'expérience.....	171
2.3.4. Modélisation des différentes réponses obtenues	172
2.3.4.1. Interprétation de la réponse quantitative en polydispersité	172
2.3.4.2. Interprétation de la réponse quantitative pour la stabilité dans les milieux	174
2.3.4.3. Interprétation de la réponse quantitative pour l'efficacité d'inhibition fonctionnelle	176
2.3.4.4. Bilan du plan d'expérience	179
3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules issues du plan d'expérience	182
3.1. Caractéristiques des nanoparticules cationiques cLNPa et cLNPb	182
3.2. Compréhension des particules cLNPa et cLNPb à travers leur composition	183
3.3. Étude de la stabilité colloïdale des cLNP.....	185
4. Discussion	188
5. Conclusion sur la conception des cLNP.....	189
Chapitre IV. Caractérisation des interactions nanoparticules/siARN	197
1. Complexation : compréhension et optimisation	199

1.1. Caractérisation théorique de l'interaction cLNP/siARN.....	199
1.2. Optimisation du rapport N/P pour la complexation	201
2. Étude de rétention des siARN sur les particules cLNP.....	206
2.1. Rétention dans le tampon Hepes 5 mM	206
2.2. Rétention dans le milieu de culture utilisé pour la transfection.....	207
3. Stabilité colloïdale des particules dans les conditions de transfection	209
3.1. Principe de la technique de FRET.....	210
3.2. Résistance des particules cLNP à la dilution	212
3.3. Stabilité des cLNP dans le milieu de culture utilisé pour la transfection	215
4. Discussion	217
5. Conclusion	218
Chapitre V. Les nanoparticules cLNP pour la transfection de siARN.....	214
1. Transfection : internalisation des siARN	216
1.1. Internalisation des nanoparticules cLNP.....	216
1.2. Transfection des siARN	220
1.3. Les mécanismes d'internalisation des complexes cLNP/siARN.....	223
2. Transfection de siARN fonctionnels	229
2.1. Cinétique de l'inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN	230
2.2. Optimisation des concentrations en siARN et en cLNP	232
2.2.1. Optimisation des concentrations nanoparticulaires.....	233
2.2.2. Optimisation de la concentration en siARN.....	235
2.2.3. Importance de la quantité en nanoparticule pour la transfection.....	237
2.3. Comparaison des efficacités d'inhibition fonctionnelle par rapport aux agents de transfection commerciaux.....	239
2.4. Les avantages apportés par les nanoparticules cLNP	244
2.4.1. Étude de la cytotoxicité induite lors de la transfection	244
2.4.1.1. Cytotoxicité des nanoparticules cLNP seules	244
2.4.1.2. Cytotoxicité des complexes cLNPa/siARN	249
2.4.2. Suivi de la transfection par fluorescence.....	251
3. Vers une utilisation générique des nanoparticules cLNP	255
3.1. Inhibition fonctionnelle sur un autre modèle cellulaire	255
3.2. Transfection de différentes séquences d'acides nucléiques	256
3.3. Vers des applications de type criblage à haut-débit	259
4. Discussion	261
5. Conclusion	265

Chapitre VI. Délivrance active de siARN sur des cellules et structures difficiles à transférer.....	279
1. Les modèles cellulaires difficiles à transférer.....	281
1.1. Description des modèles cellulaires.....	281
1.2. Interaction des siARN avec les cellules difficiles à transférer	284
2. Les structures difficiles à transférer : culture 3D.....	288
2.1. Principe de la culture tridimensionnelle	288
2.2. Transfection fonctionnelle sur culture 3D de PC3-GFP.....	291
2.2.1. Mise en place du modèle d'étude	291
2.2.2. Optimisation du rapport molaire N/P.....	292
2.2.3. Optimisation de la concentration en siARN.....	298
2.3. Étude de la cytotoxicité induite	300
3. Discussion	303
4. Conclusion	306
Conclusions	311
Annexes	317
Valorisations	335

INTRODUCTION

Le cancer est la principale cause de décès dans le monde, en atteste les rapports les plus récemment fournis par l'agence internationale pour la recherche lors du projet GLOBOCAN qui, en 2012, a recensé 8,2 millions de décès dus à cette cause, soit 0,6 million de plus en quatre ans [1, 2]. Une estimation a d'ailleurs prédit une augmentation d'environ 40% du nombre de décès dû à ce type de pathologie dans les quinze prochaines années. Les cancers sont caractérisés par des mutations géniques induisant une croissance cellulaire incontrôlée, associées à des tumeurs malignes envahissant les tissus voisins ou à distance. Actuellement, le traitement conventionnel pour ce type de pathologie implique des interventions chirurgicales, des chimio- et/ou radiothérapie, seules ou en combinaison. Cependant, des effets secondaires importants sont associés à ces types de traitement qui, dans de nombreux cas, démontrent une efficacité limitée. En effet, les faibles taux de réponse à ces thérapies peuvent être dus à une incompatibilité génétique, une accessibilité difficile des tumeurs, une sévère toxicité ou même une combinaison de tous ces éléments.

Les mutations géniques causant les cancers entraînent des modifications très complexes des fonctions cellulaires, pouvant alors affecter de multiples voies biologiques. Par conséquent, l'un des défis émergeant pour un traitement efficace du cancer consiste à déterminer et cibler les mécanismes pathogènes spécifiquement impliqués. Cependant, la plupart des cancers possédant un code génétique unique, de nombreux mécanismes peuvent être mis en cause, rendant alors souvent les traitements conventionnels inefficaces [3]. En raison de cette forte hétérogénéité, il devient primordial de considérer chaque cancer comme des maladies uniques, y compris ceux impliqués dans le même tissu et/ou possédant la même classification [4-6]. Ainsi, pour améliorer la spécificité du traitement et ainsi soigner des maladies génétiques telles que le cancer, une approche considérant une médecine personnalisée devient judicieuse [4, 5]. Cette démarche exige une compréhension des mécanismes pathogènes spécifiques et la préparation de traitements adaptés pour chaque patient [4, 5]. La révolution dans le domaine « omics » (génomique, protéomique, métabolomique entre autres) offre des outils pour l'identification des gènes spécifiques et de leurs produits plus ou moins impliqués dans une pathologie. Dans le meilleur des cas, l'idéal serait alors de cibler spécifiquement les gènes dont l'expression induit un phénotype pathologique et de le réguler afin de rétablir une expression basale, sans affecter l'expression des gènes non-impliqués dans l'état pathologique.

L'émergence du mécanisme d'ARN interférence apparaît alors comme une solution attractive pour répondre à ces problématiques. Ce mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle autorise une action régulatrice spécifique sur un gène ciblé en agissant au niveau de son ARN messenger. Ainsi, cette stratégie permet d'isoler les gènes impliqués dans les pathologies étudiées,

trouvant ainsi des biomarqueurs associés pour un diagnostic précoce et des cibles thérapeutiques en vue d'un traitement spécifique. En effet, la régulation spécifique de différents gènes permet de montrer lesquels induisent le phénotype de la pathologie étudiée, démontrant leur rôle prépondérant dans le déclenchement de la maladie. Ces gènes peuvent alors être le témoin d'un état pathologique ou même des cibles à réguler lors de traitements. En outre, le caractère ubiquitaire des enzymes impliquées dans l'ARN interférence permet une utilisation générique de ce mécanisme pour l'étude de nombreuses pathologies d'origine variée autre que les cancers (infections, maladies systémiques, maladies congénitales, virus, ...). Il est alors nécessaire de comprendre ce mécanisme et ses limites, notamment la nécessité de transporter des séquences d'ARN interférents exogènes spécifiques pour induire la régulation de l'expression du gène ciblé.

Ainsi, nous rapporterons la nécessité de développer une stratégie permettant le transport de ces ARN interférents. Différentes techniques sont d'ailleurs développées dans la littérature pour la transfection des ARN interférents. Notamment, les nanotechnologies suscitent un intérêt particulier dans ce but : le caractère nanométrique de tels vecteurs apporte des propriétés physiques, chimiques et biologiques intéressantes, en particulier un effet de surface prépondérant [7]. De tels vecteurs sont en effet utilisés depuis de nombreuses années pour la vectorisation de molécules pouvant être des agents de contraste et/ou des principes actifs [8, 9]. Dès lors, une transposition pour la vectorisation de matériel génétique, en particulier pour les ARN interférents, est possible et déjà explorée par de nombreuses équipes. Par ailleurs, les nanoparticules peuvent être de compositions très différentes afin de s'adapter aux problématiques proposées (inorganiques, peptidiques, polymériques, lipidiques). Dans le cadre de la transfection d'ARN interférent, plusieurs applications peuvent être envisagées *in vitro* et/ou *in vivo*, induisant la nécessité d'un vecteur versatile pouvant s'adapter aux différentes conditions et aux caractéristiques exigées, notamment en termes de stabilité, de furtivité ou encore d'innocuité.

En ce sens, l'objectif de ces travaux de thèse consiste à développer un nanovecteur lipidique démontrant un caractère générique pour la transfection de courtes séquences d'ARN interférents. Au cours de ce manuscrit, nous rapportons ainsi notre stratégie et nos travaux afin d'optimiser la composition d'un vecteur [10, 11], initialement formulé en tant qu'agent de contraste, et d'adapter les caractéristiques à la vectorisation de séquences d'acides nucléiques. Dès lors, quelles sont les caractéristiques qu'il est nécessaire de développer pour la formulation d'un vecteur adapté à toutes les conditions ? Une utilisation *in vitro* sur de nombreux ARN interférents différents exigent

une formulation autorisant une association rapide et post-formulation avec le vecteur. Une stratégie où le vecteur ne peut être associé qu'à un unique ARN interférent sera évitée dans notre étude. En outre, des caractéristiques d'innocuité cellulaire élevée et de maîtrise de la distribution sont nécessaires afin de contrôler la délivrance des séquences d'acides nucléiques. Ces propriétés peuvent représenter des avantages majeurs pour une transposition vers des applications *in vivo*, notamment par l'intérêt d'adapter les gammes de travail sans affecter la viabilité cellulaire. Par ailleurs, les particules étudiées au cours de ces travaux de thèse s'appuyant sur une formulation encapsulant des fluorophores lipophiles, et utilisée comme agent de contraste, des perspectives de multifonctionnalité sont offertes et peuvent présenter un avantage majeur, notamment dans un but de délivrance multiple.

Bibliographie

1. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. www.iarc.fr/en/media-center/iarnews/2010/globocan2008.php
2. WHO fact sheet. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
3. Davis JC, Furstenthal L, Desai AA, Norris T, Sutaria S, Fleming E, Ma P. The microeconomics of personalized medicine: today's challenge and tomorrow's promise. *Nat Rev Drug Discovery*. 2009;8(4):279-286.
4. Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J *et al*. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*. 2012;148(6):1293-1307.
5. Tian Q, Price ND, Hood I. Systems cancer medicine: towards realization of predictive, preventive, personalized and participatory (P4) medicine. *J Intern Med*. 2012;271(2):111-121.
6. Loscalzo J, Barabasi A. Systems biology and the future of medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2011;3(6):619-627.
7. Whitesides G. Nanoscience, nanotechnology and chemistry. *Small*. 2005;1(2):172-179.
8. Cancer Nanotechnology Plan: a strategic initiative to transform clinical oncology and basic research through the directed application of nanotechnology. N.I.O.H. National Cancer Institute, Editor. 2004:USA. (www.nano.cancer.gov).
9. European Technology Platform for Nanomedicine. Nanotechnology for health: vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine. E.C.-. ETPN, Editor. 2005. European Commission Publication office: Brussels.
10. Delmas T, Piraux H, Couffin A-C, Texier I, Vinet F, Poulin P, Cates ME, Bibette J. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2011 Mar 1;27(5):1683-92.
11. Delmas T, Couffin A-C, Bayle PA, de Crécy F, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J, Texier I. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *Journal of colloid and interface science*. 2011 Aug 15;360(2):471-81.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

L'ARN interférence : du mécanisme naturel à l'outil pour la recherche

Chapitre I. L'ARN interférence : du mécanisme naturel à l'outil pour la recherche	27
1. Le mécanisme d'ARNi	29
1.1. Généralités.....	29
1.1.1. De l'ADN à l'expression de la protéine.....	29
1.1.2. L'ARN messager, cible de l'ARN interférence.....	31
1.2. Historique : découverte et compréhension du mécanisme d'ARNi	32
1.2.1. Les premières observations prometteuses	32
1.2.2. La compréhension de l'ARNi : vers le prix Nobel	32
1.3. Le fonctionnement du mécanisme d'ARNi	34
1.3.1. Le mécanisme endogène	34
1.3.2. Le détournement du mécanisme endogène : internalisation de molécules synthétiques exogènes	37
1.4. Conclusion	39
2. L'ARNi : un mécanisme aux multiples intérêts	39
2.1. Un outil pour la compréhension de la fonction des gènes.....	39
2.1.1. Un intérêt pour le diagnostic précoce : la recherche de biomarqueurs.....	40
2.1.1.1. Définition.....	40
2.1.1.2. La recherche de marqueurs biologiques dans les faits	41
2.1.2. Un intérêt pour préparer une approche curative : la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques	41
2.1.2.1. Définition.....	41
2.1.2.2. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les faits	41
2.2. Un outil à visée thérapeutique	42
2.2.1. Définition	42
2.2.2. Les essais cliniques basés sur l'ARNi	43
2.3. Conclusion	45
3. Induction de l'ARNi : contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques	46
3.1. La stabilité des ARN interférents	46
3.2. La biodistribution.....	47
3.2.1. Une distribution non-spécifique	47
3.2.2. L'internalisation	48
3.2.3. L'accessibilité du compartiment cytoplasmique	49
3.2.3.1. Échappement endosomal par « appariement ionique ».....	50
3.2.3.2. Échappement endosomal par « effet pompe à protons »	51
3.2.4. Les effets secondaires potentiellement néfastes de l'utilisation des siARN	52
3.2.4.1. L'induction possible de réponses immunitaires.....	52
3.2.4.2. Les effets aspécifiques	53
3.2.4.3. La saturation des voies endogènes	54
3.3. Conclusion sur l'induction de l'ARNi de façon exogène	54
4. Conclusion	55

Ce chapitre introductif s'attache à expliquer le fonctionnement et le potentiel d'un mécanisme de régulation qui est rapidement devenu l'un des centres d'attention majeur de la communauté scientifique : l'ARN interférence (ARNi). Notre étude porte d'ailleurs sur la délivrance de petites séquences d'acides nucléiques directement impliquées dans ce mécanisme, les siARN (*small interfering ARN*). Ainsi, les perspectives autorisées par l'utilisation de telles molécules seront présentées, notamment pour la recherche de nouveaux biomarqueurs et/ou de nouvelles cibles thérapeutiques. Les limites inhérentes à la transfection, consistant au transport d'acide nucléique dans la cellule, seront mises en avant afin de prouver l'intérêt de développer un vecteur dont les caractéristiques seraient en adéquation avec les applications ciblées *in vitro* et/ou *in vivo*.

1. Le mécanisme d'ARNi

1.1. Généralités

À chaque étape de sa vie, une cellule doit réguler de façon précise l'expression de son information génétique. Pour comprendre les mécanismes qui régissent le comportement cellulaire, en particulier l'ARN interférence, il est nécessaire de faire un rappel général sur le fonctionnement de la cellule [1], ainsi que sur la structure de la cible de ce mécanisme singulier : l'ARN messenger (ARNm).

1.1.1. De l'ADN à l'expression de la protéine

Pour passer du gène contenu dans l'ADN à la protéine, plusieurs étapes sont nécessaires (Figure I-1). La première étape, la transcription, voit la formation d'ARN messenger, intermédiaire entre l'ADN du génome et la protéine correspondant au gène transcrit.

Au cours de cette étape se déroulant au sein du noyau de la cellule, un complexe multienzymatique, appelé ARN polymérase, déroule les deux brins d'ADN en aval d'une séquence promotrice en s'appuyant sur l'activité hélicase de l'une de ses sous-unités. S'en suit l'étape de transcription, c'est-à-dire de synthèse d'un ARN complémentaire au brin non-codant (ou anti-sens) : l'addition séquentielle de ribonucléotides s'effectue jusqu'à la reconnaissance de signaux spécifiques, dont le signal de polyadénylation. Un ARN pré-messenger monobrin est ainsi libéré sous l'action de divers facteurs. Cet ARN pré-messenger subit alors des étapes de maturation pour devenir un ARNm pouvant transiter vers le compartiment cytoplasmique où il devient le support de la traduction.

Au niveau du cytoplasme, l'ARNm est pris en charge par un complexe ribonucléoprotéique, le ribosome, dont l'action permet l'assemblage de séquences d'acides aminés suivant un ordre précis dicté par le code génétique : chaque codon, définition d'un groupe de trois nucléotides de l'ARNm, correspond à un acide aminé précis. Ainsi, suite au début de la traduction autorisé par un codon initiateur (AUG pour

adénine-uracile-guanine), le ribosome parcourt le brin d'ARNm codon par codon ajoutant, après la lecture de chacun d'eux, un acide aminé spécifique à la protéine par l'intermédiaire d'un ARN de transfert (ARNt). Trois codons possèdent un code signalant l'arrêt de la traduction, les codons stop (UAA, UGA et UAG) : une fois reconnue par le ribosome, cette macromolécule se détache du brin d'ARNm et de la protéine qui est libérée dans l'organisme.

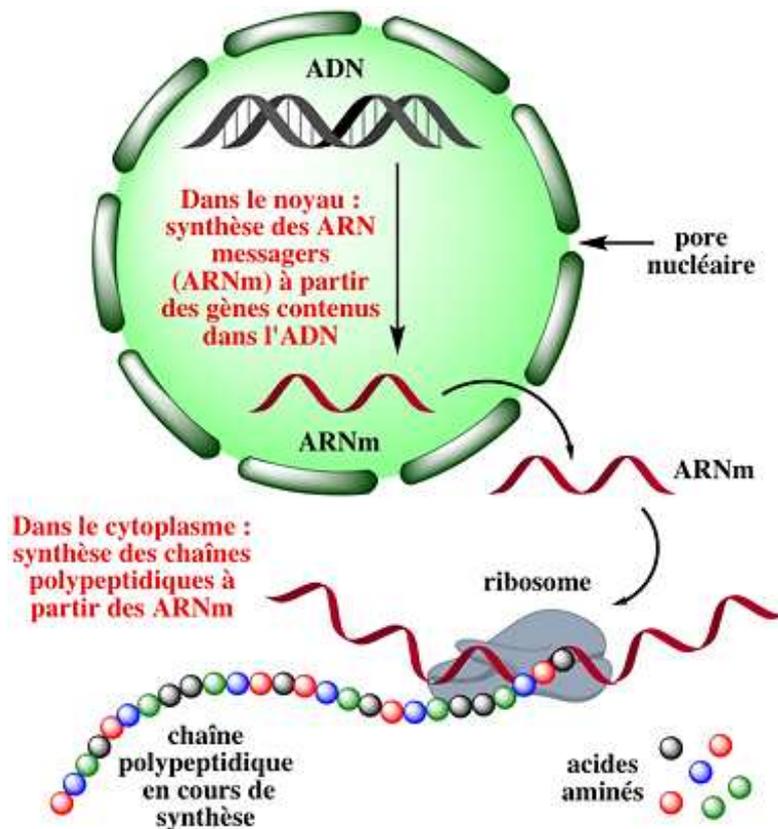


Figure I-1. De l'ADN à la protéine : illustration des différentes étapes à partir de l'ADN contenu dans le noyau de la cellule jusqu'à la formation des protéines dans le cytoplasme.

Au cours de ces différentes étapes, plusieurs mécanismes permettent d'agir sur la synthèse d'une protéine afin d'augmenter ou d'inhiber son expression. Ainsi, des régulations peuvent s'exercer sur différents niveaux :

- transcriptionnel : des séquences régulatrices de l'activité des promoteurs et des facteurs de transcription favorisant le recrutement des ARN polymérase ;
- post-transcriptionnel : ces régulations agissent au niveau de l'ARNm au travers de ses étapes de maturations et/ou en s'appuyant sur un mécanisme dégradant ces séquences tel que l'ARNi ;
- co-translationnel : à ce niveau, la régulation a pour but de bloquer les mécanismes de traduction, notamment en empêchant la fixation des ribosomes ;

- post-traductionnel : ces régulations visent essentiellement à contrôler la quantité de protéine active par régulation de leur fonction ou de leur stabilité (clivage protéolytique, glycosylation, protéolyse sélective, ...) [2].

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes concentrés sur une régulation post-transcriptionnelle et co-traductionnelle, l'ARN interférence, dont l'action cible spécifiquement les ARNm et leur intégrité.

1.1.2. L'ARNm, cible de l'ARN interférence

Afin d'appréhender les mécanismes pouvant altérer l'intégrité des ARNm, la compréhension de leur structure est nécessaire (Figure I-2). Outre la séquence codante délimitée par les codons d'initiation et de fin de traduction (en vert), l'ARN messager présente une organisation particulière [1].



Figure 2. L'ARN messager : Structure des différentes parties composant un ARN messager après les différentes étapes de maturation (d'après Chanoine et Charbonnier, 2010 [1]).

La séquence codante est encadrée par deux régions qui ne seront pas traduites (*UnTranslated Region* ou UTR), appelées 3'UTR (rose) et 5'UTR (jaune). Ces deux régions retrouvées chez les eucaryotes, les procaryotes et les virus ont une grande importance dans la régulation de l'expression d'un gène. En effet, l'interaction de ces régions de l'ARNm avec des protéines régulatrices et certains ARN interférents contribue aux régulations post-transcriptionnelles. Ces interactions entre l'ARNm et les facteurs de régulation permettent le contrôle du transport, de la localisation, de la stabilité et de la traduction de l'ARNm. Ainsi, des modifications apportées sur ces régions UTR peuvent engendrer un effet majeur sur la stabilité des ARNm et, *a fortiori*, sur leur activité traductionnelle.

Chez les eucaryotes, l'extrémité 5' de l'ARNm subit une série de modification entraînant la formation de la coiffe (rouge) dont le rôle est de stabiliser l'ARNm en le protégeant contre l'action de ribonucléases. La coiffe intervient également dans l'export de l'ARNm dans le cytoplasme et dans le recrutement des ribosomes pour la traduction.

Enfin, l'extrémité 3' des ARNm consiste en une répétition adénines (noir) (jusqu'à 250 chez les eucaryotes supérieurs) formant la queue poly(A). Cette extrémité intervient essentiellement dans le

recrutement et la fixation de protéines spécifiques pour l'export nucléaire, la protection contre les ribonucléases et la traduction.

Pour rejoindre le compartiment cytoplasmique et être traduit en protéine, l'ARNm requiert le maintien de son intégrité. Cependant, à travers la description des différentes régions comprises dans la séquence d'ARNm, la stabilité de cette molécule semble dépendante de nombreux facteurs. Une altération de l'une de ces régions peut donc induire une certaine instabilité limitant la fixation des ribosomes, et ainsi la traduction en protéine. L'importance de ces régions entourant la séquence codante permet de comprendre les possibilités d'interaction avec les régulateurs post-transcriptionnels, notamment dans le mécanisme d'ARN interférence utilisé dans cette étude.

1.2. Historique : découverte et compréhension du mécanisme d'ARNi

1.2.1. Les premières observations prometteuses

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme endogène ayant révolutionné les études sur la compréhension du génome au cours des deux dernières décennies (Figure I-3). Napoli et Jorgensen ont été les premiers à rapporter ce phénomène en 1990 [3] alors qu'ils souhaitaient déterminer l'importance de la chalcone synthase (CHS) dans la biosynthèse des anthocyanines, des pigments végétaux chez la fleur de pétunia (*Petunia hybrida*). Afin d'apporter une coloration violette, Napoli et Jorgensen ont introduit une copie modifiée de cette enzyme par transgénèse pour la sur-exprimer. De manière surprenante, au lieu d'apporter une coloration plus intense comme escompté, certaines fleurs présentaient des pétales blancs. Les analyses résultantes de ces expériences montraient que ce phénomène était lié à une importante diminution des ARN messagers de la CHS. L'hypothèse émise, suite à ces observations, propose une co-suppression simultanée des gènes endogènes et exogènes de la CHS induite par l'introduction du transgène.

Un parallèle fut réalisé avec une étude décrite par Van der Krol [4] : la transgénèse d'un brin d'ARN simple brin antisens exogène permettait une hybridation par complémentarité avec le brin sens endogène. Cet appariement inhibait la traduction de l'ARNm ciblé et offrait dès lors un outil intéressant pour les études de génétique inverse, en cherchant à comprendre la fonction des gènes par l'observation de l'évolution du phénotype. En complément de ces premières études réalisées sur les végétaux, des observations similaires ont été rapportées sur les champignons (*Neurospora crassa*) dès 1992 [5] et sur l'animal (*Caenorhabditis elegans*) dès 1995 [6].

1.2.2. La compréhension de l'ARNi : vers le prix Nobel

En 1998, Fire et Mello ont publié un article qui est devenu une référence dans la compréhension du mécanisme d'ARN interférence [7] les récompensant seulement huit ans après par le prix Nobel de physiologie et de médecine (Figure I-3). En travaillant sur les nématodes *C.elegans*, ils ont testé l'hypothèse

selon laquelle l'élément déclencheur de l'inactivation du gène n'était pas un ARN simple brin mais un ARN double brin. En effet, une étude de l'inhibition du gène *unc-22*, codant pour une protéine contenue dans les myofilament, a montré une différence majeure dans l'utilisation d'ARN simple ou double brin : les tests d'inhibition du gène *unc-22* avec 742 ARN simples brins différents ne montrent qu'une faible inhibition en exigeant l'utilisation de fortes concentrations. À l'inverse, les ARN doubles brins ont provoqué une inhibition au moins deux fois plus efficace du gène ciblé en utilisant de faibles concentrations [7].

Des travaux complémentaires ont permis d'affirmer le caractère post-transcriptionnel de l'inhibition induite par l'ARN interférence [8]. En effet, l'analyse de la séquence génomique après injection d'ARN doubles brins n'a montré aucune modification directe du génome. Il a également été rapporté, lors d'inhibition de gènes ubiquitaires, que seuls les ARNm cytoplasmiques étaient affectés par le mécanisme d'ARNi, excluant ainsi une action au niveau du compartiment nucléaire. Au final, l'ARNi peut être défini comme un processus induisant une dégradation des ARNm mature [9, 10] dans le compartiment cytoplasmique, sans affecter la séquence primaire du gène.

Ces travaux décrits par l'équipe de Fire ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'ARNi et d'ouvrir la voie vers l'exploration d'autres espèces telles que la drosophile, le poisson-zèbre, la grenouille, la souris ou encore les cellules humaines. Ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle se présente donc comme ubiquitaire intervenant chez plusieurs groupes du vivant, des plantes jusqu'à l'animal.

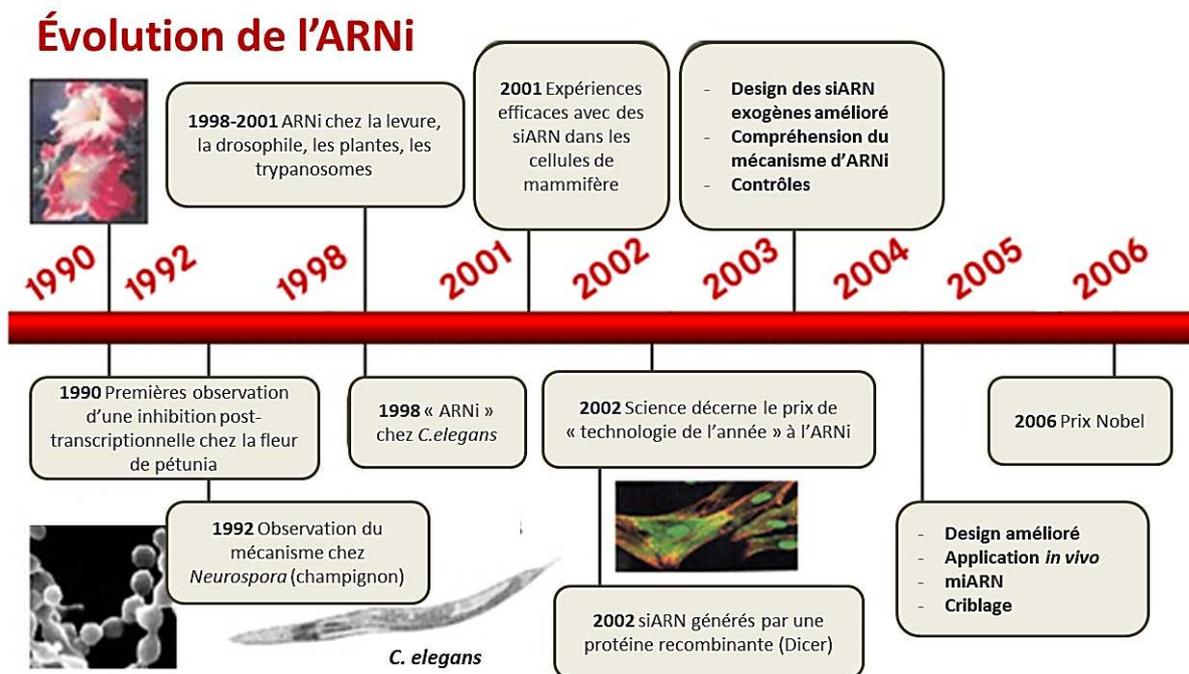


Figure I-3. Évolution de l'ARNi de son observation à l'obtention du prix Nobel : le mécanisme d'ARN interférence a rapidement pris une ampleur importante se développant lors d'études chez toutes les espèces vivantes en seulement quelques années (image issue de lifetechnologies.com).

1.3. Le fonctionnement du mécanisme d'ARNi

Le mécanisme d'ARN interférence est un mécanisme endogène autorisant la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Cependant, l'internalisation de différents types de molécules exogènes peut permettre l'utilisation de ce mécanisme afin de provoquer une régulation désirée. Ces inducteurs exogènes du mécanisme d'ARNi sont répartis en plusieurs familles selon leur structure, le type cellulaire ciblé ou encore l'action engendrée au niveau de l'ARNi.

1.3.1. Le mécanisme endogène

À ce jour, les ARN interférents endogènes les plus étudiés sont les microARN (miARN), possédant généralement une taille de 19 à 24 nucléotides de longueur. Cependant, de nombreuses autres classes d'ARN interférents endogènes ont été identifiées expérimentalement, possédant chacune des longueurs et des caractéristiques rapportées dans la littérature. Notamment, nous pouvons citer des siARN endogènes, les *PIWI-interacting* ARN (piARN) démontrant un rôle dans les cellules germinales, les *small nucleolar* ARN (snoARN) agissant sur les ARN ribosomiaux, et bien d'autres types de molécule [16]. Dans un souci de clarté, nous allons décrire plus spécifiquement le mécanisme faisant intervenir les miARN.

Ces molécules sont issues d'une transcription classique (Figure I-4) par l'ARN polymérase II principalement, formant des miARN primaires (pri-miARN) de plusieurs milliers de nucléotides [11]. De par leur longueur importante et la présence de séquences palindromiques, c'est-à-dire de séquences d'acides nucléiques pouvant se lire de la même façon dans les deux sens sur le brin (exemple : GAATTC – CTTAAG), les miARN ont la particularité d'engendrer des appariements de type Watson-Crick séparés de mésappariements ponctuels formant une boucle [12]. Ainsi, de courtes structures d'ARN doubles brins sont créées. La plupart des pri-miARN comportent plusieurs couples de séquences palindromiques et se présentent sous la forme d'un enchaînement de plusieurs structures ARN doubles brins d'environ 22 paires de base séparées par des boucles d'une dizaine de base [11].

La première étape de maturation de ces miARN primaires consiste à séparer ces structures « tige/boucle » par une endonucléase nucléaire nommée Drosha (Figure I-4). Cette étape permet d'obtenir un miARN précurseur (pré-miARN) sous forme d'épingle à cheveu imparfaitement appariée [11, 13]. Pour sortir du compartiment nucléaire et rejoindre le cytoplasme, compartiment où siège le mécanisme d'ARNi, le pré-miARN interagit avec un transporteur, le dimère Exportine5/Ran-GTP [11] (Figure I-4).

Une fois dans le compartiment cytoplasmique, la protéine Dicer intervient : cette endonucléase de type RNase III, découverte par l'équipe de Bernstein en 2001 [14], permet le clivage à la base de la boucle du pré-miARN formant des duplex d'ARN d'environ 22 paires de base, les miARN. La protéine Dicer, supportant le miARN, s'associe alors à d'autres protéines cytoplasmiques (TRBP, PACT et Argonaute 2 [15]) afin de former le précurseur du complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*).

Ensuite, le duplex miARN est dissocié en un brin guide (ou brin antisens), prise en charge par la protéine Argonaute 2, et un brin passager (ou brin sens) soumis à la dégradation par des nucléases cytoplasmiques : cette étape permet d'activer le complexe enzymatique RISC. La sélection du brin guide repose sur la stabilité thermodynamique relative des deux brins à l'extrémité 5' : le brin le plus instable à l'extrémité 5' devient le brin guide. Cette sélection n'est pas toujours discriminante et les deux brins du duplex se retrouvent parfois en quantité équivalente [12].

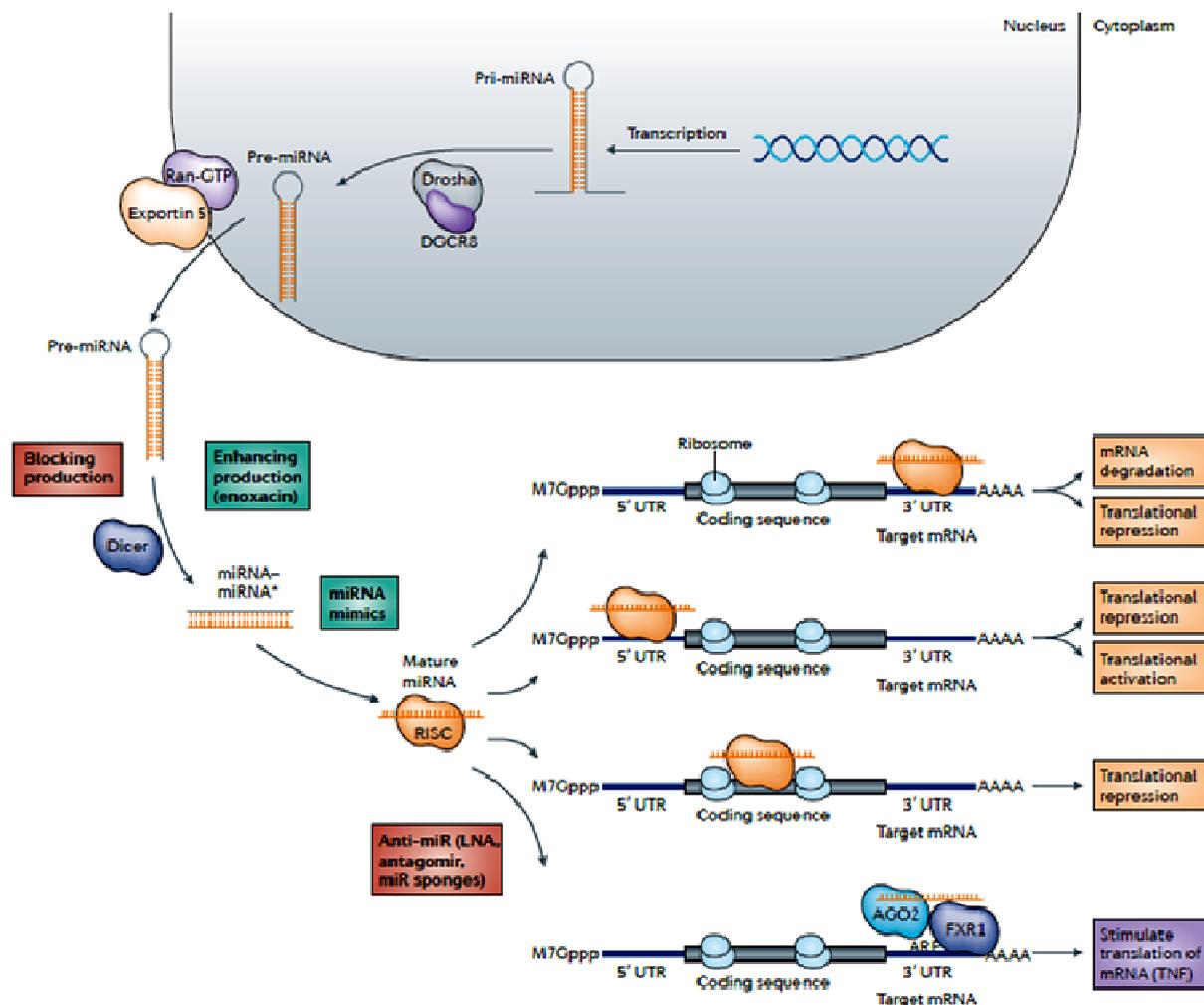


Figure I-4. Les miARN endogènes dans l'ARNi : illustration du développement endogène des miARN et des différentes étapes leur permettant de déclencher le mécanisme d'ARNi (d'après Ling et al., 2013 [16]).

Comme son nom l'indique, le brin guide va permettre de cibler, et d'apporter le complexe enzymatique, vers des séquences spécifiques de l'ARN messager. Chez les espèces animales, les cibles des miARN sont essentiellement localisées dans les régions 3'UTR des ARNm. Un appariement imparfait de type Watson-Crick du miARN avec la séquence correspondante de l'ARNm est réalisé avec, notamment, un rôle primordial de la région d'hybridation parfaite du miARN, dite région *seed* (du nucléotide 2 au nucléotide 8 du

brin antisens). En effet, pour déclencher le mécanisme d'ARNi sur un ARNm ciblé, une complémentarité exacte de cette séquence est nécessaire [17, 18].

L'appariement du miARN avec l'ARNm ciblé, au niveau de la protéine Argonaute 2, provoque un blocage de la traduction ou induit la dégradation de l'ARNm selon le degré de complémentarité entre les séquences. Une dégradation dès cette étape est entraînée par l'activité endonucléase d'Argonaute 2 si la complémentarité est quasi-totale. À l'inverse, si la complémentarité est insuffisante, l'ARN interférence s'effectue par l'inhibition de l'initiation de l'étape de traduction [19]. Il en résulte une dégradation non spécifique de l'ARNm ciblé par des exonucléases.

Ce mécanisme d'action, décrit traditionnellement pour la région 3'UTR de l'ARNm par l'état de l'art, ne semble néanmoins pas exclusif [16]. En effet, des études récentes ont suggéré que les miARN peuvent aussi interagir par complémentarité avec l'extrémité 5'UTR des gènes codants, et ainsi provoquer une répression, voire même une activation traductionnelle (Figure I-4). En effet, il a été démontré que miR-10a coopère avec l'extrémité 5'UTR des ARNm codant pour des protéines ribosomiques permettant d'améliorer la biogénèse des ribosomes, favorisant ainsi la synthèse globale de la protéine [16]. De même, les miARN peuvent cibler la séquence codante, réprimant alors la traduction des gènes ciblés (Figure I-4). Par ailleurs, ces ARN interférents peuvent également interagir avec des protéines de régulation telles qu'Argonaute 2 et FXR1 (*Fragile X Mental Retardation-related protein 1*), stimulant indirectement la traduction d'un gène cible. Il est néanmoins nécessaire de déterminer si ces mécanismes « non-canoniques » représentent des mécanismes généraux ou des exceptions.

Le fonctionnement de l'ARNi à travers l'utilisation de miARN, et leur appariement imparfait sur les séquences d'ARNm cible, permet à la cellule de réguler plusieurs centaines de gènes cibles avec un seul miARN [19]. Les gènes de développement sont d'ailleurs particulièrement sensibles à la régulation par les miARN. Ainsi, ces derniers sont impliqués dans d'importantes fonctions biologiques et interviendraient dans la régulation de l'expression d'au moins 30% des gènes chez les mammifères [12].

De par leur rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle, une dérégulation des miARN a été mise en évidence dans certaines pathologies. Ces ARN interférents constituent alors une cible potentielle dans le traitement de ces maladies. Par exemple, il est possible d'agir sur l'expression des miARN endogènes en utilisant notamment des inhibiteurs de ces séquences tels que les LNA (*Locked Nucleic Acid*), des analogues d'acide nucléique contenant un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2' et l'atome de carbone en position 4' du ribose. Des séquences d'oligonucléotides comportant ces analogues d'acide nucléique permettent une inhibition spécifique essentiellement par un blocage stérique [20]. C'est, par exemple, la stratégie adoptée par la compagnie Santaris Pharma A/S qui développe des médicaments

(notamment le Miravirsen), basés sur les LNA, ciblant les miARN miR-122 dans le cadre du traitement de l'hépatite C [21].

De plus, certains miARN sont soupçonnés d'agir comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs [19] les mettant au centre des attentions pour de futures recherches potentielles dans ce domaine.

1.3.2. Le détournement du mécanisme endogène : internalisation de molécules synthétiques exogènes

Une régulation de l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle peut être provoquée par l'internalisation de différents types de molécules synthétiques exogènes. Ces molécules sont des séquences d'acides nucléiques, de type ARN interférent, pouvant utiliser les enzymes impliquées dans l'ARNi afin d'inhiber des ARNm ciblés. Parmi les molécules décrites jusqu'ici, deux familles ont particulièrement retenu notre attention : les mimics de miARN et les siARN synthétiques exogènes.

Les premières possèdent un fonctionnement similaire aux miARN endogènes, à la seule différence qu'ils sont directement délivrés au niveau du compartiment cytoplasmique pour être pris en charge par le complexe RISC. Tout comme les miARN, la complémentarité avec les différents ARNm ciblés est incomplète hormis pour la séquence *seed* qui doit autoriser un appariement parfait pour cibler l'ARNm reconnu. Zhang *et al.* ont notamment utilisé ce type de molécule dans l'étude de l'établissement de métastases dans les cellules tumorales pulmonaires [22]. Cette équipe a rapporté que les mimics de miARN miR-126 et miR-126* permettent d'inhiber notamment l'expression des facteurs 1α dérivé des cellules stromales (SDF- 1α), entraînant une suppression du recrutement des cellules souches mésenchymateuses et des monocytes inflammatoires dans le stroma de la tumeur. Cette inhibition, provoquée par l'internalisation des mimics de miARN chez des souris porteuses de xéno greffes de tumeurs du sein, permet ainsi de diminuer les métastases pulmonaires [22].

En revanche, l'utilisation de siARN (ou *small interfering RNA*), endogènes ou synthétiques, entraîne quelques différences par rapport aux mécanismes médiés par les miARN (Figure I-5). Les siARN synthétiques se présentent généralement sous la forme de doubles brins d'ARN de 19 à 23 paires de base avec deux nucléotides non-appariés aux extrémités 3'. Une fois délivrée dans le compartiment cytoplasmique, ces séquences doubles brins sont directement prises en charge par l'endonucléase Dicer. De la même manière que précédemment, Dicer s'associe de façon privilégiée avec la protéine TRBP, puis Argonaute 2 afin de former le complexe RISC [23, 24]. Cependant, il a été démontré qu'avec l'utilisation de siARN, l'intervention de la protéine Dicer n'est pas prépondérante et que le mécanisme d'ARNi peut se dérouler indépendamment d'elle [25, 26]. Concernant la prise en charge du double brin de siARN, l'extrémité 5' du brin présentant la plus importante stabilité hydrodynamique se fixe préférentiellement à la protéine TRBP

alors que le second brin [27], défini comme le brin antisens, est pris en charge par la protéine Argonaute 2 [28]. La phase effectrice débute alors avec la dissociation des deux brins par une hélicase du complexe RISC (Figure I-5). RISC permet l'appariement de l'ARNm avec le brin antisens, ceci avec une homologie de séquence parfaite. L'activité endonucléase d'Argonaute 2 [7, 11, 23] permet de cliver le brin d'ARNm ciblé entre le 10^{ème} et le 11^{ème} nucléotide appariés au siARN en partant de l'extrémité 5' [29] (Figure I-5). Les fragments d'ARNm issus de cette coupure se dissocient de RISC et sont dégradés par des exonucléases non-spécifiques [30]. Le complexe enzymatique RISC peut alors être guidé par le brin antisens sur un autre ARNm afin de poursuivre son action inhibitrice. Les travaux de Peng *et al.*s'appuient sur ce type de séquence dans l'étude des lésions rénales aiguës accompagnant certaines maladies rénales chroniques [31]. La régulation engendrée par des siARN ciblant la protéine p53 réduit ce type de lésion ischémique chez des souris diabétiques prouvant son rôle prépondérant pour cette réponse [31].

siARN
Exogène et synthétique

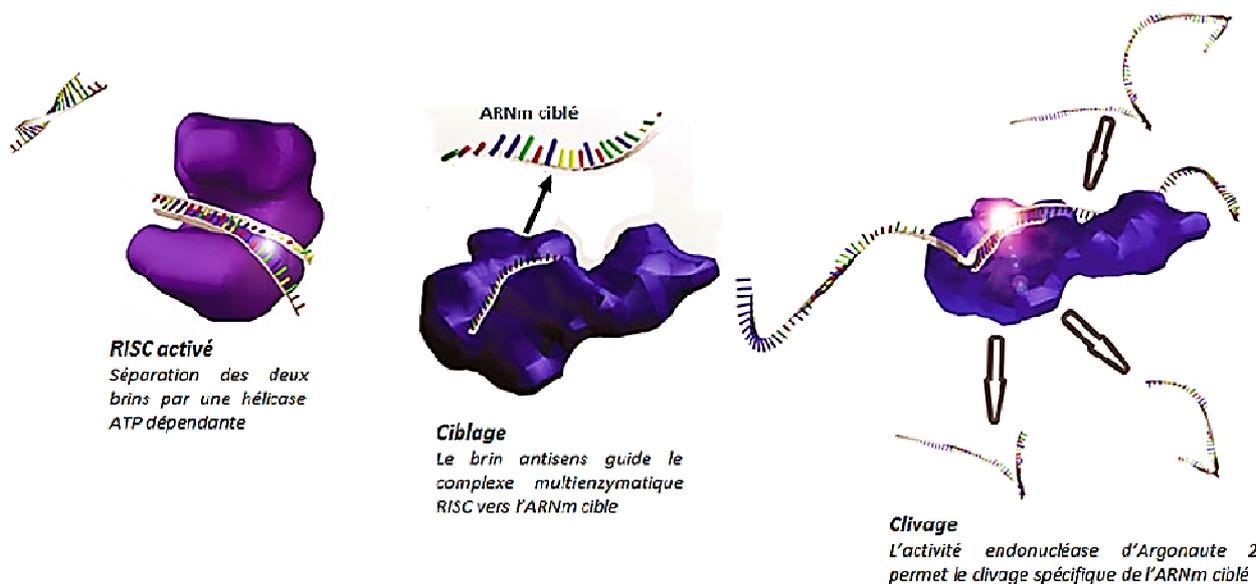


Figure I-5. Les siARN synthétiques dans l'ARNi : mise en évidence du rôle primordial du complexe multienzymatique RISC dans le recrutement des siARN, le ciblage d'un ARNm spécifique et son inhibition par une activité endonucléase.

Ainsi, la transfection de séquences d'acides nucléiques exogènes au niveau du compartiment cytoplasmique entraîne une régulation transitoire de l'expression des gènes : mimics de miARN et/ou siARN interfèrent au niveau des mécanismes post-transcriptionnelle, empêchant la traduction du gène ciblé. Cependant, les étapes précédentes se déroulent normalement continuant de produire des ARNm. Une fois le temps de demi-vie des séquences introduites passé, la régulation provoquée n'est plus permise entraînant un retour de l'expression du gène ciblé.

1.4. Conclusion

La découverte de l'ARNi a permis de mieux appréhender la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. L'utilisation de ce mécanisme endogène par des ARN interférents exogènes permet alors de provoquer l'inhibition de l'expression d'un gène ciblé de façon très spécifique. Ainsi, ces molécules s'avèrent pertinentes dans les études de génétique inverse ; ce type d'expérience correspond à la modification de gènes (par une surexpression ou une inhibition) afin d'étudier les effets sur les phénotypes. En effet, l'ARNi offre une alternative à l'utilisation de phénotype modifié génétiquement pour inactiver un ou plusieurs gènes (*Knock-out* ou KO). Le caractère permanent de telles modifications entraîne une possibilité d'adaptation que le caractère transitoire de l'ARNi permet d'éviter. Cet outil a considérablement accéléré la compréhension de l'action des différents gènes, en particulier ceux impliqués dans diverses pathologies.

2. L'ARNi : un mécanisme aux multiples intérêts

Le projet génome humain, qui a établi le séquençage complet de l'ADN chez l'Homme dès 2003, a permis de déterminer que 20.000 à 25.000 gènes semblaient coder pour plus de 200.000 protéines [25]. Mais la compréhension de leur rôle, de leur implication au niveau de la régulation ou dans certaines pathologies restent encore à élucider. À ce niveau, l'ARNi s'impose comme un outil très prometteur, notamment à travers l'utilisation de différents siARN, pour l'étude de centaines de gènes en parallèle. Ainsi, comme il le sera décrit dans cette partie, l'utilisation de l'inhibition post-transcriptionnelle a plusieurs intérêts interconnectés : comprendre la fonction des gènes, trouver de nouveaux biomarqueurs, isoler de nouvelles cibles thérapeutiques et enfin, développer de nouvelles thérapies basées sur ce mécanisme.

2.1. Un outil pour la compréhension de la fonction des gènes

Les informations connues sur le séquençage, corrélées à la présence de la machinerie ARNi dans toutes les cellules de l'organisme, ont ouvert la possibilité d'inhiber spécifiquement n'importe quel gène du génome humain [26, 27]. Chez les cellules à division rapide, un effet maximal de l'inhibition par ARNi est atteint deux à trois jours après transfection et peut durer jusqu'à une semaine. Cette inhibition persiste jusqu'à plusieurs semaines chez les cellules possédant un faible taux de divisions ou une absence de division tels que les macrophages ou les neurones [28, 29].

2.1.1. Un intérêt pour le diagnostic précoce : la recherche de biomarqueurs

2.1.1.1. Définition

Un marqueur biologique, ou biomarqueur, est une caractéristique qui est mesurée et évaluée de manière objective comme un indicateur de processus biologiques normaux, de processus physiologiques (ou physiopathologiques) et de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique [30]. Les biomarqueurs sont essentiels pour le diagnostic ou le suivi d'une pathologie. Leurs applications comprennent :

- Un rôle diagnostique pour l'identification des patients présentant une maladie ou des conditions pathologiques ;
- La détermination de l'ampleur d'une maladie afin de la classer en fonction de son avancée permettant ainsi de déterminer un pronostic ;
- Le suivi et la prédiction d'une réponse clinique suite à une intervention.

La recherche de biomarqueurs se fait généralement en plusieurs étapes (Figure I-6) allant de sa découverte sur quelques échantillons à sa validation sur une population plus importante.

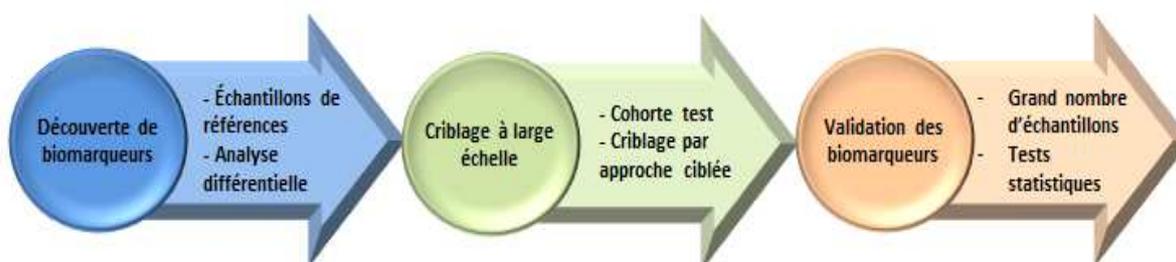


Figure I-6. Principe de la découverte de biomarqueurs : après la découverte d'un biomarqueur renforcée par une analyse différentielle, la validation à plus grand échelle est nécessaire avant une étude clinique sur une population élargie.

En oncologie notamment, des biomarqueurs pronostiques peuvent être représentés par la progression de l'expression de marqueurs biologiques. C'est le cas pour le suivi de l'expression des antigènes prostatiques spécifiques (PSA) pour l'évaluation du cancer de la prostate, ou encore des antigènes carcino-embryonnaires (CEA) pour le cancer colorectal.

Les biomarqueurs peuvent également être des facteurs de risque. Ainsi, la leucémie myéloïde chronique et le cancer du sein peuvent respectivement être suspectés par la translocation du gène BCR-ABL et la surexpression du proto-oncogène HER2/neu [31].

2.1.1.2. La recherche de marqueurs biologiques dans les faits

De nombreux marqueurs candidats se démarquent actuellement des études « omics » (plus particulièrement des études génomiques, transcriptomiques et protéomiques) en comparant des phénotypes sains par rapport à des phénotypes d'état pathologique. Si un gène semble important pour le phénotype étudié, il paraît intéressant de suivre son expression pour une pathologie associée. En ce sens, l'inhibition fonctionnelle d'un gène ciblé par l'ARNi permet l'identification des modifications responsables d'un phénotype pathologique [32, 33]. Un exemple intéressant de cette approche provient de l'étude sur la protéine EWS/FLI1, une cible oncogène présente spécifiquement chez la majorité des patients atteints de sarcome d'Ewing [34]. Une signature d'expression génique pour cette protéine a été identifiée pour un phénotype sain à l'aide de l'ARNi. Cette signature a été extraite et utilisée pour cribler des composés capables de modifier le profil de la signature d'une manière similaire. Cet examen a permis d'identifier des modulateurs de cette protéine et la signature identifiée peut être utilisée pour la détermination rapide de son niveau d'activité [35].

2.1.2. Un intérêt pour préparer une approche curative : la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques

2.1.2.1. Définition

L'ensemble des connaissances concernant les fonctions des gènes a pu être utilisé pour identifier les voies de signalisation et les mécanismes d'action impliqués dans des conditions pathologiques. Mieux encore, l'identification des acteurs impliqués dans ces mécanismes a permis de trouver un grand nombre de cibles potentielles pour de futures thérapies, notamment basées sur les siARN [36].

Par exemple, dans les cas de pathologies cancéreuses, deux classes de gènes sont particulièrement suivies : les proto-oncogènes et les suppresseurs de tumeurs [37]. Un cancer est souvent le résultat d'une accumulation de mutations dans ces deux classes. Une expression exacerbée des proto-oncogènes provoquent une transformation des cellules cibles en cellules cancéreuses. Pour les suppresseurs de tumeur, ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la cancérisation, des mutations permettront de favoriser le développement de la maladie.

2.1.2.2. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les faits

Conceptuellement, la perte spécifique de la fonction d'un gène, ou d'une combinaison de gènes, dans les systèmes expérimentaux appropriés devrait permettre de prévoir le résultat de l'utilisation de composés médicamenteux dans les cellules tumorales [38, 39]. Diverses études *in vitro* utilisant ce procédé ont démontré l'intérêt de cette technique pour la validation de cibles potentielles dans le traitement de

maladies [33]. Dans ce cadre, les travaux de Zuber *et al.* ont notamment permis l'identification de la protéine Brd4 comme cible thérapeutique de la leucémie myéloïde aiguë [40].

Les biomarqueurs identifiés peuvent également avoir un potentiel de ciblage thérapeutique. Par exemple, une protéine surexprimée, témoignant d'un phénotype altéré, peut devenir la cible privilégiée d'une action thérapeutique afin de rétablir l'état physiologique recherché.

2.2. Un outil à visée thérapeutique

2.2.1. Définition

Par définition, la thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans les cellules d'un organisme pour y corriger une anomalie (mutation, altération,...) à l'origine d'une pathologie. Parmi les essais cliniques entrepris, la vaste majorité concerne les cancers (Figure I-7) de par l'importance de sa prévalence et de son impact [41]. Compris dans ces chiffres, l'ARNi est rapidement apparu comme une nouvelle approche suscitant un intérêt majeur. Son mécanisme de base relativement simple a conduit à mener des recherches exploitant ce mécanisme dans un but thérapeutique. La simple connaissance d'une cible thérapeutique potentielle et de la séquence de l'ARNm correspondant permet de définir des séquences d'ARN interférent permettant une inhibition spécifique et prononcée de l'expression de la protéine ciblée.

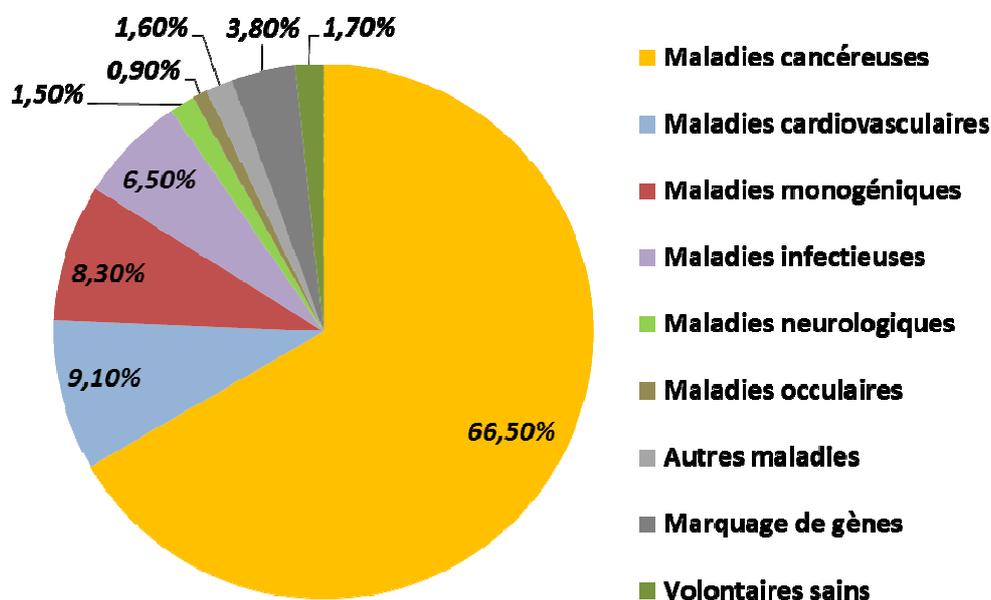


Figure I-7. Les cibles de la thérapie génique pour les essais cliniques : les deux tiers des essais cliniques entrepris jusqu'en 2007 se concentrent sur le cancer (d'après Edelstein *et al.*, 2007 [41]).

2.2.2. Les essais cliniques basés sur l'ARNi

Dès 2004, les premiers essais cliniques utilisant ce mécanisme se sont concentrés sur l'œil [42] qui présente l'avantage d'être facilement accessible et possède des caractéristiques favorisant la délivrance d'acides nucléiques. En effet, étant un compartiment relativement isolé par rapport à la circulation générale, l'œil est un modèle intéressant qui permet l'utilisation de fortes concentrations en acides nucléiques sans risquer d'effets systémiques. Ainsi, les recherches au niveau oculaire sont facilitées et sont l'objet de nombreuses études, en atteste le nombre d'essai clinique s'appuyant sur l'ARNi en 2013 (Tableau I-1) [43].

Avec l'augmentation de la compréhension de l'ARNi, les essais se sont multipliés utilisant les ARN interférents (notamment les siARN) pour le traitement de cancers, de pathologies liées à l'œil, mais également dans l'étude de maladies systémiques, génétiques et dans le traitement des viroses humaines (Tableau I-1).

La recherche de thérapie anticancéreuse devient un élément central de l'ARNi thérapeutique. Le premier essai s'appuyant sur l'ARNi a été réalisé sur des patients humains, âgés de 18 ans ou plus, et développant des tumeurs (≥ 2 cm) au niveau du foie [44]. Lors de cette étude, l'utilisation de siARN a entraîné l'inhibition spécifique des protéines ciblées VEGF et KSP. Cette inhibition a alors induit une activité anti-tumorale incluant une régression complète des métastases [44]. Ces résultats établissent la preuve de concept pour l'ARNi thérapeutique chez l'Homme et soulignent son potentiel pour la poursuite de son développement en cancérologie.

Des essais cliniques s'organisent également sur d'autres problèmes de santé publique : hypercholestérolémie, infections virales, maladies héréditaires, ...

Dans le cas de l'hypercholestérolémie, un facteur de risque prépondérant dans l'apparition de maladies cardiovasculaires, l'une des stratégies envisagées consiste à inhiber l'expression du gène de l'Apo B, contenu dans les lipoprotéines et intervenant dans la formation des plaques d'athérome [45].

L'ARNi thérapeutique peut également voir des applications contre des virus. Après des études préliminaires visant à identifier une cible thérapeutique potentielle pour découvrir un remède à l'hépatite B, un essai clinique a débuté récemment dans le but d'administrer un plasmide dont la transcription permettrait la synthèse d'ARN interférents d'intérêt [46].

	Nom de l'agent	Maladie	Protéine codée par la cible	Phase de l'essai	Identifiant
Cancers	ALN-VSP02	Tumeurs solides	KSP & VEGF	I	NCT01158079
	siRNA-EphA2-DOPC	Cancers avancés	EphA2	I	NCT01591356
	Atu027	Tumeurs solides	PKN3	I	NCT00938574
	TKM-080301	Cancer	PLK1	I	NCT01262235
	CALAA-01	Tumeurs solides	RRM2	I	NCT00689065
	siG12D LODER	Cancer pancréatique	KRAS	II	NCT01676259
Troubles oculaires	AGN211745	Dégénérescence maculaire	VEGFR1	II	NCT00395057
	QPI-1007	Neuropathie optique	CASP2	I	NCT01064505
	PF-655	Œdème maculaire diabétique	RTP801	II	NCT01445899
	Bevasiranib	Dégénérescence maculaire	VEGF	II	NCT00306904
	SYL1001	Douleur oculaire	TRPV1	I	NCT01776658
	SYL040012	Glaucome	ADRB2	II	NCT01739244
Troubles rénaux		Complication des suites de greffes de rein		I, II	NCT00802347
	ISNP	Insuffisance rénale	P53	I	NCT00554359
Infections	ALN-RSV01	Infection virale respiratoire	Nucléocapside RSV	II	NCT00658086
	TKM-100201	Infection virale (Ebola)	VP24, VP35, Zaire Evola L-polymérase	I	NCT01518881
Maladies systémiques	ALN-PCS02	Hypercholestérolémie	PCSK9	I	NCT01437059
	PRO040201	Hypercholestérolémie	ApoB	I	NCT00927459
Maladies congénitales	ALN-TTR02	Amyloïdose	TTR	II	NCT01617967
	ALN-TTRsc	Amyloïdose	TTR	I	NCT01814839
	TD101	Pachyonychie congénitale	K6a	I	NCT00716014
Virus	ARC-520	HBV	Régions conservées de HBV	I	NCT01872065
Autres	CEQ508	Cicatrisation	CTGF	I	NCT01780077

Tableau I-1. Essais cliniques s'appuyant sur l'ARNi thérapeutique : en mars 2013, il a été répertorié 22 essais cliniques basés sur l'ARNi en cours sur différentes maladies (d'après Kanasty et al., 2013 [43]).

Les maladies héréditaires telles que l'amyloïdose sont aussi la cible d'investigations depuis quelques années. Dans ce cas, une mutation du gène de la protéine transthyrétine conduit à une accumulation et à un dépôt de monomères insolubles dans la matrice extracellulaire. Dans l'étude préclinique, l'administration de siARN chez des primates non-humains a entraîné une réduction de manière conséquente de l'expression de cette protéine mutée pendant deux semaines, réduisant les dépôts de transthyrétine. Une administration hebdomadaire a allongé cet effet jusqu'à trois mois faisant de cette stratégie une solution potentiellement efficace pour le traitement de l'amyloïdose [47].

De nombreuses autres études utilisent le mécanisme d'ARNi pour la recherche de traitements de pathologies très variées, en atteste les essais cliniques actuels (tableau I-1). En outre, depuis les données fournies par Kanasty *et al.* datant de mars 2013 [43], Tekmira Pharmaceuticals a annoncé en décembre de la même année un investissement de 5 millions de dollars pour des essais cliniques de phase III (NCT01960348). Ainsi, des études visant à injecter des ARN interférents par voie intraveineuse (ALN-TTR02), en s'appuyant sur des nanoparticules lipidiques, ont été entreprises chez des patients atteints de polyneuropathie amyloïde familiale.

2.3. Conclusion

L'ARN interférence est un outil aux possibilités innombrables. D'abord utilisé pour comprendre la simple fonction des gènes en étudiant l'impact d'une inhibition spécifique au niveau du phénotype, son application s'est rapidement déclinée vers un dessein thérapeutique. Dans ce but, son rôle peut intervenir à différents niveaux :

- Pour l'établissement de diagnostics par la recherche de biomarqueurs témoignant d'un état pathologique. L'application peut même devenir prédictif afin de déclarer une possible atteinte avant l'expression de la maladie ;
- Pour la recherche des nouvelles cibles sur lesquelles s'orienter pour un traitement efficace ;
- Pour une action thérapeutique ciblée et hautement spécifique contre ces mêmes cibles, en utilisant les ARN interférents comme agent thérapeutique.

Ainsi, depuis sa découverte en 1998, l'ARNi est devenu un atout majeur dans la recherche et offre des perspectives pharmaceutiques très prometteuses. Cependant, une transfection de séquences d'acides nucléiques dans le compartiment cytoplasmique peut être limitée en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Pour être efficace, la délivrance des ARN interférents doit permettre de surmonter les différents obstacles pour rejoindre la machinerie ARNi.

3. Induction de l'ARNi : contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques

Pour induire le mécanisme ARNi avec des siARN synthétiques exogènes, de nombreuses contraintes nécessitent d'être surmontées à différents niveaux : en termes de stabilité, pour le ciblage des cellules désirées et dans l'accessibilité du compartiment cytoplasmique. Dans cette partie, il sera mis en évidence ces limites ainsi que les caractéristiques nécessaires afin de les surmonter.

3.1. La stabilité des ARN interférents

Les ARN possèdent une stabilité suffisamment importante aux pH physiologiques et une immunogénicité assez faible pour permettre une utilisation comme principe actif. Cependant, ces molécules restent très sensibles aux nucléases, en particulier les RNAses, et nécessitent une attention particulière lors de leur utilisation. Ceci est d'autant plus vrai dans les milieux extracellulaires, en particulier dans le sang, avec une présence importante de nucléases non spécifiques. Malgré une conformation en duplex plus résistante qu'avec des simples brins [48], la demi-vie d'une molécule de siARN s'en trouve largement affectée et n'atteint que cinq minutes dans le plasma [48].

Néanmoins, certains travaux démontrent une utilisation possible de siARN sous forme simple, notamment pour des tissus superficiels tels que l'œil, la peau et les muqueuses [49]. D'ailleurs, le Vitravene®, un oligonucléotide antisens, a déjà été utilisé lors d'étude clinique pour le traitement du cytomégalovirus [50]. Un autre exemple pertinent voit l'utilisation de siARN en administration locale pour le ciblage des maladies pulmonaires. De cette manière, un contact direct avec les épithéliums pulmonaires est permis en distillant les siARN par voie nasale ou endotrachéale [51]. L'administration locale de siARN a l'avantage d'offrir une biodisponibilité élevée et une réduction des effets secondaires associés à la voie systémique. Cependant, elle n'est envisageable que pour des organes superficiels ou facilement accessibles. L'administration systémique reste la seule voie possible pour atteindre les organes inaccessibles par voie locale. Pour que les siARN puissent atteindre les cellules cibles en quantité suffisante, il est nécessaire de développer une stratégie permettant d'augmenter leur temps de demi-vie et/ou leur protection vis-à-vis des nucléases.

Dans le cadre des tests *in vitro*, les siARN sont moins soumis à ce type de contrainte, la composition du milieu étant plus contrôlée. Cependant, la présence de sérum a un impact au niveau des siARN : en effet, il a été démontré que les acides nucléiques sont sensibles à la présence de sérum de veau fœtal et peuvent être dégradés plus ou moins rapidement selon leur séquence [52]. Dans leur étude, Hong *et al.* ont observé

que sur 125 siARN différents, incubés à une concentration de 2 μM dans un tampon PBS supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, seulement 10% ne sont pas immédiatement dégradés [52], démontrant la forte vulnérabilité de ces courtes séquences d'acides nucléiques.

La plupart des transfections de siARN nécessitent un temps d'incubation pouvant être important dans des milieux biologiques ou des milieux de culture. Dès lors, la fragilité de ces molécules nécessitent un système de protection afin qu'elles puissent résister suffisamment longtemps pour atteindre les cellules cibles, que ce soit pour des conditions *in vitro* ou *in vivo*.

3.2. La biodistribution

3.2.1. Une distribution non-spécifique

En plus de la stabilité, les siARN exogènes doivent surmonter d'autres difficultés pour atteindre leur cible et exercer leur action biologique, ceci principalement *in vivo*. En effet, la distribution des molécules au sein de l'organisme repose essentiellement sur la perméabilité. Cependant, celle-ci est variable et plus ou moins importante selon les tissus : certains ne laissent passer que des petites molécules et de l'eau alors que d'autres sont moins sélectifs.

Certains organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie (foie, rate, reins) apportent une difficulté supplémentaire. De par leur faible taille (environ 13 kDa), les siARN sont rapidement excrétés dans les urines en quelques minutes [53]. En effet, des molécules possédant une taille inférieure à la limite de filtration glomérulaire sont soumises à une excrétion rapide au niveau rénal. De plus, les phagocytes du système réticulo-endothélial, au niveau du foie et de la rate, peuvent conduire à la séquestration des oligonucléotides après les avoir assimilés.

Une autre limite de la biodistribution concerne l'absence de système d'adressage. En effet, une distribution aspécifique des siARN, après administration systémique, peut provoquer une dilution de ceux-ci au niveau de différents tissus. Par conséquent, la concentration locale en siARN devient trop faible pour induire un effet au niveau des tissus et/ou cellules où l'induction du mécanisme d'ARNi est souhaitée.

Dans le cadre d'étude *in vitro*, le problème de biodistribution est moins important en raison d'expériences qui se restreignent généralement à un type cellulaire en boîte de pétri. Cependant, l'utilisation de co-culture peut engendrer ce type de limite. En effet, sans système d'adressage spécifique, les siARN se

distribueront indifféremment chez toutes les cellules, limitant l'effet sur les modèles cellulaires où le mécanisme d'ARNi est désiré.

Ainsi, la distribution des ARN interférents nécessite l'utilisation d'un système d'adressage afin de cibler de manière spécifique les cellules et/ou tissus désirés. Par ce moyen, les concentrations en siARN atteignant les cellules ciblées seraient optimales pour induire l'ARNi. De plus, la limitation de la distribution non-spécifique d'ARN interférent autorise une diminution des risques d'inhibition non-désirée, dans des cellules non-ciblées.

3.2.2. L'internalisation

Une fois la cellule atteinte, l'accessibilité aux compartiments intracellulaires, et plus particulièrement au compartiment cytoplasmique, constitue une autre difficulté. Les siARN ayant un caractère polyanionique avec des groupements phosphates PO^4 (Figure I-8), la membrane plasmique de potentiel électrochimique négatif constitue une barrière [54].

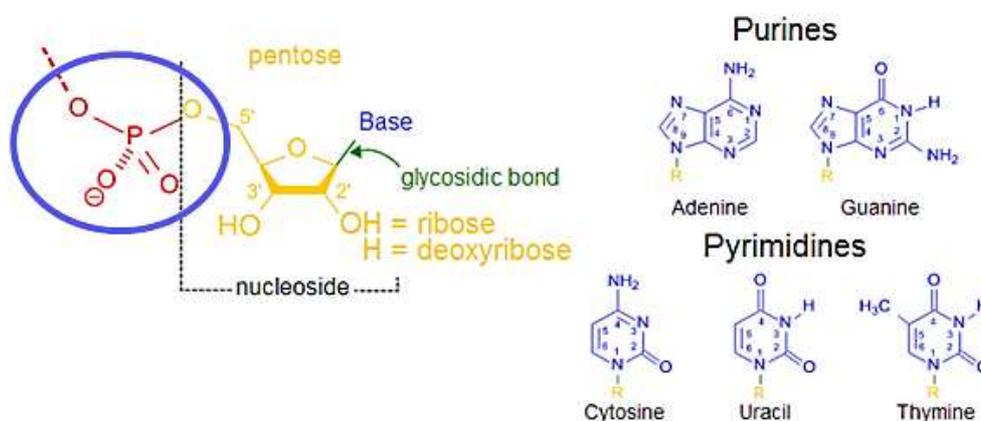


Figure I-8. Les nucléotides composant les siARN : un siARN est composé de 19 à 23 paires de nucléosides monophosphate.

Ainsi, la diffusion des siARN au travers des membranes plasmiques est très limitée. Néanmoins, la littérature rapporte une dichotomie entre les résultats obtenus pour la délivrance d'ARN interférents *in vitro* et *in vivo* [55] : alors que l'utilisation de siARN *in vitro* ne produit que rarement des effets sans l'utilisation d'un outil de transfection, des expériences similaires dans des conditions *in vivo* permettent l'induction d'inhibition par ARNi [55]. Par exemple, des essais cliniques utilisant des ARN interférents « nus » ont été

effectués avec succès chez vingt patients atteints de la maladie de Crohn [56]. Robertson rapporte que la dépendance aux stéroïdes a été réduite de manière significative chez 75% des patients ; une rémission de la maladie a été permise pendant plusieurs mois chez dix de ces patients [56]. L'une des hypothèses les plus probables concerne une interprétation pharmacodynamique : en raison des contraintes expérimentales, les cellules en culture sont brièvement exposées aux oligonucléotides ; en revanche, la plupart des expériences *in vivo* impliquent plusieurs doses et des expositions prolongées, permettant une accumulation intracellulaire progressive des oligonucléotides [55].

Néanmoins, l'utilisation d'un outil de transfection reste nécessaire pour optimiser cette étape d'internalisation, notamment *in vitro*. Les conditions expérimentales *in vivo* semblent moins affectées par cette étape, mais reste soumises aux autres limites exposées dans cette partie, notamment la dégradation rapide des ARN interférents.

3.2.3. L'accessibilité du compartiment cytoplasmique

Pour pallier aux différents obstacles mentionnés précédemment, plusieurs techniques ont été développées (voir chapitre II). La plupart de ces techniques impliquent une internalisation par les mécanismes d'endocytose.

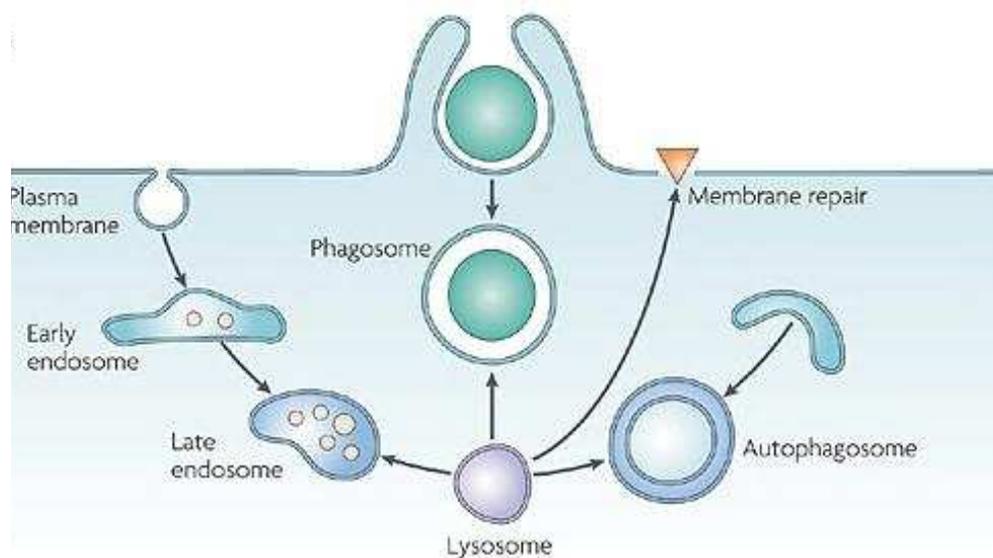


Figure I-9. De l'internalisation par endocytose à la dégradation lysosomale : les endosomes subissent plusieurs étapes de maturation jusqu'aux lysosomes. Ces étapes sont caractérisées par une diminution du pH et à l'activation d'hydrolase dégradant les molécules contenues dans les vésicules (d'après Luzio et al., 2007 [59]).

Pour rappel, le processus d'endocytose, par l'invagination de la membrane plasmique, forme des vésicules endosomales (Figure I-9). Ces vésicules fusionnent entre elles pour former un compartiment de forme irrégulière appelé endosome précoce. L'endosome précoce se différencie par la suite en endosome tardif, entraînant une diminution du pH intra-vésiculaire de 7,4 à 6,5. L'endosome tardif, caractérisé par de nombreuses invaginations et vésicules internes, est en partie responsable de la dégradation des protéines par hydrolyse. Dans l'étape suivante, l'endosome tardif fusionne avec des vésicules d'hydrolyse, provenant de l'appareil de Golgi, ou avec un lysosome primaire pour former un lysosome mature [57, 58]. Les lysosomes sont les organites cellulaires associés à la digestion intracellulaire. Ils sont caractérisés par un pH acide (entre 4,5 et 5,5) et la présence importante d'hydrolase permettant la dégradation de toutes les classes de molécules (Figure I-9) [59].

Dès lors, le développement d'une stratégie permettant de sortir de ces structures rapidement lors de l'internalisation est nécessaire [51]. L'état de l'art décrit deux moyens dépendants des caractéristiques des molécules associées aux séquences d'ARN interférents transportées : l'échappement endosomal par « appariement ionique » et l'échappement par « effet pompe à protons ».

3.2.3.1. Échappement endosomal par « appariement ionique »

Cette stratégie a été proposée pour la première fois lors de l'utilisation de liposomes cationiques formant des lipoplexes avec des plasmides d'ADN [60]. Après endocytose, les lipides cationiques forment des paires d'ions avec les phospholipides anioniques composant la membrane des endosomes qui s'en trouve déstabilisée (Figure I-10). En effet, les interactions électrostatiques induisent la formation de micelles inversées, dites H_{II} , au cœur de la bicouche lipidique de l'endosome, créant une forte instabilité de celle-ci [61]. L'appariement ionique exige un contact direct entre la molécule cationique et la membrane anionique. L'utilisation de cette stratégie nécessite donc une adaptation de la configuration de la molécule de transport, ceci pour éviter un encombrement stérique nuisant à l'établissement de cette interaction électrostatique.

Dans ce cadre, Akita *et al.* ont formulé des vecteurs comprenant des molécules de polyarginine et des lipides facilitant l'échappement endosomal par appariement ionique, le DOPE (ou 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine) [63]. En outre, cette équipe a pris le parti d'ajouter un peptide fusogène dépendant du pH dans la formulation, GALA (une répétition des motifs « acide glutamique – alanine – leucine – alanine »). En effet, GALA est un peptide soluble dans l'eau avec une conformation apériodique à pH neutre, mais devenant une hélice alpha amphiphile interagissant avec les bicouches lipidiques à des pH inférieurs à 5. Ce vecteur optimisé pour favoriser l'échappement endosomal permet d'obtenir jusqu'à 70% d'inhibition de l'expression de luciférase sur un modèle cellulaire Hela [63].

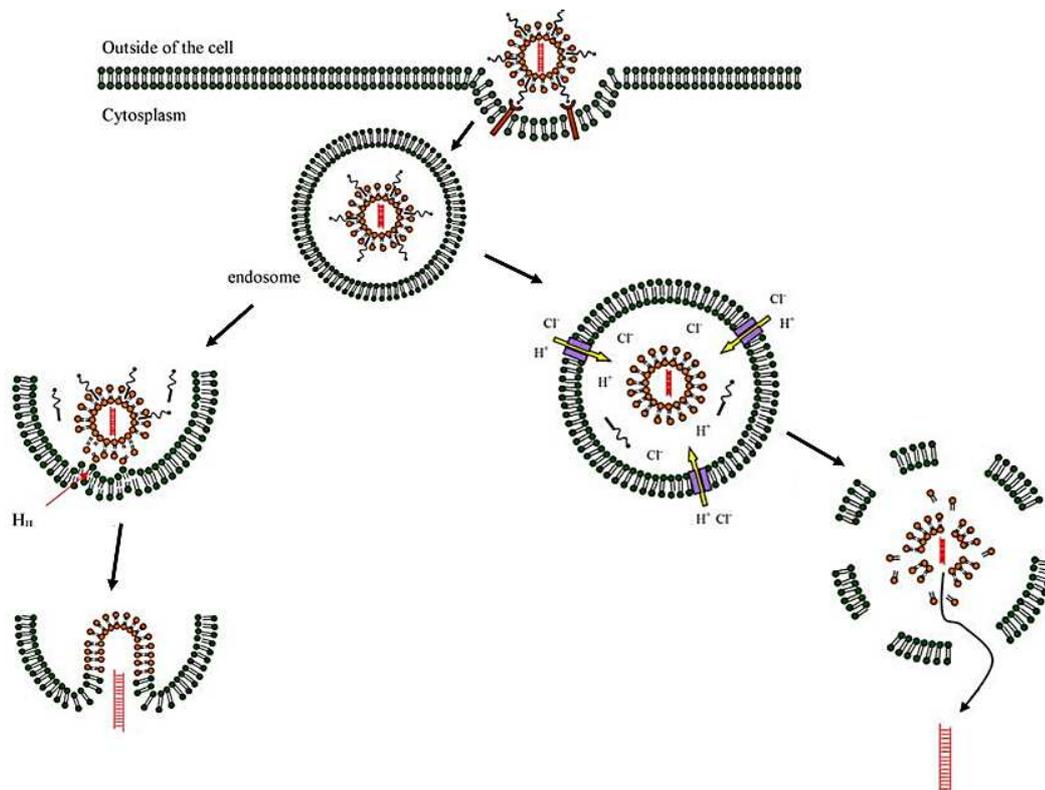


Figure I-10. Les mécanismes d'échappement endosomal : il existe deux mécanismes d'échappement à partir de la vésicule d'endosome par « appariement ionique » (à gauche) ou par « effet pompe à proton » (à droite) (d'après Tseng et al., 2009 [62]).

3.2.3.2. Échappement endosomal par « effet pompe à protons »

Le second mécanisme permettant l'échappement endosomal utilise l'effet « pompe à protons ». Cette stratégie nécessite l'utilisation d'une molécule possédant un pouvoir tampon : la présence de groupements amines (primaires, secondaires et tertiaires), caractérisés par des pKa différents, permet d'augmenter le nombre de charges positives avec la diminution du pH caractéristique de la maturation des endosomes. Ainsi, il s'établit un échange ionique entre la vésicule et le cytoplasme, caractérisé par une entrée de protons et d'ions chlorure Cl^- dans l'endosome (Figure I-10). Par effet osmotique, l'eau pénètre également dans la vésicule qui gonfle jusqu'à éclater [64], permettant ainsi de libérer son contenu dans le compartiment cytoplasmique.

De nombreuses études se sont appuyées sur l'utilisation de vecteurs polymériques comportant de la polyéthylène-imine (PEI) pour favoriser ce type de mécanisme d'échappement endosomal. Ainsi, une étude a décrit une efficacité d'inhibition de l'expression du gène VEGF supérieure à 80% lors de transfection de siARN sur des cellules HepG2 [65], prouvant l'action endosomolytique du vecteur PEI.

3.2.4. Les effets secondaires potentiellement néfastes de l'utilisation des siARN

La délivrance de siARN est un verrou majeur qu'il est nécessaire de surmonter. Cependant, l'utilisation de siARN est associée à d'autres limites dues à la nature même de leurs séquences et/ou au détournement du mécanisme endogène d'ARNi par des molécules exogènes.

3.2.4.1. L'induction possible de réponses immunitaires

Des études ont rapporté que les ARN doubles brins, dont les siARN, pouvaient provoquer une réponse immunitaire innée. En effet, dans le cytoplasme et les endosomes, des kinases ARN-dépendantes, nommées PKR, induisent l'activation de la voie de signalisation des interférons [66]. Cette action provoque la production de cytokines pro-inflammatoires par activation du facteur de transcription NFκB. Cependant, les facteurs d'induction des réponses immunitaires sont directement dépendants de la taille des siARN utilisés : malgré une réaction immunitaire possible avec de courtes séquences d'ARN interférents, la puissance de l'activation de la voie de signalisation des interférons est corrélée avec l'augmentation de la taille des séquences ARN utilisées [67]. En outre, l'absence des nucléotides non-appariés à l'extrémité 3' des siARN est décrite comme un facteur supplémentaire pouvant induire cette réponse immunitaire [68].

En complément de l'induction par les kinases PKR, des réponses immunitaires peuvent également être déclenchées lors de la reconnaissance d'ARN exogènes par des récepteurs de type Toll-like (TLR). Ces récepteurs sont directement impliqués dans la reconnaissance de matériel génétique étranger comme celui des pathogènes. Plus particulièrement, les TLR 3, TLR 7 et 8 sont reconnus pour avoir une affinité importante pour les ARN. Leur activation au niveau de l'endosome conduit à une cascade de réactions intracellulaires à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les TLR présentent une affinité plus importante pour les séquences d'ARN riches en motif « GU » et « AU » [69] et entraînent des réponses plus fortes lors de la reconnaissance d'ARN simples brins. De plus, comme pour les PKR, les ARN possédant des séquences plus longues induisent plus facilement une réponse immunitaire [69].

Ainsi, pour limiter le risque de réponse immunitaire, les séquences de siARN doivent être optimisées en privilégiant les petites tailles et en évitant les motifs « GU » et « AU ». D'autres stratégies sont possibles afin de limiter la production de cytokines par les cellules transfectées. Par ce procédé, Judge *et al.* ont totalement supprimé l'induction de réponses immunitaires en incorporant sélectivement 20% de nucléosides modifiés [70]. Ces modifications sont suffisantes avec l'intégration d'un groupement O-méthyle en 2' du ribose des nucléosides, de type uridine et guanosine, positionnés sur un seul brin du siARN. Ainsi, le brin guide peut rester inchangé, évitant une réaction immunitaire sans affecter l'efficacité de transfection [70]. En outre, une autre stratégie est possible par la diminution des concentrations en siARN utilisées afin de réduire les effets induits par la transfection.

3.2.4.2. Les effets aspécifiques

Les effets non-spécifiques (« *off-target* ») sont des inhibitions d'ARNm différents des ARNm ciblés. Ils présentent les inconvénients :

- d'entraîner des conséquences potentiellement néfastes pour la cellule. L'inhibition non-contrôlée de gènes non-ciblés pourrait provoquer le déclenchement des mécanismes d'apoptose ou l'inhibition de la croissance cellulaire [71] ;
- de produire des faux positifs conduisant à des difficultés d'interprétation. En effet, l'induction d'une inhibition aspécifique peut interférer sur le phénotype autant que l'effet spécifique voulu [72].

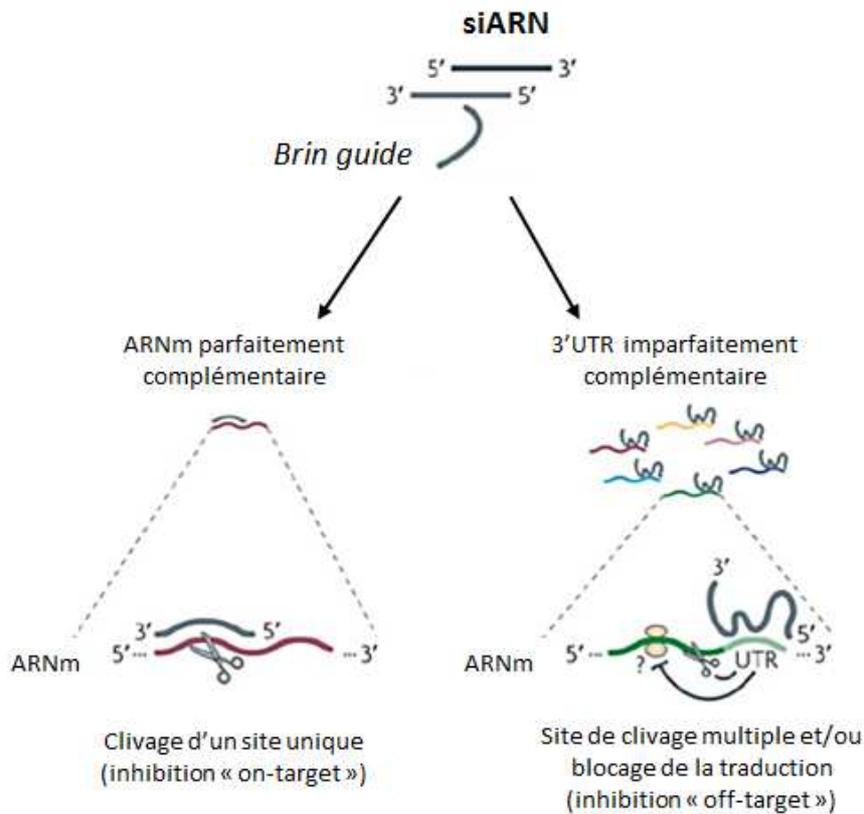


Figure I-11. Effets spécifiques et aspécifiques des siARN : la complémentarité parfaite du brin antisens du siARN avec un ARNm cible produit l'inhibition spécifique désirée (« *on-target* »). Au contraire, l'appariement imparfait du brin antisens du siARN avec des régions 3'UTR de différents ARNm peut entraîner une inhibition par ARNi non ciblée (« *off-target* ») (d'après Jackson and Linsley, 2010 [73]).

Ce type d'effet indésirable a été observé pour la première fois en 2003. À cette occasion, Jackson *et al.* ont déterminé que les effets aspécifiques ne sont pas dus au hasard et que chaque siARN produit un profil d'extinction spécifique [74]. Pour rappel, la complémentarité parfaite des siARN avec des séquences cibles permet une inhibition par le clivage de l'ARNm (effet « *on-target* ») (Figure I-11). En revanche, en plus

de cet effet désiré, certains siARN ont été décrits avec une inhibition d'ARNm non-ciblés par un fonctionnement similaire à celui des miARN. Une complémentarité imparfaite avec la région 3'UTR du transcrit, notamment avec une reconnaissance totale de la région *seed* du siARN, entraîne une inhibition par le blocage de l'étape de traduction [74] (Figure I-11). Dès lors, chaque ARNm portant une séquence complémentaire à la région *seed* d'un siARN, au niveau de l'extrémité 3'UTR notamment, peut devenir une cible collatérale soumise au mécanisme d'ARNi. L'ARNi provoqué par le blocage de la traduction permet une inhibition post-transcriptionnelle d'une intensité plus faible qu'avec le clivage d'un ARNm [75]. Néanmoins, cet effet non-désiré, induit par l'utilisation de siARN, reste suffisamment important pour présenter les inconvénients cités précédemment.

Pour pallier ce problème de spécificité, une attention particulière doit être portée lors de la conception du siARN. La synthèse des siARN doit éviter la complémentarité de la région *seed* avec une séquence présente dans les portions 3'UTR du transcriptome [76]. Une autre solution, afin de limiter les risques d'inhibition non-spécifique, consiste à réduire les concentrations en siARN utilisés, limitant les séquences de brins anti-sens disponibles.

3.2.4.3. La saturation des voies endogènes

Le déclenchement d'un mécanisme endogène par des molécules exogènes peut provoquer une saturation des voies naturelles. En effet, l'utilisation de concentrations trop importantes en siARN peut limiter la disponibilité des complexes multienzymatiques RISC et, en conséquence, restreindre la régulation endogène en monopolisant les enzymes impliquées dans le mécanisme [77].

Comme pour les effets aspécifiques décrits précédemment, la réduction des concentrations en siARN permet de limiter la possible saturation des voies endogènes.

3.3. Conclusion sur l'induction de l'ARNi de façon exogène

La délivrance de siARN exogènes, au niveau du compartiment cytoplasmique, est soumise à de nombreux obstacles qui nécessitent le développement de moyens de transfection [77]. Ces méthodes doivent apporter diverses caractéristiques essentielles à une délivrance efficace (Figure I-12).

En dépit d'une internalisation possible *in vivo*, les caractéristiques physico-chimiques des siARN exigent une protection renforcée ainsi qu'une bio-distribution contrôlée. Leur sensibilité vis-à-vis des nucléases et le manque de système d'adressage limitent leur utilisation par voie systémique. Pour des applications *in vitro*, le passage de la membrane plasmique constitue la principale barrière pour une délivrance intracellulaire. En outre, la sélectivité de la distribution doit être optimale afin de diminuer les concentrations en siARN utilisé et, par conséquent, limiter les effets indésirables dus à la transfection de séquences d'acides nucléiques.

À l'heure actuelle, différentes techniques sont développées au niveau de l'état de l'art, voire même déjà disponibles dans le commerce, pour le transport des siARN. Chacune de ces techniques possède des avantages et des inconvénients à prendre en considération selon l'application envisagée *in vitro* et/ou *in vivo* (voir chapitre II).

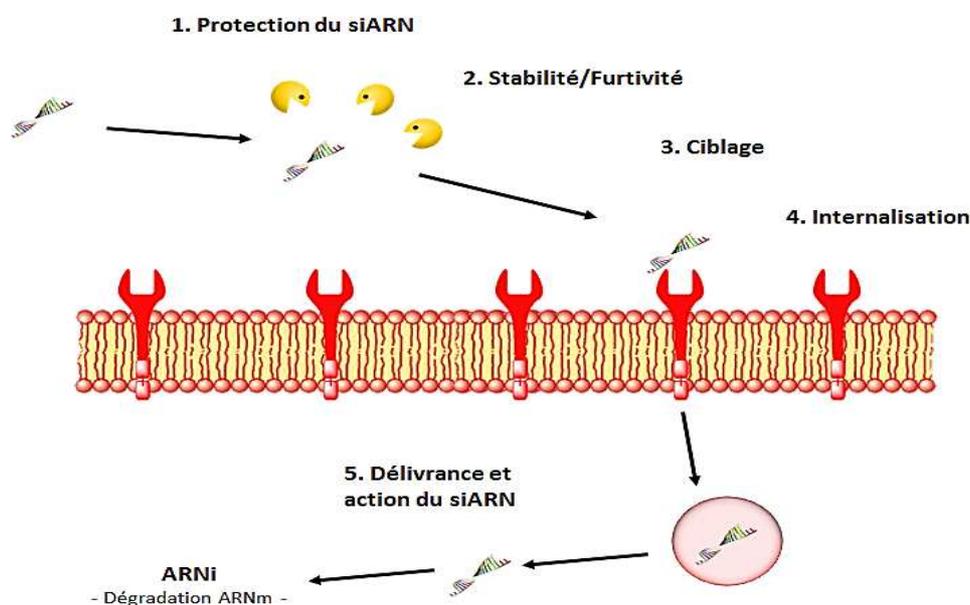


Figure I-12. Les différents obstacles pour la délivrance de siARN : les caractéristiques physico-chimiques des siARN exigent des moyens alternatifs pour surmonter les obstacles à la délivrance dans le compartiment cytoplasmique.

4. Conclusion

Au cours de ces dernières années, le mécanisme d'ARNi a rapidement été adopté au niveau de la génomique fonctionnelle, l'analyse des différents mécanismes cellulaires et pour la validation de cibles pour le diagnostic et le traitement de pathologies. En effet, l'importante spécificité permise par l'inhibition post-transcriptionnelle, ainsi que son caractère transitoire, autorise l'interprétation concernant le rôle d'un gène par l'observation du phénotype d'un même individu. En outre, les perspectives dans le domaine pharmacologique sont considérables, en atteste le nombre croissant d'essais cliniques utilisant les ARN interférents.

Cependant, cet outil prometteur nécessite d'être maîtrisé, notamment dans la délivrance des ARN dans le compartiment cytoplasmique des cellules ciblées. En ce sens, différentes stratégies, physiques et chimiques, ont été développées afin de surmonter les différents obstacles en limitant les effets indésirables. Le second chapitre bibliographique de ce manuscrit est un état de l'art des différents moyens existants pour la transfection de siARN. Ainsi, chaque technique sera caractérisée, avec ses avantages et ses limites, pour

établir son positionnement au regard des applications possibles. Enfin, cet état de l'art permettra de cibler les besoins actuels concernant la transfection de siARN afin d'établir le profil du vecteur que nous avons développé au cours de cette étude.

Bibliographie

1. Chanoine C, Charbonnier F. Biologie cellulaire et moléculaire de la cellule eucaryote. Edition Ellipses. Collection les cours de PAES. France. 2010: 430.
2. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004 Aug 15;18(16):1926–45.
3. 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. *The Plant cell*. 1990 Apr;2(4):279–89.
4. Van Der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, Van Der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*. 1988;333:866-869.
5. Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81(4):611–20.
6. Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selkerl EU, Macino G. vegetative mediated cytoplasmic depend DNA-DNA. *EMBO Journal*. 1996;1(12):3153–63.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998. 391 (6669):806-11.
8. Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Dec 8;95(25):14687–92.
9. Clark SG, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans*. *Cell*. 1994;997:987–97.
10. Zamore PD, Tuschl T, Sharp P a, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):25–33.
11. Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq QMR. The fascinating world of RNA interference. *International journal of biological sciences*. 2009 Jan;5(2):97–117.
12. Kim Y-K, Heo I, Kim VN. Modifications of small RNAs and their associated proteins. *Cell*. 2010 Nov 24;143(5):703–9.

13. Perron MP, Provost P. Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods Mol Biol.* 2009;487:369–85.
14. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):363–6.
15. Guo L, Lu Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PloS one.* 2010 Jan;5(6):e11387.
16. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Reviews.* 2013 Nov;12:847-865.
17. Lewis BP, Shih I-hung, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):787–98.
18. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug discovery today.* 2007 Jun;12(11-12):452–8.
19. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology.* 2007 Jan;23:175–205.
20. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, Olsen CE, Wengel J. LNA (locked nucleic acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron.* 1998;54:3607–3630.
21. Franciscus A. Hepatitis C treatments in current development. *HCV Advocate.* 2010.
22. Zhang Y, Yang P, Sun T, Li D, Xu X, Rui Y, Li C, Chong M, Ibrahim T, Mercatali L, Amadori D, Lu X, Xie D, Li QJ, Wang XF. miR-126 and miR-126* repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis. *Nature cell biology.* 2013 Mar;15(3):284–94.
23. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000 Mar 16;404(6775):293–6.
24. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna J a. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008 Jan 15;105(2):512–7.

25. Kanellopoulou C, Muljo S a, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Levingston DM, Rajewsky K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*. 2005 Feb 15;19(4):489–501.
26. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Aug 23;102(34):12135–40.
27. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642–55.
28. Gredell J a, Dittmer MJ, Wu M, Chan C, Walton SP. Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry*. 2010 Apr 13;49(14):3148–55.
29. Parker JS. How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence*. 2010 Jan;1(1):3.
30. Orban TI, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1 , the Ski complex , and the exosome Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1 , the Ski complex , and the exosome. *Spring*. 2005:459–69.
31. Peng J, Li X, Zhang D, Chen J-K, Su Y, Smith SB, Dong Z. Hyperglycemia, p53, and mitochondrial pathway of apoptosis are involved in the susceptibility of diabetic models to ischemic acute kidney injury. *Kidney International*. 2014;;doi:10.1038/ki.2014.226.
32. Ayers M, Fargnoli J, Lewin A, Wu Q, Platero JS. Discovery and validation of biomarkers that respond to treatment with brivanib alaninate, a small-molecule VEGFR-2/FGFR-1 antagonist. *Cancer research*. 2007 Jul 15;67(14):6899–906.
33. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*. 2007 Jul;6(7):556–68.
34. Kovar H. Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Seminars in cancer biology [Internet]*. 2005 Jun;15(3):189–96.
35. Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D, Wright RD, Lessnick SL, Kung AL, Golub TR. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS medicine*. 2007 Apr;4(4):e122.
36. Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer gene therapy*. 2006 Sep;13(9):819–29.

37. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene therapy*. 2006 Mar;13(6):496–502.
38. Torrance CJ, Agrawal V, Vogelstein B, Kinzler KW. Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screening and drug discovery. *Nature biotechnology*. 2001 Oct;19(10):940–5.
39. Kohli M, Rago C, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic acids research*. 2004 Jan;32(1):e3.
40. Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison E a, Magoon T, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, Mulloy JC, Kogan SC, Brown P, Valent P, Bradner JE, Lowe SW, Vakoc CR. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2011 Oct 27;478(7370):524–8.
41. Edelstein ML. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *Journal of Gene Medicine, The*. 2007;(August):833–42.
42. Vaishnav AK, Gollob J, Gamba-vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, et al. A status report on RNAi therapeutics Review. *Most*. 2010;:1–13.
43. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature materials*. 2013 Nov;12(11):967–77.
44. Taberero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, Gounder MM, Falzone R, Harrop J, Seila White AC, Toudjarska I, Bumcrot D, Meyers RE, Hinkle G, Svrzikapa N, Hutabarat RM, Clausen VA, Cehelsky J, Nochur SV, Gamba-Vitalo C, Vaishnav AK, Sah DWY, Gollob JA, Burris III HA. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov*. 2013 Apr;3(4):406–17.
45. Kastelein JJP, Wedel MK, Baker BF, Su J, Bradley JD, Yu RZ, Chuang E, Graham MJ, Croke RM. Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*. 2006 Oct 17;114(16):1729–35.
46. BENITEC Laboratories, Biomics Biotechnologies. Benitec's hepatitis B RNAi program with Biomics Biotechnologies moves to the next stage following successful stage 1 results. Media release [en ligne]. 2011 ;(February) :1-2.

http://www.benitec.com/documents/pr_BLTHBVUpdate_22feb11.pdf

47. Alvarez R, Ph D, Program TAA. ALN-TTR , an RNAi Therapeutic for the Treatment of Transthyretin-Mediated Amyloidosis [en ligne]. 2010.
http://www.alnylam.com/Files/Presentations/ALN-TTR_AmyloidosisSymp_2010.pdf
48. Layzer JM, Mccaffrey AP, Tanner AK, Huang ZAN, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. 2004;766–71.
49. Whitehead K a, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature reviews. Drug discovery. 2009 Feb;8(2):129–38.
50. Fattal E, Bochot A. Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. Advanced drug delivery reviews. 2006 Nov 15;58(11):1203–23.
51. de Fougerolles A, Novobrantseva T. siRNA and the lung: research tool or therapeutic drug? Current opinion in pharmacology. 2008 Jun;8(3):280–5.
52. Hong J, Huang Y, Li J, Yi F, Zheng J, Huang H, Wei N, Shan Y, An M, Zhang H, Ji J, Zhang P, Xi Z, Du Q, Liang Z. Comprehensive analysis of sequence-specific stability of siRNA. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2010 Dec;24(12):4844–55.
53. Santel a, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. Gene therapy. 2006 Aug;13(16):1222–34.
54. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. Annual review of medicine. 2005 Jan;56:401–23.
55. Juliano RL, Alahari S, Yoo H, Kole R, Cho M. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisens oligonucleotides. Pharmaceutical research. 1999;16(4):494–502.
56. Robertson D. Crohn's trial shows the pros of antisens.. Nature Biotechnol. 1997;15(3):209.
57. Luzio JP, Rous B a, Bright N a, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. Journal of cell science. 2000 May;113 (Pt 9):1515–24.

58. Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR. Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Molecular membrane biology*. 2003;20(2):141–54.
59. Luzio JP, Pryor PR, Bright N a. Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007 Aug;8(8):622–32.
60. Xu Y, Szoka FC. Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome / DNA Complexes Used in cell transfection. *Biochemistry*. 1996;2960(96):5616–23.
61. Hafez IM, Maurer N, Cullis PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene therapy*. 2001 Aug;8(15):1188–96.
62. Tseng Y-C, Mozumbar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 July 25;61(9):721-731.
63. Akita H, Kogure K, Moriguchi R, Nakamura Y, Higashi T, Nakamura T, Higashi T, Nakamura T, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Futaki S, Harashima H. Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: programmed endosomal escape and dissociation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010 May 10;143(3):311–7.
64. Sonawane ND, Szoka FC, Verkman a S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 7;278(45):44826–31.
65. Xia W, Li Y, Lou B, Wang P, Gao X, Lin C. Bioreducible PEI-siRNA Nanocomplex for Liver Cancer Therapy: Transfection, Biodistribution, and Tumor Growth Inhibition In Vivo. *Journal of Nanomaterials*. 2013;2013:1–11.
66. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature reviews. Genetics*. 2007 Mar;8(3):173–84.
67. Guo P, Coban O, Snead N, Trebley J, Hoepflich S, Guo S, Shu Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 April 30;62(6):650-666.
68. Kim D-H, Behlke M a, Rose SD, Chang M-S, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature biotechnology*. 2005 Feb;23(2):222–6.

69. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine*. 2005 Mar;11(3):263–70.
70. Judge AD, Bola G, Lee ACH, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2006 Mar;13(3):494–505.
71. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “ off-target ” transcript silencing. *Spring*. 2006;:1197–205.
72. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell J a, Kroeger PE, Fesik SW, Shen Y. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic acids research*. 2005 Jan;33(14):4527–35.
73. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature reviews. Drug discovery*. 2010 Jan;9(1):57–67.
74. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*. 2003;21(6):635–8.
75. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS. Widespread siRNA off-target transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity Widespread siRNA “ off-target ” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Spring*. 2006;:1179–87.
76. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2009 Jan;48(8):1378–98.
77. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature medicine*. 2005 Jan;11(1):50–5.

CHAPITRE II

Les outils disponibles pour la transfection de siARN

Chapitre II. Les outils disponibles pour la transfection de siARN	65
1. Les méthodes de transfection physiques et chimiques	67
1.1. Les méthodes physiques.....	67
1.1.1. Par perturbation des membranes.....	67
1.1.2. Bombardement de gènes.....	71
1.1.3. Micro-injection.....	71
1.1.4. Conclusion sur les méthodes physiques.....	72
1.2. Méthodes de transfection de transfection après modifications chimiques des siARN	72
1.2.1. Modifications intrinsèques des siARN.....	73
1.2.1.1. Chimie sur le groupement phosphate.....	73
1.2.1.2. Chimie sur le ribose.....	74
1.2.2. Conjugaison à d'autres molécules.....	75
1.2.2.1. Groupements lipophiles.....	75
1.2.2.2. Groupements aptamères.....	76
1.2.2.3. Groupements peptidiques.....	77
1.2.3. Conclusion sur les modifications chimiques.....	77
1.3. Conclusion sur les stratégies de transfection physiques et chimiques.....	78
2. Les vecteurs pour la transfection de siARN.....	80
2.1. Les vecteurs viraux	80
2.1.1. Les différentes classes de vecteurs viraux.....	80
2.1.2. Conclusion sur les vecteurs viraux	82
2.2. Les vecteurs synthétiques pour la transfection de siARN	83
2.2.1. Les nanoparticules pour la transfection.....	83
2.2.2. Les classes de vecteurs synthétiques non-lipidiques	85
2.2.2.1. Les vecteurs inorganiques.....	85
2.2.2.2. Les vecteurs polymériques.....	87
2.2.2.3. Les vecteurs peptidiques.....	95
2.2.2.4. Conclusion sur les vecteurs synthétiques non-lipidiques	101
2.2.3. Les vecteurs synthétiques lipidiques.....	103
2.2.3.1. Les liposomes neutres.....	103
2.2.3.2. Les lipoplexes	104
2.2.3.3. Les nanoparticules lipidiques cationiques	109
2.2.3.4. Conclusion sur les vecteurs lipidiques synthétiques.....	111
3. Conclusion sur les moyens de transfection de siARN.....	113
4. Objectifs de la thèse	114

Le chapitre précédent a mis en avant l'intérêt de la transfection de siARN dans la recherche et le développement de nouvelles thérapies, mais également les limites concernant la distribution cytoplasmique de ces séquences d'acides nucléiques. Cependant, plusieurs techniques ont été développées au cours des dernières années afin de surmonter ces divers obstacles. La plupart d'entre elles sont dérivées des outils développés pour la transfection d'ADN, mais reste néanmoins adaptées selon l'application ciblée, *in vitro* et/ou *in vivo*. En s'appuyant sur l'état de l'art, ce chapitre a pour but de répertorier les différents moyens de transfection de siARN, définir leurs limites, leurs domaines d'applications afin de mettre en évidence les manques actuels. Ainsi, les caractéristiques en termes d'innocuité, d'efficacité de transfection, et de délivrance dans les cellules décrites comme difficile à transfecter seront notamment discuter pour présenter l'intérêt de chaque technique de transfection. Au regard des moyens existants actuellement, mais surtout de leurs limites, nous positionnerons notre étude et les caractéristiques recherchées pour le développement d'un vecteur.

1. Les méthodes de transfection physique et chimique

1.1. Les méthodes physiques

Les méthodes de transfection physique regroupent les techniques s'appuyant sur un mécanisme physique de transfert des séquences d'acides nucléiques. Trois sous-classes peuvent être décrites : les méthodes provoquant des perturbations de la membrane plasmique suffisante pour la délivrance de petites molécules (électroporation, sonoporation,...), des méthodes forçant la transfection d'acides nucléiques (bombardement de gènes) et des techniques de transfert direct dans le compartiment désiré (micro-injection).

1.1.1. Par perturbation des membranes

L'une des techniques envisagées pour favoriser l'accessibilité du cytoplasme consiste en la perturbation de la membrane plasmique de la cellule par des procédés physiques afin de forcer l'internalisation des séquences d'acides nucléiques.

L'électroporation représente à l'heure actuelle l'une des méthodes les plus décrites au niveau de la littérature. La double couche lipidique, formant la membrane de toutes les cellules, est constituée de molécules possédant des charges négatives exposées. Ainsi, la membrane est sensible à l'influence de champ électrique appliqué. Au cours d'une impulsion électrique brève, mais puissante, les molécules

lipidiques se réorientent et subissent des phases de transition thermique dues à l'échauffement, entraînant dès lors la création transitoire de milliers de pores hydrophiles, pouvant aller jusqu'à 40 nm de rayon, ainsi que des perturbations localisées dans l'intégrité de la membrane cellulaire [1]. La perte temporaire de la semi-perméabilité des membranes cellulaires provoque la fuite du contenu intracellulaire et de molécules telles que des ions et des métabolites. Dans le même temps, une absorption de diverses molécules extracellulaires est possible : des médicaments, des sondes moléculaires et des acides nucléiques, dont les plasmides de tailles relativement importantes ainsi que les siARN (Figure II-1). Un exemple de ce type de technique a permis la transfection de siARN régulant l'expression de Pax6 lors de l'étude des fonctions de la cellule [2]. Lors de cette étude, l'équipe de Balakrishnan *et al.* a internalisé avec succès des siARN dans des cellules INS-1E par électrophorèse en appliquant une à deux impulsions de 15 μ s à 1,5 kV/cm (les conditions optimales décrites par le fournisseur Multiporator®). En outre, l'électroporation a été démontrée pour délivrer des siARN dans des cellules difficiles à transfecter, telles que des cellules primaires et en suspension [2]. En effet, Jordan *et al.* ont rapporté des efficacités de transfection sur des cellules en suspension de type Jurkat, deux lignées cellulaires de neuroblastome (les cellules humaines SK-N-SH ainsi que les cellules murines Neuro-2A) et des cellules primaires de type Huvec. Ces résultats ont démontré une inhibition de 75 à 95% de l'expression des gènes ciblés, 4 heures seulement après transfection.

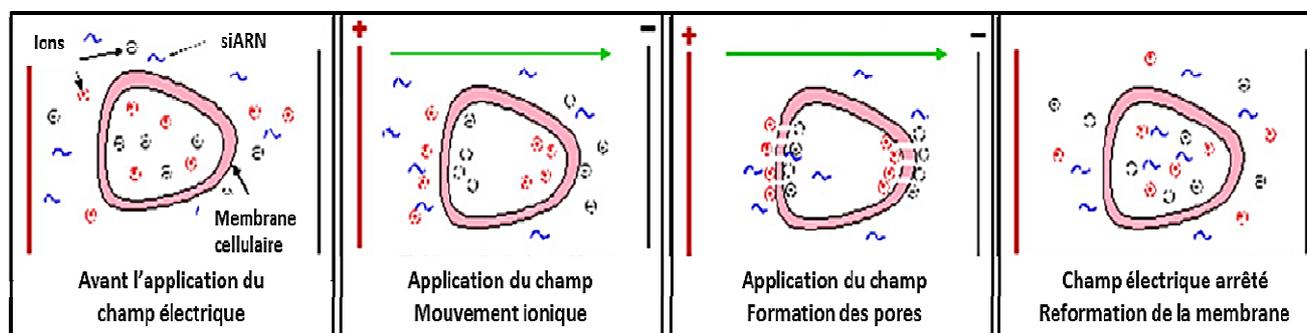


Figure II-1. Principe de l'électroporation : un champ électrique entraîne une perturbation de la membrane plasmique suffisante pour créer des pores. La perte d'intégrité de la membrane plasmique autorise des échanges entre les milieux extra- et intracellulaire.

En outre, des travaux de laboratoires français ont démontré l'utilisation de l'électroporation pour la transfection d'ADN plasmidique, après association avec le copolymère pluronic L64, lors d'applications *in vitro* et *in vivo* [5, 7]. Pour des expériences *in vitro* sur des cellules ovariennes de hamster CHO, des efficacités de transfection de 40% ont été rapportées 24 heures après la transfection de 2 μ g/mL de plasmide, associés avec 0,05% de L64 et l'application de 10 impulsions de 5 millisecondes à 0,5 kV/cm [5]. Néanmoins, cette efficacité de transfection reste liée à une cytotoxicité de 23% pour les meilleures

conditions décrites [5]. *In vivo*, l'électroporation associée au polymère L64 au niveau du muscle tibial antérieur a permis la délivrance d'ADN plasmidique [7]. En effet, 8 impulsions électriques de 20 millisecondes, à 190 V/cm, ont été appliquées 20 secondes après injection de l'ADN plasmidique, améliorant alors fortement les efficacités de transfection [7]. Cette démarche est cependant liée à une inflammation significative des régions traitées 3 jours après l'électrotransfert, dont l'intensité décroît fortement après 7 jours [7].

Ainsi, l'utilisation de l'électroporation peut être associée à certaines limites, notamment en termes de viabilité cellulaire. En effet, cette technique, stressante pour les cellules, peut endommager leur membrane et, parfois, conduire à l'apoptose. De plus, les différentes conditions utilisées peuvent fortement altérer les efficacités de transfection et la viabilité cellulaire [3]. Dans leur étude comparative sur les macrophages bovins dérivés de monocytes bMDM, Jensen *et al.* ont montré que, dans les conditions optimales, une internalisation des siARN de 60% était corrélée à plus de 30% de cytotoxicité. Celle-ci peut être exacerbée par l'utilisation de tampon de type siPORT, entraînant plus de 80% de cytotoxicité lors de l'électroporation [3]. Pour réduire l'impact sur la viabilité, l'utilisation d'un milieu de culture cellulaire riche en glucose peut favoriser la réparation des dommages subis par les cellules et augmenter la viabilité de plus de 20% [4].

En complément des limites en termes de viabilité, la perméabilisation simultanée de toutes les cellules est pratiquement impossible en raison de l'hétérogénéité des cellules au niveau de leur taille, de l'épaisseur de leur membrane et de leur volume [6]. En effet, l'intensité du champ électrique est définie suivant l'équation : $E_c = V_c / (0,75 \times D)$ avec E_c , V_c et D représentant respectivement l'intensité du champ électrique (V/cm), la tension de perméation de la membrane (V) et le diamètre cellulaire (μm) [6]. Dès lors, une hétérogénéité au niveau de ces variables augmente les difficultés pour le choix de l'intensité du champ électrique à appliquer. Les paramètres individuels de l'électroporation, y compris la tension, la durée de l'impulsion électrique, et le nombre d'impulsions, doivent être optimisés pour différents types cellulaires, de telle sorte qu'un équilibre précis soit établi entre l'efficacité d'administration et la mortalité cellulaire.

Par ailleurs, la nécessité d'utiliser un dispositif pour appliquer l'électroporation peut limiter les applications *in vivo* suivant les zones et les modèles traités. En effet, en plus de l'application d'impulsions électriques pouvant provoquer des désagréments, une adaptation du procédé doit être effectuée en fonction des zones ciblées.

De la même manière que l'électroporation, la sonoporation permet de changer de manière transitoire la perméabilité de la membrane cellulaire [8]. L'effondrement de microbulles par application

d'ultrasons libère une énergie, dite de cavitation, responsable de la formation de pores dans la membrane plasmique pouvant aller jusqu'à un maximal de 16 nm de rayon (Figure II-2) [9]. La taille des pores créés est directement dépendante de la taille des microbulles injectées, mais également du temps d'application des ultrasons (Figure II-2). Inoue *et al.* décrivent ce principe dans une étude de l'amélioration locale de l'arthrite *in vivo* [10]. Une solution de microbulles de 2 à 3 μm , associées à des siARN, a été injectée au niveau de la patte d'un rat avant l'application d'ultrasons, à une intensité de 2 W/cm^2 pendant une minute. Les siARN, marqués par un fluorophore, sont ainsi observés dans le tissu synovial après 24 heures, attestant une efficacité de transfection [10].

Néanmoins, la viabilité cellulaire est considérablement affectée lors de l'utilisation de cette technique [11]. En effet, lors d'émission continue d'ultrasons sur des cellules murines C166, 75% des cellules sont mortes ou détruites mécaniquement dès l'application d'une puissance de 1,38 W. Avec une émission d'ultrasons discontinue, pour la même puissance, 50% de mortalité cellulaire persiste [11]. En outre, le pourcentage de cellule morte ou détruite augmente avec la puissance, limitant la variation de ce paramètre [11]. Enfin, parmi les cellules encore vivantes, seulement 25% démontrent une sonoporation efficace dans des conditions optimales.

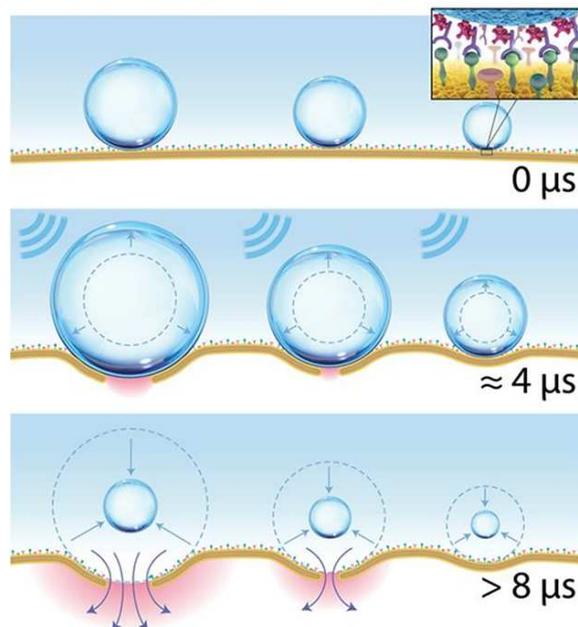


Figure II-2. Principe de sonoporation : l'application d'ultrasons sur des microbulles provoque une émission d'énergie suffisante pour la création de pores dans la membrane plasmique (d'après Fan *et al.*, 2012 [9]).

Les membranes cellulaires peuvent également être perturbées par des techniques d'injection hydrodynamique [12]. Cette méthode, uniquement applicable *in vivo*, consiste à injecter rapidement de grands volumes de solution physiologique afin de créer de fortes pressions hydrostatiques [13]. Lewis *et al.*

ont démontré qu'une injection de 2 mL de solution physiologique comprenant 5 µg de siARN en 10 secondes, dans la veine de la queue de souris post-natales, permet une inhibition de l'expression du gène ciblé de 80 à 90% au niveau du foie, des reins, de la rate, des poumons et du pancréas [12].

Cependant, cette technique est associée à un stress, ainsi que des dommages cellulaires et tissulaires importants [14]. Un examen histologique hépatique chez des souris obèses, ayant subies la méthode d'injection hydrodynamique, a révélé des blessures importantes. Après deux jours, des zones d'hémorragie et d'inflammation périphérique étaient décelées. Après cinq jours, de vastes régions d'inflammations locales étaient encore visibles. Après huit jours, ces effets significatifs persistaient sur la fonction hépatique et sur l'histologie, témoignant d'un traumatisme majeur chez ces animaux [14].

1.1.2. Bombardement de gènes

La délivrance de gènes utilisant la biolistique est un mécanisme qui consiste à projeter à très grande vitesse des microbilles métalliques enrobées d'acides nucléiques. Après avoir longtemps été utilisée pour la transfection d'ADN dans les cellules végétales [15], la biolistique a été transposée avec succès pour la transfection de siARN chez des cellules difficiles à transférer [16]. Les travaux de Svarovsky *et al.* se sont appuyés sur l'utilisation de billes d'or de 1,5 µm de diamètre, enrobées de polymères cationiques PEI, auxquelles ont été complexés 300 pmole de siARN d'intérêt [16]. Cette expérience a montré qu'un tir de ces particules, à une puissance de 100 psi, permet une efficacité d'inhibition *in vitro* de l'expression de la luciférase ciblée de 90% sur des cellules NIH-3T3 [16].

Cependant, l'utilisation de la biolistique reste soumise à des contraintes majeures, notamment *in vivo* : en effet, les billes projetées sont progressivement ralenties en traversant les différentes couches cellulaires, entraînant des dommages significatifs sur les cellules et/ou les tissus ciblés [17, 18]. Des expériences effectuées sur des cellules Hela et HEK293 démontrent un traumatisme important dû à la biolistique, matérialisé par leur destruction ou leur entrée en apoptose [17]. En outre, la distribution des siARN est limitée quantitativement, avec seulement 30% de transfection, et qualitativement, avec une hétérogénéité dépendante de la distance des cellules par rapport à la cible [17].

1.1.3. Micro-injection

La micro-injection de gènes, directement dans le compartiment cytoplasmique, est une méthode de transfection qui permet de s'émanciper de nombreuses limites inhérentes à l'utilisation de siARN. L'utilisation d'un capillaire en verre ultrafin permet d'apporter la séquence d'acides nucléiques directement sur le lieu du mécanisme d'ARNi. Ainsi, les limites de stabilité, d'internalisation ou même d'échappement endosomal ne représentent pas des obstacles [19]. Usui *et al.* ont utilisé ce procédé pour étudier le rôle de *cdc42*, par son inhibition post-transcriptionnelle, dans les adipocytes 3T3-L1 [19]. Lors de cette étude, la

translocation du transporteur GLUT-4, autorisée par l'expression de cdc42, est diminuée de 65% attestant de la délivrance efficace des siARN dans les cellules traitées [19].

Cependant, ce type de manipulation nécessite de traiter les cellules une par une pour internaliser les siARN. Ainsi, le traitement d'un nombre de cellule suffisant pour obtenir des résultats significatifs peut exiger un temps de manipulation considérable.

1.1.4. Conclusion sur les méthodes physiques

Ces techniques de transfection présentent l'avantage d'être physiques, donc non-limitées au type cellulaire étudié. Ainsi, les efficacités de transfection peuvent être rapportées sur des lignées immortalisées autant que sur des cellules décrites comme difficile à transfecter.

En dépit de cet avantage, la plupart des méthodes de transfection physique peuvent provoquer un stress ; il existe en effet une certaine cytotoxicité évaluée à environ 20% dans les meilleures conditions rapportées. De plus, l'hétérogénéité de distribution de siARN, s'appuyant sur ces méthodes, prouve un déficit du contrôle de la délivrance.

Ces limites démontrent la nécessité de développer d'autres techniques de transfection de siARN dont les caractéristiques offrent un contrôle plus précis de la distribution et, surtout, préservent l'intégrité des cellules en présentant une innocuité élevée.

1.2. Méthodes de transfection après modifications chimiques des siARN

Une alternative proposée pour la transfection de siARN concerne la modification chimique des séquences d'acides aminés [20]. Dans le premier chapitre, l'état de l'art a permis d'établir que la simple différence entre l'utilisation d'ARN interférents simples ou doubles brins permet une amélioration majeure de l'inhibition [21]. Dès lors, d'autres modifications dans la séquence, ou par une conjugaison à d'autres molécules, pourraient permettre d'améliorer les caractéristiques en termes de résistance aux nucléases et/ou de réduction des effets aspécifiques (voir chapitre I). Ces changements dans la structure des siARN peuvent s'effectuer à différents niveaux : dans le groupement phosphate ou dans le ribose des nucléotides (Figure II-3).

1.2.1. Modifications intrinsèques des siARN

1.2.1.1. Chimie sur le groupement phosphate

Le phosphate formant le squelette du siARN peut être modifié en substituant la molécule d'oxygène et en la remplaçant par du soufre (Figure II-3-B) ou du borate (Figure II-3-C). L'utilisation du soufre améliore légèrement la résistance aux nucléases et augmente l'internalisation dans les cellules sans affecter l'efficacité d'extinction [22]. Cependant, ces modifications peuvent être associées à une présence de cytotoxicité par l'activation aspécifique des voies apoptotiques [23]. L'utilisation du borate, quant à lui, augmente sensiblement la résistance aux nucléases sans altérer l'efficacité d'inhibition [24].

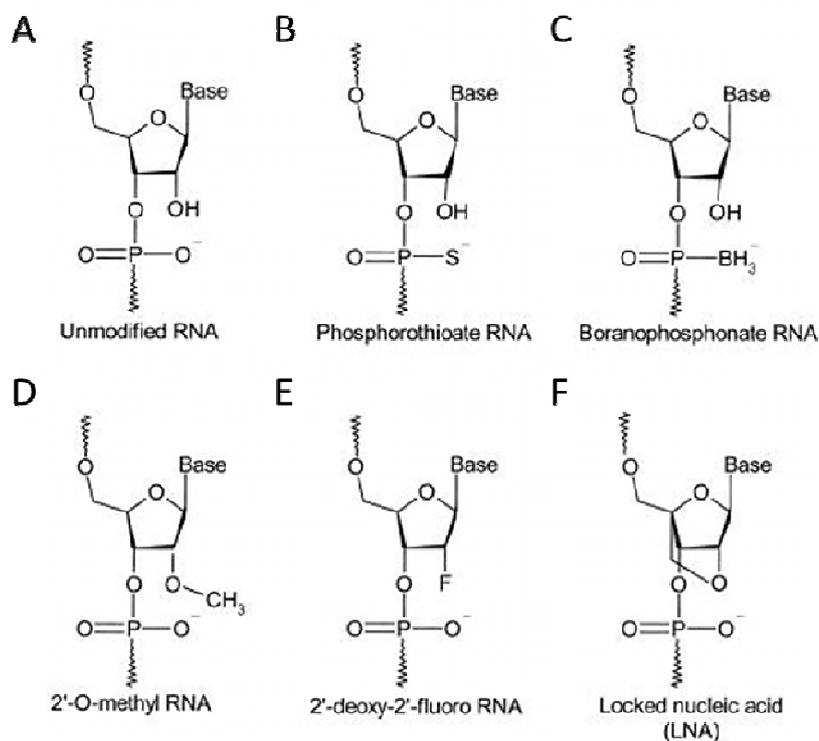


Figure II-3. Modifications chimiques introduites dans les siARN : comparaison entre un nucléotide non-modifié (A), avec une modification du phosphodiester (B et C) et une modification du ribose en position 2' (D, E, F) (D'après De Paula et al., 2007 [25]).

Dans cette dernière étude, la transfection de siARN modifiés par un groupement borate sur le phosphate des nucléotides, sur les cellules Hela sur-exprimant la protéine GFP, permet d'obtenir une inhibition fonctionnelle plus importante qu'avec des siARN non-modifiés [24]. En effet, une modification sur 26% des nucléotides, dont moins de 4% en position centrale, autorise une inhibition 15% plus élevée de l'expression de la protéine GFP, par rapport à un siARN non-modifié autorisant 75% d'inhibition

fonctionnelle après transfection [24]. À l'inverse, une modification plus importante en position centrale peut nuire à l'efficacité d'inhibition, probablement en conséquence d'une altération de la région *seed* (voir chapitre I). En outre, Hall *et al.* rapportent qu'aucun signe de cytotoxicité n'a été mis en évidence, même avec une modification de 76% des monophosphates des siARN testés [24]. Cependant, en dépit de l'amélioration de l'inhibition, la transfection des siARN, modifiés ou non, est dépendante d'un vecteur lipidique commercial, l'Oligofectamine [24]. En effet, ces résultats d'inhibition fonctionnelle sont issus d'une combinaison entre l'utilisation de vecteurs commerciaux et de modifications chimiques des siARN.

1.2.1.2. Chimie sur le ribose

Au niveau du ribose, les modifications principalement décrites se concentrent sur le carbone en 2' normalement porteur d'un groupement hydroxyle (Figure II-3-A). Parmi les substitutions possibles, la présence d'un 2'-O-méthyl (Figure II-3-D) montre des caractéristiques intéressantes notamment pour éviter les effets indésirables mentionnés dans le chapitre I, à savoir l'induction possible de réponses immunitaires, des effets aspécifiques des ARN interférents et la saturation des voies endogènes. La 2'-O-méthylation d'un brin diminue la probabilité de sa sélection comme brin guide : appliquée au brin passager identifié au préalable, elle diminue sa probabilité de chargement dans le complexe multienzymatique RISC, augmentant ainsi l'efficacité du brin guide [26]. De plus, un positionnement de ce groupement dans la région *seed* diminue à la fois les effets aspécifiques [27] et la possibilité de réponse immunitaire non-désirée [28]. C'est pourquoi cette modification est couramment effectuée lors de la synthèse des siARN disponibles dans le commerce.

Une autre substitution rapportée sur la position 2' du ribose concerne l'insertion de fluor (Figure II-3-E). Cette modification, utilisée pour des études *in vivo*, a montré des résultats intéressants pour l'amélioration de l'efficacité d'inhibition et dans la prolongation du temps de demi-vie dans le plasma [29]. En effet, les études de Layzer *et al.* rapportent un maintien complet de l'intégrité des siARN, modifiés par du fluor, dans le plasma humain après une heure d'incubation ; dans le même temps, des siARN n'ayant subi aucune modification sont totalement dégradés [29].

L'une des modifications chimiques les plus décrites dans la littérature concerne les siARN contenant des acides nucléiques bloqués (*locked nucleic acid* ou LNA) (Figure II-3-F). Les LNA sont caractérisés par une liaison 2'-O-méthyl-4' associée à une augmentation considérable du temps de demi-vie dans le sérum : jusqu'à 90 heures avec des siARN modifiés, contenant entre 14 et 43% de LNA, pendant que les siARN non-modifiés sont dégradés après 5 minutes [30]. Cependant, cette modification nécessite d'être contrôlée afin de ne pas perturber la prise en charge par les enzymes du complexe RISC [30]. La solution la plus adéquate consiste à concentrer les modifications sur le brin sens (ou passager) pour favoriser la sélection du brin anti-

sens (ou guide) par la protéine Argonaute 2 [31]. Par ailleurs, la composition des séquences d'acides nucléiques comprenant des LNA doit être totalement maîtrisée pour ne pas induire l'effet inhibiteur sur des miARN naturels, par effet stérique essentiellement, comme mentionné dans le chapitre I.

1.2.2. Conjugaison à d'autres molécules

Les extrémités des siARN peuvent également être modifiées par la liaison de ligands permettant d'améliorer leurs propriétés. Cependant, le greffage de ce type de molécule doit préférablement être effectué au niveau du brin sens afin de ne pas entraver le mécanisme d'ARNi [32]. En effet, le rôle essentiel du brin antisens pour la reconnaissance de l'ARNm cible limite les modifications apportées à ces séquences. Néanmoins, le greffage de molécules sur le brin anti-sens reste possible en position 3', mais fortement dépendant de la nature du groupement choisi. Par exemple, un groupement biotine n'altère pas l'efficacité d'inhibition post-transcriptionnelle mais un groupement hydroxyéthylphosphate entraîne une perte d'efficacité [33, 34]. Ainsi, plusieurs familles de groupement peuvent être sélectionnées pour une conjugaison sur le brin sens préférentiellement.

1.2.2.1. Groupements lipophiles

Le principe est de synthétiser des siARN conjugués à des dérivés lipophiles (tels que le cholestérol) : la partie lipidique se lie alors de manière covalente avec une extrémité du brin sens (Figure II-4) [35] favorisant le passage de la membrane plasmique hydrophobe.

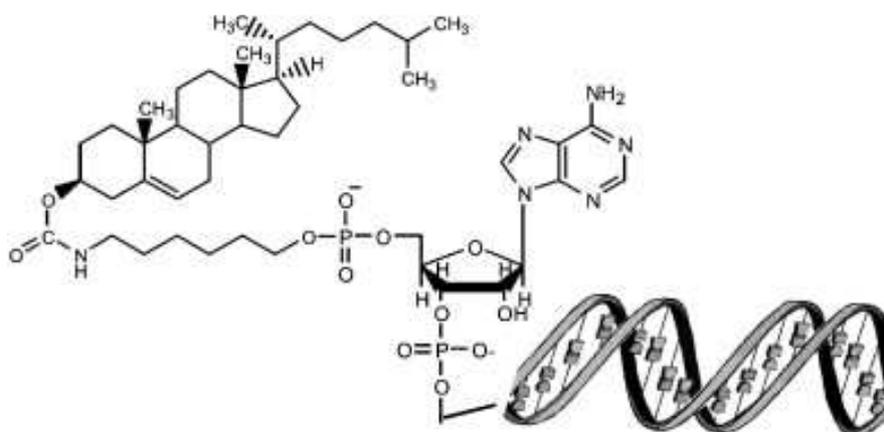


Figure II-4. Conjugaison à un groupement lipophile : une liaison covalente entre le brin sens et une molécule de type cholestérol ou dérivé stéroïde permet d'augmenter l'internalisation et favorise le ciblage de cellules spécifiques (D'après Lorenz et al., 2004 [35]).

Le cholestérol et ses analogues s'avèrent être des ligands particulièrement intéressants pour le ciblage du foie en raison de la présence de récepteurs sur les hépatocytes permettant l'endocytose du cholestérol [35]. En complément d'une propriété pour le ciblage, la conjugaison à ce type de molécule lipophile permet de stabiliser les siARN *in vivo*, jusqu'à 30 minutes, en diminuant leur clairance rénale [33, 36]. Les résultats positifs obtenus avec le cholestérol ont ouvert la voie vers des tests avec d'autres molécules lipophiles, telles que des acides gras ou des acides biliaires [37]. Il a été observé que la liaison des siARN à ces molécules permet de cibler les hépatocytes à travers leurs récepteurs HDL (*High Density Lipoprotein*), et ainsi de favoriser l'internalisation dans ce modèle cellulaire. Afin d'illustrer cet effet, Lorenz *et al.* démontrent une efficacité d'inhibition de 46% après transfection de siARN, modifiés en 3' du brin sens par du cholestérol ou par le composé lipophile C32, sur des lignées cellulaires d'hépatome Huh-7 [35].

D'autres molécules lipophiles peuvent être associées de manière covalente aux siARN, notamment certaines vitamines. Nous pouvons citer par exemple la biotine B8 (ou vitamine A) ou l' α -tocophérol (vitamine E) (Figure II-5), ce dernier permettant le ciblage des hépatocytes [38]. Nishina *et al.* se sont appuyés sur la conjugaison d' α -tocophérol sur des siARN ciblant l'apolipoprotéine B (apoB) se trouvant dans le foie de souris [38]. L'injection de 32 mg/kg de ces siARN a induit une inhibition de 80% de l'expression de l'ARNm de l'apoB deux jours après traitement, sans avoir recours à un autre outil pour la transfection [38]. Cependant, l'absence de vecteur induit la nécessité d'utiliser des concentrations de siARN élevées, alors que dans le même temps, les publications actuelles peuvent rapporter des concentrations inférieures à 1 mg/kg.

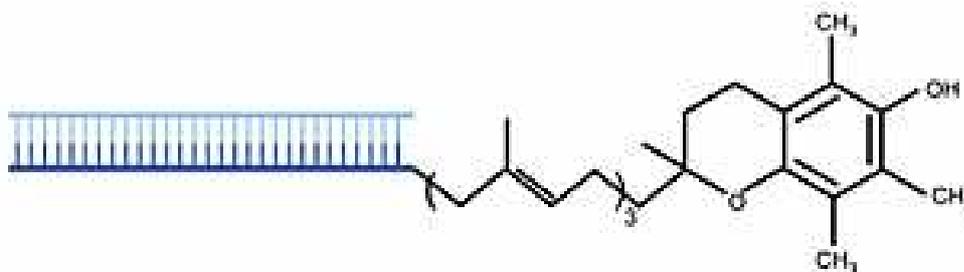


Figure II-5. Conjugaison à la vitamine E : une liaison covalente entre le brin sens et l' α -tocophérol a permis de cibler spécifiquement les hépatocytes grâce à leurs récepteurs de surface (d'après Manjunath *et al.*, 2004 [39]).

1.2.2.2. Groupements aptamères

Les groupements aptamères sont des oligonucléotides synthétiques d'ADN ou d'ARN de 20 à 50 nucléotides qui peuvent se fixer spécifiquement et avec une grande affinité à une cible. De par les banques importantes d'ARN existantes, de nombreux aptamères différents peuvent être générés pour se fixer à des récepteurs de nature très variée, ceci en leur donnant une conformation spatiale finement définie et contrôlée [20]. Des exemples sont décrits dans la littérature utilisant ce type de conjugaison : les travaux de

McNamara *et al.* s'appuient sur des aptamères fixant spécifiquement les antigènes membranaires de la prostate PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) fortement exprimés par les cellules tumorales prostatiques [40]. L'injection intra-tumorale de siARN conjugués à cet aptamère, ciblant l'expression du gène Plk1 surexprimé dans les tumeurs humaines, permet une inhibition majeure de la croissance tumorale prostatique sur les souris traitées [40]. En effet, le volume de la tumeur mesurée passe de 0,7 cm³ avec un siARN contrôle sur un modèle de xénogreffe de souris exprimant PSMA (LNCaP), à un volume de 0,1 cm³ avec le siARN ciblant Plk1 [40]. En outre l'utilisation de siARN ciblant Plk1 sur un modèle de xénogreffe chez la souris n'exprimant pas PSMA (PC3) ne permet pas l'inhibition de la croissance tumorale [40].

Ainsi, la simplicité de synthèse et la forte spécificité des aptamères permettent de les considérer comme une alternative intéressante pour l'adressage des siARN.

1.2.2.3. Groupements peptidiques

Certaines séquences peptidiques d'environ trente acides aminés et de charge positive, appelées peptides de pénétration cellulaire (CPP), peuvent initier le passage de la membrane cellulaire. Ces CPP peuvent aussi bien être associés aux siARN par des liaisons électrostatiques (*voir partie 2.2.2.3*) que par des liaisons covalentes permettant une conjugaison. Des études *in vitro* ont montré que les siARN, reliés aux CPP par une liaison labile, sont libérés dans le compartiment cytoplasmique sans avoir recours à une grande quantité de peptides [41]. Ainsi, Muratovska *et al.* démontrent une efficacité d'inhibition permise par la transfection de siARN, conjugués à des peptides de type pénétratine ou transportan, ciblant la GFP surexprimée chez des cellules murines. Après 7 jours d'incubation, les cellules EOMA-GFP et C166-GFP présentent une inhibition respective de 80% et 86% avec le siARN conjugué à la pénétratine et de 97% et 68% avec le siARN conjugué au transportan.

1.2.3. Conclusion sur les modifications chimiques

Les modifications chimiques intrinsèques des siARN offrent un avantage intéressant : elles permettent d'obtenir des molécules plus stables [20, 42] et de diminuer les effets indésirables dus à l'utilisation de siARN synthétiques [20, 43] (*voir chapitre I*). En ce sens, les LNA représentent une alternative de plus en plus utilisée dans les études sur l'ARNi [44]. Néanmoins, ce genre de modification nécessite d'être finement contrôlée afin de ne pas interférer avec le mécanisme d'ARNi et diminuer son efficacité. En outre, en dépit de l'amélioration des propriétés du siARN permise par les modifications de leur structure, les modifications intrinsèques ne permettent pas des transfusions efficaces sans outils alternatifs tels que des

vecteurs, probablement en raison de la nécessité d'un système d'adressage pour améliorer la protection, la distribution et l'internalisation de ces courtes séquences d'acides nucléiques.

Les modifications par conjugaison de molécules, sur les brins sens des siARN, peuvent favoriser la délivrance d'ARN interférents indépendamment de l'utilisation de vecteurs. De plus, cette distribution peut présenter l'avantage d'être très spécifique et dépendante de la nature de la molécule greffée [40]. Cependant, cette stratégie peut rapidement devenir fastidieuse, notamment avec l'étude de plusieurs siARN différents et/ou sur différents modèles cellulaires. En effet, chaque type de siARN utilisé doit être modifié chimiquement et purifié par des procédés de chromatographie, des étapes contraignantes dans le cadre d'applications à grande échelle (criblage à haut-débit). En outre, une conjugaison adaptée à certains modèles cellulaires limite d'autant plus une utilisation pratique.

1.3. Conclusion sur les stratégies de transfection physiques et chimiques

Ces méthodes de transfection, ne s'appuyant pas sur l'utilisation de vecteurs, présentent des caractéristiques particulières permettant de leur attribuer des applications possibles privilégiées (Tableau II-1). Ainsi, nous avons défini les applications de transfection possibles suivant quatre catégories qui représentent des enjeux majeurs dans le domaine de la transfection : la transfection *in vitro*, la transfection *in vivo*, la délivrance d'ARN interférents dans les cellules difficiles à transférer et les applications de criblage à haut-débit.

Les méthodes physiques présentent l'avantage majeur de favoriser l'internalisation des ARN interférents dans tous les types de cellule, en s'appuyant uniquement sur des caractéristiques forçant l'entrée des acides nucléiques. Ainsi, ces méthodes permettent de s'émanciper des limites rencontrées avec les cellules difficiles à transférer. Cependant, leur caractère traumatisant, pouvant affecter la viabilité cellulaire, peut limiter leur utilisation.

Les méthodes chimiques peuvent être divisées en deux catégories : les modifications intrinsèques et la conjugaison de groupement en 3' du brin sens. Pour la première catégorie, en dépit d'une amélioration des caractéristiques, la transfection des siARN modifiés reste dépendante de l'utilisation d'autres moyens de délivrance, notamment les vecteurs. Pour la seconde catégorie, la conjugaison peut permettre une utilisation des siARN modifiés indépendamment d'autres moyens de délivrance. La sélectivité permise par les molécules choisies représente un atout pour une distribution spécifique, limitant ainsi des effets aspécifiques potentiels. Néanmoins, cette technique requiert une modification précise pour ne pas affecter l'efficacité du brin anti-sens dans le déclenchement de l'ARNi. De plus, une expérimentation de plus grande ampleur sur différents siARN et/ou sur différents types cellulaires peut représenter un ajustement fastidieux.

En ce sens, l'utilisation de vecteur peut s'avérer être une alternative intéressante. En effet, les familles de vecteur existantes actuellement possèdent des caractéristiques différentes des techniques physiques et chimiques. Par exemple, les vecteurs cationiques offrent la possibilité d'une complexation rapide s'appuyant sur un protocole simple, autorisant ainsi le test de nombreux siARN différents avec la même préparation de vecteur. Les différentes familles de vecteur (viraux, inorganiques, polymériques, peptidiques et lipidiques) vont être présentées pour évaluer leurs qualités, leurs limites, ainsi que les applications envisagées par leur utilisation.

	Modifications physiques		Modifications chimiques	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Non-dépendantes du type cellulaire - Favorisation de l'internalisation 		<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des propriétés des siARN (stabilité, protection, ...) - Sélectivité de la distribution (conjugaison) 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Stress pour les cellules (mortalité, apoptose, ...) - Manque de contrôle de la distribution (hétérogénéité) - Difficulté du processus 		<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'un contrôle précis de la modification pour ne pas altérer l'efficacité - Non-adaptées pour les campagnes expérimentales importantes (avec différents siARN et sur différentes cellules) - Difficulté du processus 	
Applications possibles		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> - Cellules difficiles à transfecter - <i>In vivo</i> Limité – sonoporation Ex vivo privilégié 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> Conjugaison (limité à certains organes) - <i>In vivo</i> Conjugaison (limité à certains organes)
		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - <i>In-vivo</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - Cellules difficiles à transfecter

Tableau II-1. Comparaison des méthodes de transfection physiques et chimiques : chaque méthode présente des caractéristiques permettant de définir son domaine d'application privilégié.

2. Les vecteurs pour la transfection de siARN

2.1. Les vecteurs viraux

L'utilisation des virus, pour la délivrance de séquences d'acides nucléiques, repose sur leur capacité à transférer leur propre matériel génétique dans les cellules de mammifères avec une grande efficacité. À partir de cette observation, les virus peuvent être modifiés de manière à réduire leur pouvoir pathogène [45], tout en intégrant des séquences d'ARN interférent. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus codant pour certaines protéines, notamment celles associées à un comportement pathogène, pour conserver uniquement celles utilisées pour construire le vecteur et assurer le cycle d'infection. Il existe plusieurs types de vecteurs viraux, chacun possédant des propriétés particulières pouvant être exploitées pour la transfection (Figure II-6).

2.1.1. Les différentes classes de vecteurs viraux

Dans la littérature, trois classes de vecteurs viraux se détachent pour la délivrance d'ARN interférent : les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés aux adénovirus (*adeno-associated virus* ou AAV) (Figure II-6).

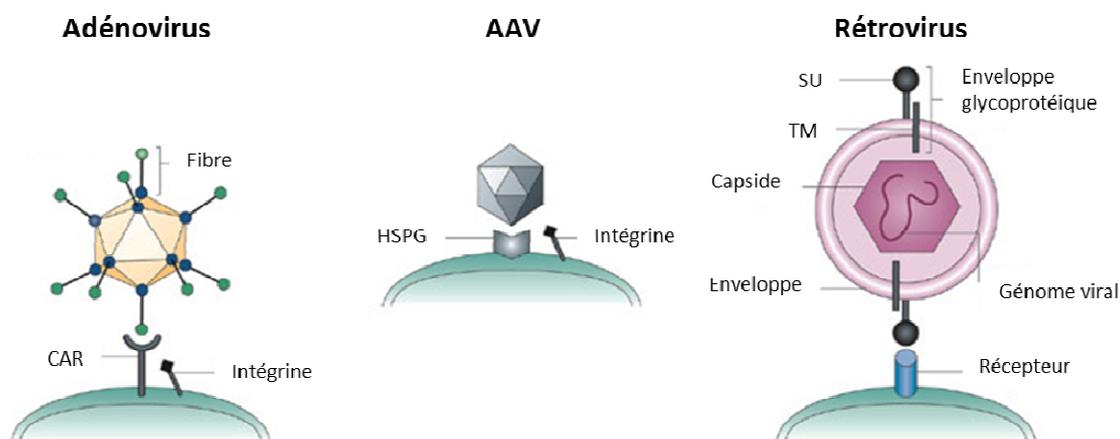


Figure II-6. Représentation des différentes classes de virus utilisées pour la transfection : trois familles majeures se distinguent et ont été utilisées pour des essais de transfection pour déclencher l'ARN interférence : les adénovirus, les virus associés aux adénovirus (AAV) et les rétrovirus (d'après Waehler et al., 2007 [46]).

Les rétrovirus se décomposent en deux familles généralement utilisées pour la délivrance d'ARN simples brins [47] : les oncorétrovirus et les lentivirus [31]. Les oncorétrovirus se distinguent par leur intégration limitée aux cellules en multiplication. Cependant, leur utilisation pour la délivrance d'acides

nucléiques est associée à une oncogénicité importante [48]. Les lentivirus, quant à eux, peuvent s'intégrer sans distinction dans les cellules en multiplication ou les cellules quiescentes, sans engendrer une forte oncogénicité [31]. En outre, les lentivirus présentent l'avantage de pouvoir exprimer la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire qui, une fois présente au niveau de l'enveloppe (Figure II-6), permet une transfection de tous les types de cellule [31]. Les rétrovirus sont considérés comme l'un des vecteurs les plus efficaces pour la délivrance d'acides nucléiques. Toutefois, en dépit d'une réaction immunitaire faible engendrée par ces vecteurs, des mécanismes d'intégration génomique peuvent être mis en jeu, induisant des risques de mutagenèse insertionnelle potentiellement cancérogène.

Contrairement aux rétrovirus, les adénovirus sont des virus nus à ADN double-brin (Figure II-6). Ces vecteurs sont dépourvus de pouvoir oncogène et proposent une transduction efficace d'une grande variété de cellules. Néanmoins, ils ne répondent pas au tropisme tissulaire et engendrent ainsi d'importantes réactions immunogènes [49, 50]. Malgré les efforts effectués pour diminuer ces effets indésirables, notamment par la réduction des doses en virus [51], les réponses inflammatoires et la toxicité restent problématiques et limitent l'utilisation de ces vecteurs [49].

Les virus associés aux adénovirus se caractérisent par un génome d'ADN simple brin. Malgré leur efficacité d'internalisation sur de nombreux types cellulaires, ces virus possèdent quelques gènes permettant une intégration au niveau du génome de la cellule ciblée [31]. Comme pour les adénovirus, l'une des restrictions les plus gênantes est la toxicité induite par l'utilisation de ce vecteur.

Jin *et al.* ont démontré l'efficacité de délivrance de siARN par des vecteurs viraux dans une étude sur le rôle de la protéine NF- κ B sur les lésions pulmonaires aiguës induites par sepsis [52]. NF- κ B est un facteur de transcription important impliqué dans la régulation de l'expression des cytokines et des voies d'inflammation associées. Un vecteur rétroviral a permis de transporter le siARN ciblant p65 dans le but d'inhiber l'expression de NF- κ B et d'évaluer l'impact au niveau du phénotype. L'expression de l'ARNm de NF- κ B, et de la protéine elle-même, a été réduite dans les cellules J774A.1 seulement deux heures après l'infection virale [52]. En outre, les niveaux d'expression ont diminué progressivement à mesure que la période d'incubation était prolongée. Ainsi, l'inhibition *in vitro*, permise par la délivrance intracellulaire de siARN, a été évaluée à 60% après 24 heures d'infection [52], démontrant l'efficacité de ce vecteur rétroviral.

2.1.2. Conclusion sur les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont spécialisés dans le transfert de matériel génétique, autorisant ainsi une délivrance efficace des séquences d'acides nucléiques (Tableau II-2). Leur caractère pathogène nécessite cependant d'être bloqué au préalable. Généralement, au regard de leur faculté d'intégration dans le compartiment nucléaire, voire d'insertion génomique, ce type de vecteur est essentiellement utilisé pour la délivrance d'ADN. Néanmoins, la délivrance de siARN par les vecteurs viraux a déjà été décrite dans la littérature [52, 53].

Les limites associées à de tels vecteurs, à savoir les risques d'immunogénicité, d'oncogénicité et de toxicité associée, induisent des difficultés importantes d'utilisation (Tableau II-2). En effet, le transfert clinique est soumis à des restrictions importantes, notamment depuis le décès d'un patient traité par un vecteur viral de type AAV en 2007 [54]. En outre, la production des vecteurs viraux en grande quantité est délicate en raison des risques de biosécurité et de synthèse dans un environnement L3 exclusivement.

	Vecteurs viraux	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Non-dépendants du type cellulaire - Forte infection et forte délivrance de siARN 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Risques immunogènes/oncogènes - Cytotoxicité associée (Adénovirus et AAV) - Limitations pour le transfert clinique - Production et industrialisation 	
Applications possibles		- Cellules difficiles à transfecter
		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - <i>In vivo</i> <i>Transfert clinique limité</i> - <i>In vitro</i> <i>Industrialisation limitée</i>

Tableau II-2. Caractéristiques des vecteurs viraux : Chaque vecteur viral possède des caractéristiques permettant une infection efficace associée à des contraintes limitant leur utilisation.

Ainsi, en dépit d'une efficacité de délivrance élevée des siARN, l'utilisation limitée des vecteurs viraux exige le développement d'outils alternatifs. En ce sens, l'état de l'art décrit différentes familles de vecteurs non-viraux utilisées pour la transfection de siARN : les vecteurs inorganiques, polymériques, peptidiques et lipidiques.

2.2. Les vecteurs synthétiques pour la transfection de siARN

2.2.1. Les nanoparticules pour la transfection

De par leurs propriétés physico-chimiques, les particules synthétiques apparaissent comme une alternative attrayante pour la délivrance intracellulaire de séquences d'acides nucléiques. Longtemps utilisées pour la vectorisation de principe actif *in vivo* [55, 56] ou d'ADN [45], la communauté scientifique se concentre depuis quelques années sur l'intérêt des nanoparticules pour la transfection de siARN (Figure II-7). Ainsi, le nombre de publication concernant la délivrance de siARN à travers l'utilisation de nanoparticules est en croissance constante depuis 2004 (Figure II-7). Au regard de nos recherches, les vecteurs inorganiques (gris) et peptidiques (bleu) semblent représenter les familles de nanoparticule les moins étudiées pour la transfection de siARN, ne dépassant pas les 60 publications par an sur ce sujet. Au contraire, les nanoparticules lipidiques (beige) et surtout polymériques (rouge) semblent être au cœur de l'attention, en atteste le nombre important, et croissant, de publication les concernant sur ce sujet (Figure II-7).

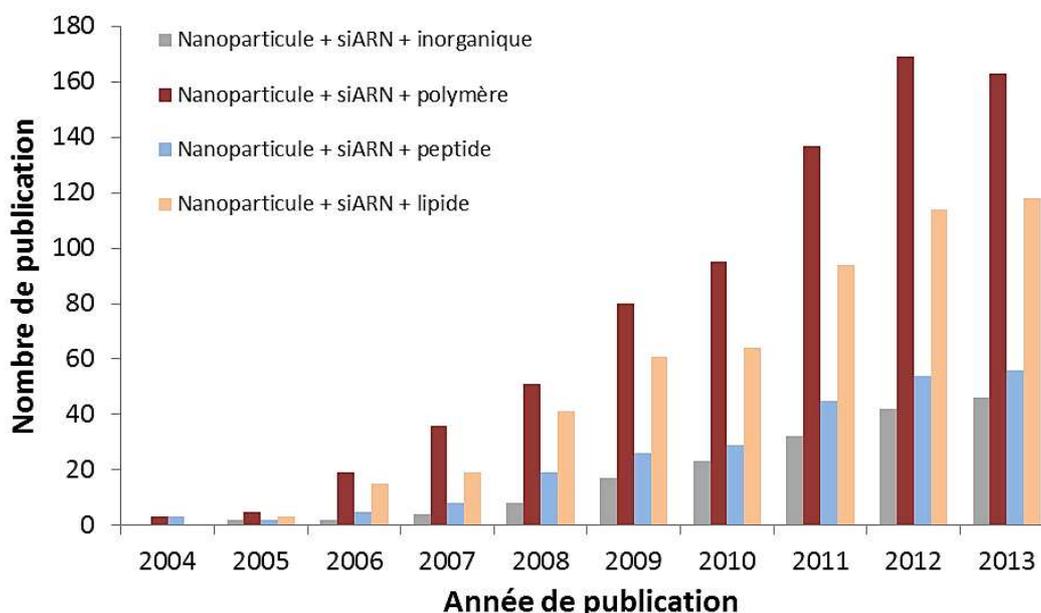


Figure II-7. Intérêt porté sur les nanoparticules pour la transfection de siARN : Évaluation du nombre de publication se rapportant à l'utilisation de particules non-virales pour la transfection de siARN. D'après des recherches, par mots-clés, effectuées sur Scopus en juin 2014.

Chaque famille de particule présente des caractéristiques lui étant propres et déterminant les applications dans lesquelles elles sont utilisées de manière privilégiée [57]. Ainsi, les propriétés physico-chimiques, la taille, la charge et les autres propriétés de surface sont dictées par les types, les structures et les orientations des matériaux qui composent la nanoparticule. Chaque élément doit être pris en considération lors de la conception afin d'optimiser les effets obtenus.

En ce sens, la maîtrise des propriétés de surface est déterminante, notamment en termes de polarité. En effet, il apparaît que la polarité influence considérablement l'interaction de la particule avec la membrane plasmique et les protéines sériques également chargées négativement. Ainsi, une particule présentant des charges positives facilite non seulement l'internalisation par association avec la membrane de la cellule [58], mais également l'association avec les siARN également chargés négativement. Des charges positives permettent également la déstabilisation de l'endosome par « appariement ionique » et/ou « effet pompe à proton » [59] (voir Chapitre I). En revanche, ces charges apportent une limite avec une fixation plus importante aux protéines sériques pouvant entraîner une diminution de l'efficacité de transfection [27]. Ces propriétés de surface peuvent être optimisées par insertion de certains composés sur la particule. En particulier, l'usage de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) conjuguées aux particules, quel que soit leur type, est devenu une stratégie majeure dans la conception des nanoparticules [60]. Le PEG est un polymère neutre et biocompatible dont la longueur de chaîne influence les propriétés de stabilisation et de protection des particules dans lesquelles il est intégré [27]. Cette caractéristique est probablement associée à la grande flexibilité de ces chaînes polymériques leur conférant un nombre important de configurations possibles ; ainsi, l'encombrement stérique à la surface des particules apparaît plus efficace, autorisant notamment une augmentation des temps de circulation des particules *in vivo* [61-63]. Plus particulièrement, tandis que les chaînes PEG possédant 14 carbones, contenues dans les nanoémulsions de type LNP, ont un taux de désorption de 45% par heure, les PEG possédant des chaînes de 16 et 18 carbones ont respectivement des taux de désorption de 1,3% et 0,2% par heure [64]. Ces caractéristiques se traduisent par des temps de demi-vie allant jusqu'à 3,7 heures pour les nanoparticules LNP contenant 1,5% de PEG-C18 alors qu'ils n'étaient que de 35 minutes avec la même quantité de PEG-C14 [64]. Ainsi, l'utilisation de PEG contenant des chaînes à 18 carbones semble être à privilégier pour améliorer les caractéristiques des nanoparticules. Cependant, cet encombrement peut également interférer dans les mécanismes d'internalisation de la particule en réduisant les interactions entre les charges cationiques potentielles de la particule et les phospholipides de la membrane.

L'utilisation de vecteurs pour la délivrance de siARN exige des caractéristiques essentielles afin de transporter efficacement les acides nucléiques, de les protéger des diverses sources de dégradation, de

faciliter leur passage à travers la membrane plasmique et favoriser leur délivrance cytoplasmique (voir chapitre I). Dans cette partie, nous allons faire l'état de l'art des différentes familles de vecteurs pour la transfection de siARN en mettant en évidence leurs avantages et leurs inconvénients au regard des applications envisagées.

2.2.2. Les classes de vecteurs synthétiques non-lipidiques

2.2.2.1. Les vecteurs inorganiques

Cette classe de nanoparticules s'appuie généralement sur des structures métalliques nécessitant un revêtement de surface afin de permettre la complexation des siARN chargés négativement (Figure II-8). Les noyaux de ces particules peuvent être construits à partir de fer magnétique, de cobalt, d'argent ou de nickel et subir des traitements de surface afin de leur imposer des fonctions chimiques (amine, carboxyl, alkyne, ...). Un siARN peut être associé directement à ce cœur solide par une conjugaison sur un pont disulfure ou une liaison biotine-streptavidine [65, 66]. De manière plus fréquente, des polymères ou des lipides cationiques en surface des particules inorganiques favorisent la liaison avec les siARN [67] (Figure II-8).

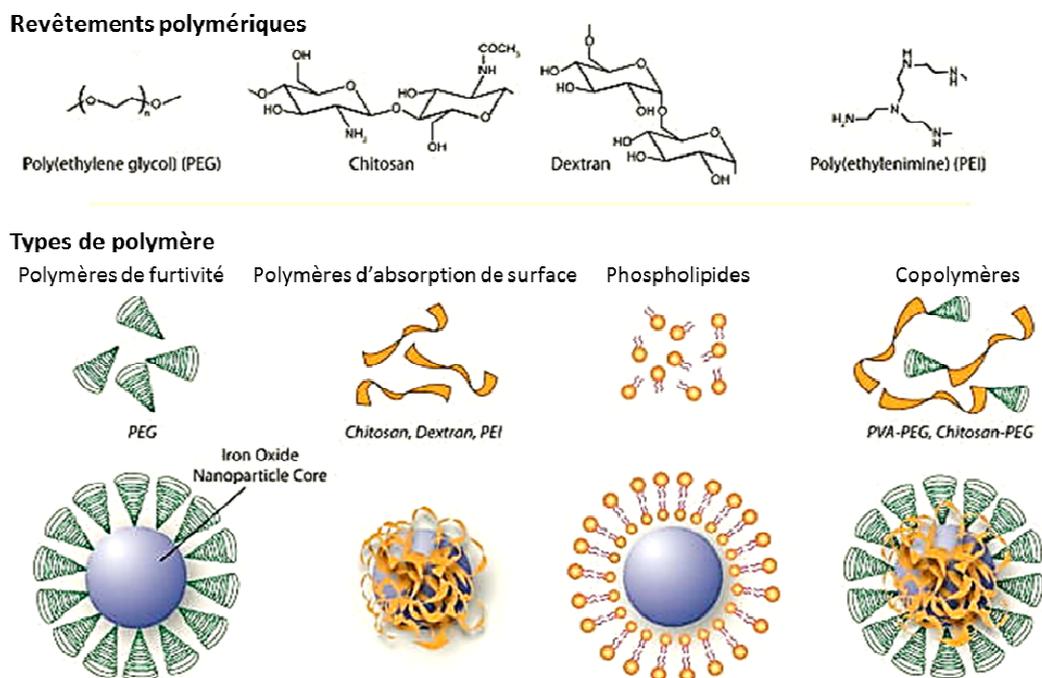


Figure II-8. Revêtement de surface des particules inorganiques : différentes molécules peuvent être associées aux particules métalliques afin d'améliorer leurs propriétés de furtivité, solubilité et leur association avec les siARN (d'après Veiseh, 2010 [68]).

L'avantage majeur de ce type de vecteur concerne les propriétés magnétiques autorisant la visualisation de leur distribution par IRM (ou Imagerie par résonance magnétique) ou la manipulation pour le ciblage spécifique de certains tissus [67]. Par ce procédé, un grand nombre d'étude s'appuie sur l'utilisation de quantum dots, des nanocristaux de matériaux semi-conducteurs de faibles dimensions, dont l'auto-fluorescence permet une visualisation rapide en imagerie cellulaire [69]. Le couplage de cette technologie avec les molécules existantes pour la transfection peuvent permettre d'optimiser la solubilité (par la présence de phospholipides [70]), l'internalisation (par des peptides de type CPP [71]) ou l'échappement endosomal (par des polymères ou des lipides adaptés [71, 72, 73]).

D'ailleurs, une étude de Qi *et al.* démontre l'utilisation de quantum dot (QD), greffés avec des polymères de type polyéthylène imine (PEI), pour la transfection de siARN dans le but d'inhiber JAM-2, une protéine d'adhésion préférentiellement surexprimée dans les gliomes [74]. L'utilisation d'une concentration de 7,5 nM de ce QD modifié, associé à une concentration de 15 nM en siARN, permet une inhibition de 89% de l'ARNm de JAM-2 sur des cellules de gliomes U251, démontrant une efficacité élevée de ce vecteur [74]. En effet, ces concentrations en siARN sont celles utilisées couramment en laboratoire, démontrant la compétitivité de ce vecteur pour des applications *in vitro*.

En dépit d'une certaine efficacité rapportée, ce type de vecteur ne représente pas actuellement l'alternative intéressante aux lipides, polymères et peptides dont l'innocuité et l'efficacité sont mieux documentés. En effet, ces vecteurs restent peu adaptés aux applications *in vivo*, où ils ne sont pas métabolisés et mal excrétés par le corps [75], et *in vitro* où les risques toxicologiques dus à la teneur en métaux lourds de la plupart de ces vecteurs les rendent peu adaptés [76]. En outre, le grand rapport surface-volume et l'énergie de surface élevée de ces particules provoquent une tendance à l'agrégation afin de minimiser les énergies de surface. De plus, les nanoparticules d'oxyde de fer nues ont une activité chimique élevée et sont facilement oxydés dans l'air (surtout la magnétite), se traduisant généralement par une perte de magnétisme et de la dispersion. Par conséquent, le revêtement de surface apparaît primordial afin d'améliorer ces caractéristiques, notamment en termes de stabilité des particules. Par ailleurs, le couplage de ces vecteurs avec des molécules cationiques (polymères, lipides) est essentiel pour permettre la complexation avec les courtes séquences d'acides nucléiques. Cependant, les applications possibles dans le domaine de l'imagerie apportent un intérêt croissant pour une délivrance mieux comprise et mieux contrôlée.

2.2.2.2. Les vecteurs polymériques

Les nanoparticules polymériques sont des systèmes colloïdaux solides et biodégradables qui ont largement été étudiés pour le transport de gènes, notamment pour les siARN (Figure II-7). La grande majorité des stratégies emploie des polymères fortement cationiques pouvant établir des liaisons électrostatiques avec les acides nucléiques pour former des polyplexes. Ils sont généralement classés en trois catégories :

- Les polymères synthétiques qui comptent la polyéthylèneimine (PEI) et les dendrimères ;
- Les polymères naturels parmi lesquels le cyclodextrine et le chitosane ;
- Les polymères non-cationiques tels que le poly(d,l-lactide-co-glycolide) (ou PLGA) et les poly-conjugués dynamiques.

Les polymères synthétiques cationiques

Les polyéthylèneimines font partie des polymères synthétiques les plus connus et les plus utilisés pour la transfection de siARN. Les PEI sont formés à partir d'un réseau hautement ramifié d'éthylène-imines contenant une forte proportion de charges cationiques. L'enchevêtrement des polymères forme un réseau matriciel nanosphérique dans lequel les siARN s'insèrent par des liaisons électrostatiques (Figure II-9). Les études utilisant le PEI comme vecteur de siARN montrent des transfections très efficaces en favorisant l'endocytose *in vitro* et *in vivo* [77, 78]. Comme de nombreux vecteurs polymériques, les PEI ont la particularité de déclencher l'effet « pompe à proton », permettant de favoriser l'échappement endosomal (voir chapitre I), en raison d'une importante quantité de charge positive.

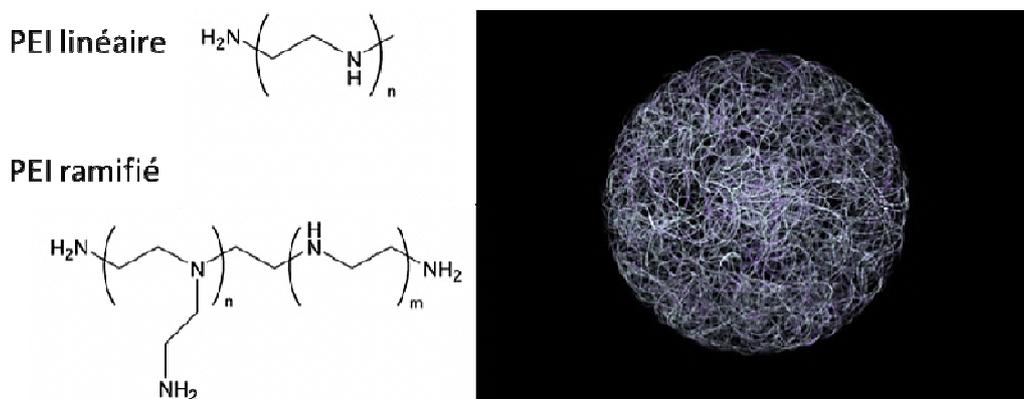


Figure II-9. Les nanosphères de PEI : les PEI s'organisent en « pelote » formant une sphère où peuvent venir s'insérer les siARN (Image issue du CNRS : <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/accueil.htm>).

En outre, un facteur supplémentaire peut intervenir afin de rompre les membranes de l'endosome : l'effet parapluie (Figure II-10). Alors que l'effet pompe à proton permet l'acidification de la vésicule, les groupements amines du polymère, alors protonés, sont électrostatiquement repoussés les uns des autres. Le volume occupé va ainsi être élargi contribuant, en complément de l'entrée d'eau, à la rupture de la vésicule endosomale.

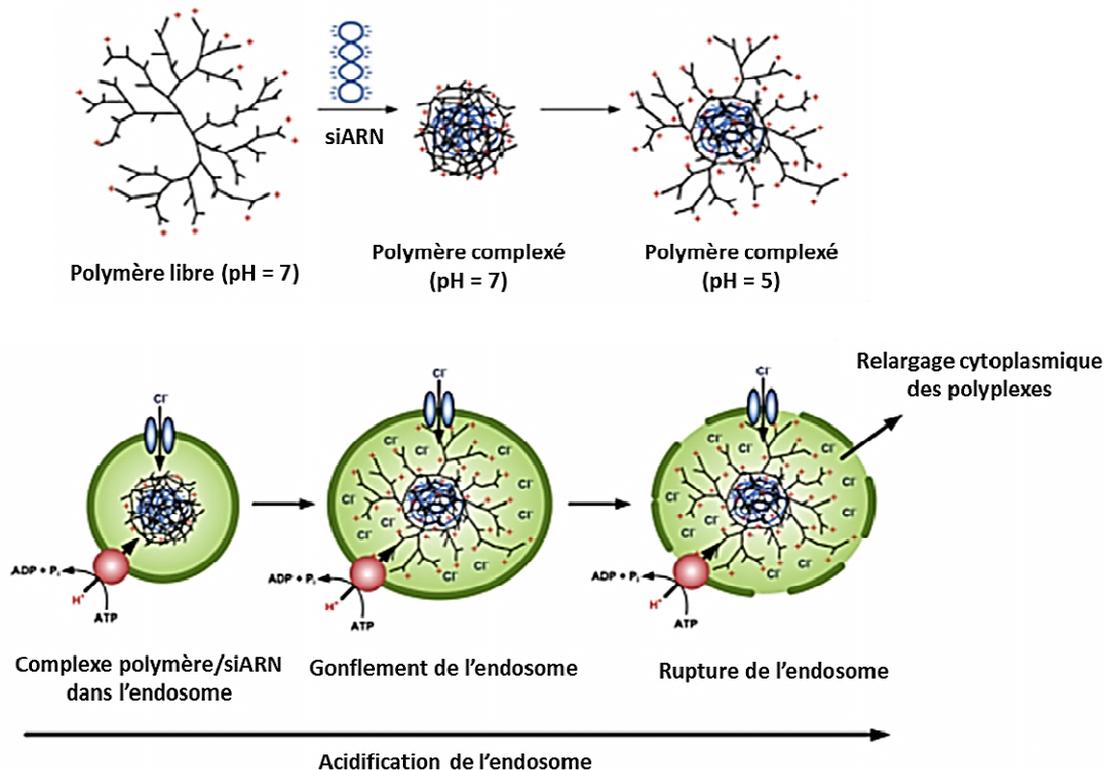


Figure II-10. Représentation de l'effet « parapluie » induit par l'étalement du polymère : Les polymères se condensent suite à la complexation avec des acides nucléiques. L'acidification du compartiment endosomal entraîne une décondensation de ce polymère, qui gonfle la vésicule jusqu'à la rupture (d'après Nguyen et Szoka, 2012 [79]).

En plus de l'effet pompe à proton important, les polymères de PEI permettent une protection des siARN, vis-à-vis des nucléases notamment, augmentant ainsi leur temps de demi-vie [71]. Ainsi, Urban-Klein *et al.* ont délivré *in vivo* des siARN ciblant l'expression du gène HER-2, une protéine surexprimée dans de nombreux cancers humains et généralement associée à un pronostic défavorable et à un comportement malin plus agressif des tumeurs [71]. L'injection intra-péritonéale, deux à trois fois par semaine, de 0,6 nmole de siARN complexés au vecteur PEI permet une réduction majeure de la taille du xénogreffe de tumeur. En effet, alors que le contrôle démontre des tailles de tumeur allant jusqu'à 130 mm², l'inhibition induite par la délivrance du siARN maintient la taille à 30 mm².

Cependant, le PEI est associé à des problèmes significatifs de toxicité limitant leur utilisation *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de ce polymère peuvent être expliqués par des dommages au niveau de la membrane cellulaire et par l'activation d'un programme apoptotique. En effet, le PEI semble induire la formation de canaux dans la membrane mitochondriale externe déclenchant le mécanisme d'apoptose [80, 81]. Par exemple, Moghimi *et al.* ont démontré que des polymères PEI branchés de 25 kDa provoquent un relargage massif de lactate déshydrogénase, jusqu'à 80%, après seulement deux heures d'incubation sur des cellules Jurkat [80]. L'induction d'une cytotoxicité élevée a ainsi été rapportée sur des cellules d'hépatocyte THLE-3 et des cellules primaires HUVEC [80]. Des stratégies existent pour améliorer ce paramètre ; ainsi, l'association avec des polymères de type PEG a été décrit comme pouvant améliorer la viabilité cellulaire jusqu'à 40% [82].

Les dendrimères représentent une seconde famille de polymère synthétique régulièrement décrite dans la littérature. Ces particules sont des polymères hautement ramifiés centrés autour de cavités centrales d'environ 100 nm pouvant accueillir diverses molécules hydrophiles, et en particulier les siARN, les protégeant ainsi contre la dégradation dans le sérum [83] (Figure II-11). Compte tenu de la grande densité de charges positives sur leur surface, les dendrimères peuvent également transporter les siARN en créant des liaisons électrostatiques [84, 85]. Les dendrimères cationiques tels que la poly-amidoamine (ou PAMAM) sont les plus particulièrement étudiés pour la délivrance des siARN en raison de la facilité de synthèse et de leur disponibilité commerciale. Différentes études ont montré leur efficacité pour induire l'ARN interférence grâce à une transfection efficace des siARN [88, 89]. Ainsi, l'utilisation de PAMAM, modifié chimiquement pour cibler spécifiquement les cellules A2780, pour la délivrance de siARN a permis l'inhibition de 60% de l'expression de la protéine BCL2 [89]. Cependant, dans cette étude de Patil *et al.*, les siARN sont utilisés à une concentration élevée de 1 μ M, démontrant la nécessité d'améliorer ces formulations pour tester des concentrations en siARN plus faibles [89].

Cependant, tout comme le PEI, le polymère PAMAM démontre des risques de cytotoxicité principalement dus à leurs charges de surface, provoquant l'apoptose par un dysfonctionnement mitochondrial et réduisant ainsi les possibilités d'adaptation des concentrations en fonction de la toxicité et de l'efficacité [88]. Ainsi, en dépit d'une efficacité décrite pour la transfection de siARN, les polymères synthétiques semblent engendrer des risques de cytotoxicité limitant leur utilisation. Des stratégies visant à améliorer la viabilité cellulaire sont nécessaires [82, 89].

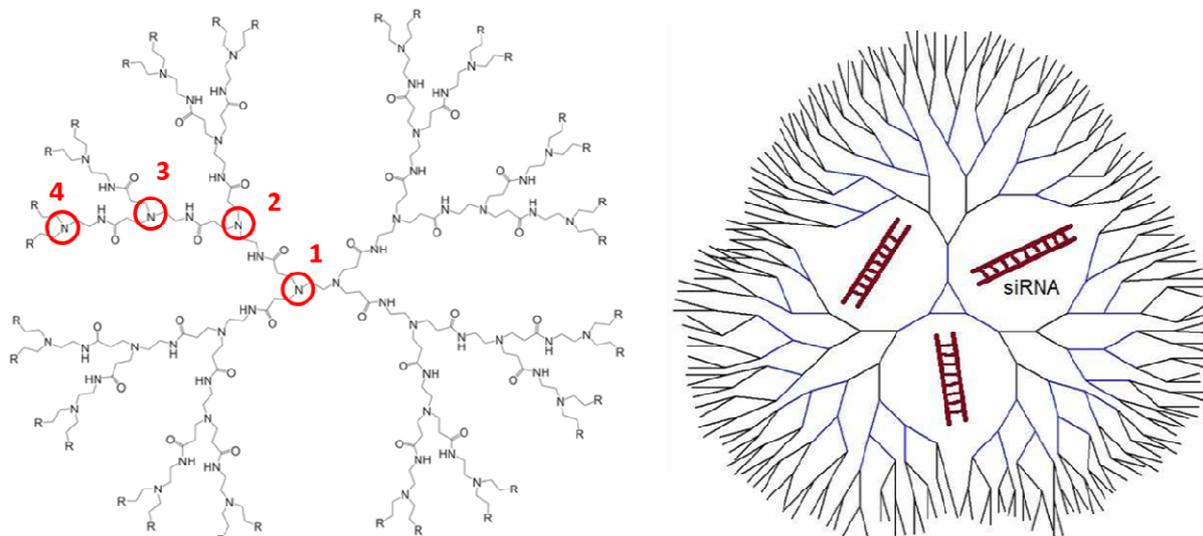


Figure II-11. Structure d'un dendrimère de type PAMAM : les ramifications, numérotées de 1 à 4, permettent de définir des cavités hydrophiles où peuvent être encapsulés les siARN.

Les polymères naturels cationiques

Une alternative à la cytotoxicité importante induite par les polymères synthétiques est ouverte avec l'utilisation des polymères naturels. Dans la littérature, la cyclodextrine et, surtout, le chitosane sont principalement décrits pour la délivrance de siARN.

Les cyclodextrines sont des polymères naturels générés au cours de la digestion de la cellulose bactérienne. Elles possèdent des structures en « tube creux » (Figure II-12) avec une cavité en leur centre mesurant de 0,45 à 0,85 nm de diamètre. Cette cavité possède un environnement carboné hydrophobe tandis que l'extérieur du « tube » présente des groupements hydroxyles autorisant une grande solubilité en milieu aqueux. Cette cavité apolaire provoque la formation de complexes d'inclusion avec une grande variété de molécules hydrophobes. De plus, chaque molécule de cyclodextrine peut contenir du PEG lié de manière covalente permettant d'assurer la stabilité de la particule [90]. Malgré sa géométrie et ses caractéristiques structurales intéressantes, ce polymère a une interaction limitée avec les acides nucléiques et nécessite une association avec un autre motif cationique.

Des études décrivent d'ailleurs l'utilisation de polymères polycationiques contenant de la cyclodextrine, des molécules PEG ainsi que de la transferrine utilisée comme ligand de ciblage pour la liaison aux récepteurs surexprimés sur les cellules cancéreuses [91]. La structure de base correspond à un polymère cationique enveloppant les siARN et dans lequel ont été intégrées des molécules de cyclodextrine, l'ensemble formant une particule colloïdale stable de 50 nm de diamètre [91].

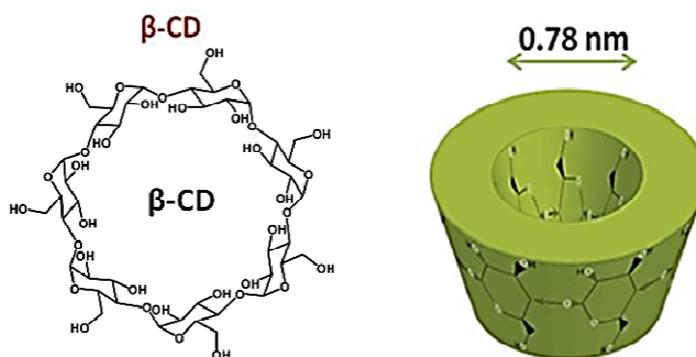


Figure II-12. Structure de la cyclodextrine : les ramifications permettent de définir des cavités hydrophiles où peuvent être encapsulés les siARN.

Notamment, l'inhibition du gène EWS-FLI1 sur les cellules TC71 a été décrite, suite à l'internalisation de siARN avec des cyclodextrines modifiées pour présenter une nature polycationique [91]. En effet, une incubation de 48 heures avec une concentration de 100 nmol/L de vecteur autorise une inhibition de 59% du gène ciblée [91]. Les mêmes expériences effectuées *in vivo* sur des souris C57BL/6 n'engendrent aucune expression des enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase), témoignant d'une innocuité intéressante de ce vecteur [91]. Ce polymère s'avère donc être une alternative intéressante pour la transfection de siARN, mais nécessite un couplage avec une autre molécule cationique.

Enfin, l'utilisation de chitosane est régulièrement décrite pour la transfection de séquences d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo* [92-94]. Ce polysaccharide d'origine naturelle est composé de N-acétyl-D-glucosamines et de D-glucosamines distribués de manière aléatoire (Figure II-13). Globalement, un polymère de chitosane consiste en une nanoparticule sans forme définie ou stable. Les chitosanes sont hydrophiles et leur nature polycationique facilite leur adhérence aux membranes cellulaires. En outre, ces vecteurs présentent les avantages d'être biocompatible, biodégradable et de permettre une production à faible coût. Les particules formulées à partir de ce polymère ont permis notamment l'inhibition de l'expression de la protéine de fluorescence verte GFP surexprimée dans les poumons de souris [94]. Dans cette étude décrite par Howard *et al.*, une concentration de 1 mg/mL de siARN, complexé au polymère chitosane à un ratio N/P de 6/1, a été administrée chaque jour à une souris de manière intranasale. Après cinq jours, le nombre de cellule épithéliale exprimant la GFP au niveau des bronchioles a été réduit de 43%, sans toxicité associée [94].

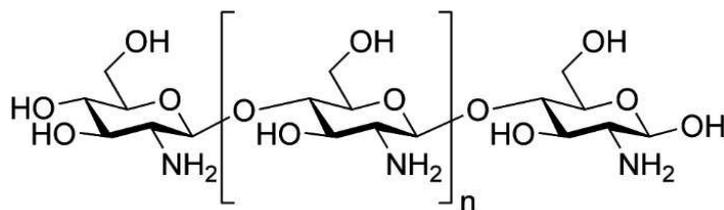


Figure II-13. Structure du chitosane : ce polymère cationique linéaire est composé d'un enchainement de glucosamine.

Cependant, le chitosane démontre un échappement endosomal limité dû à une capacité de tamponnage parfois insuffisante pour l'endosomolyse nécessaire à la délivrance cytoplasmique [78]. Cet effet peut être induit par une limitation de la solubilité du chitosane ; en effet, ce polymère ne permet une solubilisation que dans des solutions aqueuses acides en dessous d'un pH de 6,5. De plus, la sélection du chitosane reste un facteur déterminant, un poids moléculaire trop élevé de ces polymères étant couramment associé à une cytotoxicité [79].

Ainsi, les vecteurs polymériques naturels autorisent une transfection de siARN efficace en maintenant une innocuité importante. Néanmoins, l'obtention de lots reproductibles est difficile entraînant des variabilités possibles au niveau des caractérisations et des résultats.

Les polymères non-cationiques

D'autres travaux s'appuient sur l'utilisation de polymères ayant la caractéristique d'être non-chargés positivement. Nous pouvons notamment citer l'utilisation de PLGA et des poly-conjugués dynamiques. Le PLGA (ou *poly(lactic-co-glycolic acid)*) est un copolymère biodégradable d'acide glycolique et d'acide lactique (Figure II-14). Ce vecteur a surtout été utilisé pour la délivrance d'ADN plasmidique et de siARN ces dernières années. Ces polymères forment des émulsions avec les siARN afin de les transporter par un englobement physique dans des nanosphères. Ainsi, le PLGA démontre plusieurs avantages majeurs pour la transfection d'acides nucléiques, à savoir une grande stabilité, une absorption cellulaire facilitée par endocytose, une capacité intéressante à cibler des tissus ou des organes spécifiques par adsorption ou liaison à un ligand, une biodégradabilité ainsi qu'une faible toxicité [96].

Cependant, ces copolymères non-cationiques présentent une interaction électrostatique faible avec les siARN et sont moins efficaces dans l'échappement endosomal et la libération de siARN [96, 97]. Pour pallier ce problème, la complémentarité avec d'autres groupements peut être envisagée, notamment avec des molécules portant des charges cationiques telles que le DOTAP, le PEI ou les polyamines [78]. Jeon *et al.* ont ainsi associé des particules PLGA avec des polymères PEI pour l'inhibition du gène Cbfa-1 chez des

cellules hMSC [98]. Ainsi, une inhibition majeure de l'ARNm de Cbfa-1 est observée 24 heures après incubation du complexe polymérique [98].

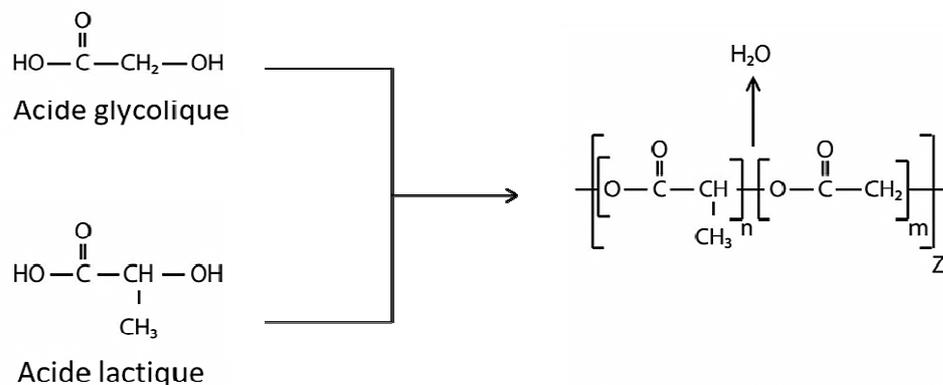


Figure II-14. Structure du PLGA : Le PLGA est une association de deux groupements, l'acide glycolique et l'acide lactique.

Les poly-conjugués dynamiques représentent un autre type de vecteur polymérique non-cationique. Ces polymères sont un mélange de différentes molécules apportant chacune une spécificité particulière [99] : des polymères amphiphiles, des groupements d'un anhydride maléique, des polymères PEG et des ligands de ciblage. Les polymères amphiphiles, comprenant des groupements amines, favorisent l'échappement endosomal tandis que les polymères PEG assurent la furtivité et la protection des siARN. Les différentes molécules sont reliées par les groupements de l'anhydride maléique qui, en milieu acide, perdent leur stabilité et se rompent.

Ainsi, après reconnaissance spécifique du ligand par la cellule ciblée, la particule est internalisée par endocytose. La différenciation lysosomale entraîne alors une diminution du pH et une acidification de l'environnement (voir chapitre I) entraînant la rupture des liaisons maléamates. Les différentes parties de la molécule se séparant, les groupements amines sont découverts et permettent la lyse de l'endosome et la libération du siARN dans le cytoplasme (Figure II-15) [99]. Néanmoins, la synthèse de ce type de particule est complexe et donc plus coûteuse que d'autres vecteurs disponibles commercialement.

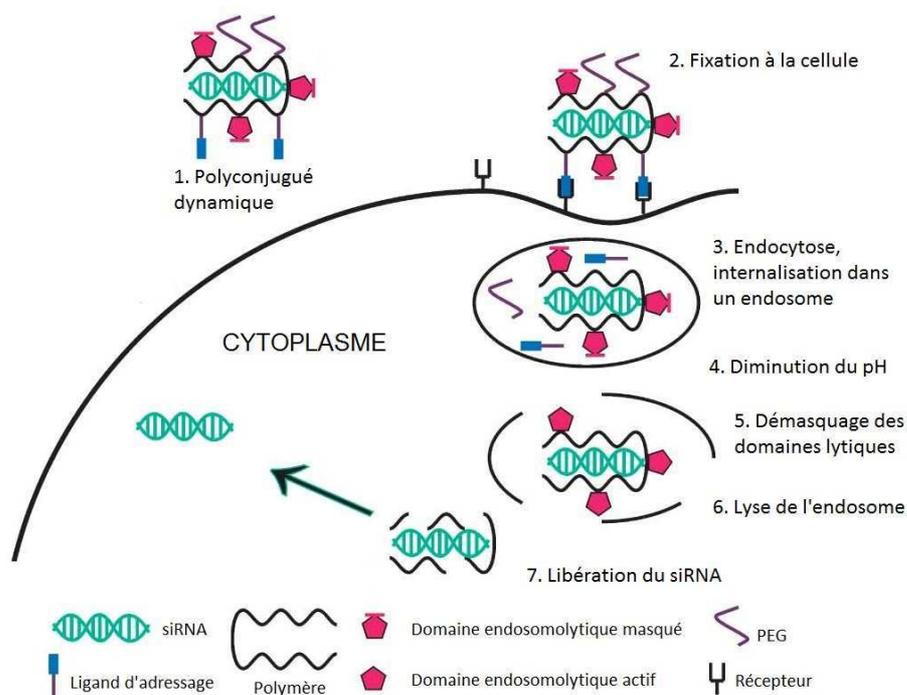


Figure II-15. Fonctionnement des poly-conjugués dynamiques : la nanoparticule se désassemble de manière séquentielle et contrôlée en fonction des propriétés chimiques de l'environnement, libérant au final le siARN dans le cytoplasme de la cellule.

En résumé, les vecteurs polymériques se séparent en trois classes, chacune présentant des avantages et des limites (Tableau II-3). Les vecteurs synthétiques se démontrent très efficaces pour la complexation de siARN par une condensation des polymères avec les acides nucléiques. Par ailleurs, l'efficacité de transfection de siARN se montre régulièrement élevée, notamment grâce à un échappement endosomal facilité. En revanche, la toxicité induite par leur utilisation limite leur utilisation. Ainsi, une alternative, par association avec d'autres groupements, nécessite d'être développée pour utiliser ce type de vecteur.

À l'inverse, les polymères naturels semblent globalement apporter moins de cytotoxicité mais possèdent un pouvoir tampon en-deçà des capacités nécessaires à la fuite de l'endosome. Sans cette étape, les siARN se voient majoritairement dégradés sans avoir eu l'occasion d'exercer leur action. De plus, la reproductibilité lors de la formulation de ce type de particule semble limitée, entraînant des variations possibles dans les résultats.

Par ailleurs, le manque de contrôle sur les caractéristiques physico-chimiques du réseau matriciel formé par les polymères (PEI, chitosane,...) peut accroître la difficulté de contrôler certains aspects importants de la transfection. Une taille non-définie, une structure dont peuvent s'échapper certains composants, relarguant ainsi des siARN, sont des aspects pouvant altérer l'efficacité de transfection ou apporter des effets secondaires indésirables.

Classe de polymère	Type de polymère	Avantages	Inconvénients
Polymères synthétiques	<i>PEI</i> <i>Dendrimère (PAMAM)</i>	- Efficacité de transfection - Échappement endosomal favorisé	- Forte toxicité
Polymères naturels	<i>Cyclodextrine</i> <i>Chitosan</i>	- Biodégradabilité - Absence de toxicité - Faible coût de production	- Difficulté d'avoir des lots reproductibles - Faible pouvoir tampon <i>Chitosan</i> - Faible associations aux siAR <i>Cyclodextrine</i>
Polymères non-cationiques	PLGA Poly-conjugué dynamique	- Faible toxicité - Internalisation facilitée	- Complexité de production/ coût <i>Polyconjugé dynamique</i> - Échappement endosomal limité <i>PLGA</i>

Tableau II-3. Comparaison entre les différents vecteurs polymériques : Les polymères montrent d'importantes efficacités de transfection pour les siARN mais les limites importantes nécessitent une optimisation de leur formulation.

2.2.2.3. Les vecteurs peptidiques

Les peptides présentent des capacités de polymorphisme intéressantes : ils ont une faible stabilité intrinsèque permettant de modifier leur conformation afin de s'adapter aux conditions externes [100, 101]. Avec leur importante surface accessible et leur forte énergie d'interaction, les peptides peuvent se lier à une molécule avec une meilleure sélectivité que la plupart des autres familles de molécule. De plus, leur polymorphisme leur confère la possibilité de diminuer leur affinité pour la molécule qu'ils transportent par réorganisation en conformation tridimensionnelle, permettant un relargage facilité de la molécule d'intérêt [100, 101]. Comme décrit précédemment (voir 1.2.2.3. Groupements peptidiques), les peptides peuvent être associés avec les siARN par des liens covalents pour permettre une transfection efficace [102-104]. Cependant, l'établissement d'une liaison covalente entre le siARN et le peptide exige des taux de siARN mille fois plus importants pour maintenir l'efficacité d'inhibition [105]. La formation de complexes par

l'établissement de liaisons électrostatiques entre les siARN et des peptides cationiques semble être la voie à privilégier. En ce sens, les peptides les plus couramment utilisés pour la transfection de siARN sont les peptides de pénétration cellulaire (CPP).

Les CPP sont de petits peptides de 9 à 35 acides aminés capables d'induire la translocation d'une molécule lui étant associée à travers la membrane plasmique. Ils sont principalement composés d'acides aminés possédant une charge cationique (arginine, lysine et histidine) autorisant des interactions avec les siARN et avec les motifs anioniques présents sur la surface de la membrane plasmique (voie de transport récepteur-indépendant) [106]. Il existe deux voies principales d'internalisation des CPP transportant des siARN selon leurs caractéristiques physico-chimiques qui, toutes deux, sont dépendantes de la liaison aux HSPG (ou *Heparan Sulfate ProteoGlycans*) se trouvant à la surface des cellules [107]. De manière générale, les peptides cationiques empruntent préférentiellement des voies dépendantes de l'endocytose (macropinocytose ou endocytose dépendante des clathrines selon la concentration en peptide utilisée) [108]. À l'inverse, les peptides amphipathiques pourront être internalisés par des voies indépendantes de l'endocytose.

Les CPP cationiques

Les CPP cationiques, tels que Tat ou les oligoarginines, sont riches en arginine. Ces peptides sont les plus fréquemment utilisés en raison de leur efficacité à véhiculer des molécules exogènes à l'intérieur des cellules [109]. Cette efficacité accrue, comparée à la lysine ou à l'histidine, semble dépendre du groupement guanidine formant des liaisons hydrogènes avec différents groupes fonctionnels associés aux molécules de la cellule (phosphates, carboxylates, sulfates). Ainsi, l'affinité des CPP riches en arginine pour la surface cellulaire est augmentée [106]. La neutralisation des charges positives de l'arginine par ces contre-ions non spécifiques entraîne la translocation des CPP à travers la membrane au travers de structures vésiculaires [110] (Figure II-16).

Les polyarginines et Tat ont un mécanisme assez similaire de par leur structure assez proche et la forte densité d'arginine les composant. La polyarginine a déjà été utilisée dans plusieurs publications pour la transfection de siARN. Nous pouvons citer comme exemple Chol-R9, un conjugué oligo-arginine de 9 résidus utilisé pour médier l'inhibition de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [111]. Le VEGF est décrit comme un facteur de croissance associé à l'angiogenèse dans plusieurs maladies cancéreuses ; ainsi, une altération de son expression pourrait inhiber la croissance tumorale et l'établissement de métastases. L'injection intratumorale de complexe Chol-R9/siARN ciblant VEGF, de manière répétée tous les quatre jours pendant 17 jours, a permis une diminution de la quantité de VEGF

intratumorale de 120 à 50 pg/mg de protéine. Cette réduction de 58%, due à l'apport de 3,5 µg de siARN par souris, a induit une diminution majeure de la vascularisation intratumorale [111]. Par ailleurs, d'autres études sur un peptide chimérique composé de 9 résidus arginine, RVG-9R, ont montré des complexations et des transfections efficaces de siARN sur des cellules neuronales Neuro2A *in vitro* [112].

De même que pour les polyarginines, le peptide Tat, dérivé du transactivateur de transcription du virus HIV, a déjà été utilisé avec succès dans la littérature. En effet, l'exemple de Tat-LK15 [114], qui a permis la transfection fonctionnelle de siARN de manière aussi, voire plus efficace que des agents commerciaux, démontre le potentiel de ce genre de peptide. D'autres peptides ont été décrit de la même manière parmi lesquels la pénétratine, vecteur dérivé d'une protéine de drosophile [115] qui améliore significativement l'internalisation de siARN.

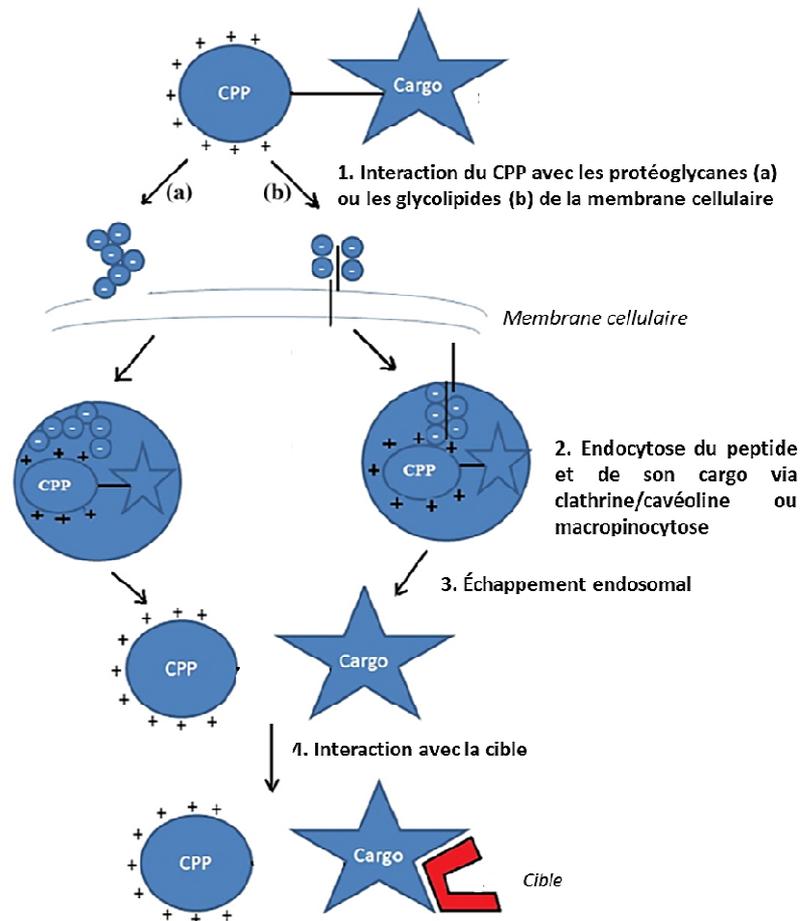


Figure II-16. Mécanisme d'internalisation des peptides cationiques : les CPP se lient de manière non-spécifique aux composants de la membrane cellulaire (protéoglycane en partie) afin d'être internalisés par les voies d'endocytose classique (d'après Bolhassani, 2011 [113]).

Cependant, les limites de ces peptides cationiques concernent l'accessibilité au compartiment cytoplasmique. En effet, ces CPP possèdent une faible propension à s'échapper des vésicules endosomales. Dès lors, les CPP polycationiques, tels que Tat ou la pénétratine, sont régulièrement associés à d'autres molécules favorisant la déstabilisation de la membrane plasmique [114, 115]. De plus, même si ces peptides favorisent l'adsorption cellulaire, il semble toutefois que ce processus manque de spécificité et se montre efficace sur un très grand nombre de types cellulaires différents. Par ailleurs, les concentrations en peptides cationiques doivent être finement maîtrisées : un trop grand nombre de CPP cationiques, et donc de charges positives, peut perturber la membrane plasmique de manière trop importante, voire gêner la délivrance des siARN par une rétention trop forte.

Les CPP amphipathiques

Les peptides amphipathiques, ou amphiphiles, sont des peptides possédant un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe. Ces peptides présentent l'avantage d'être en partie internalisés par un mécanisme indépendant de l'endocytose, à travers une perturbation temporaire de la membrane plasmique (Figure II-18) [116]. Ainsi, le vecteur est directement libéré dans le compartiment cytoplasmique, sans nécessiter de stratégie d'échappement endosomale.

Ces peptides sont caractérisés par des complexations très stables avec les molécules qu'ils transportent, notamment les siARN, et par une interaction forte avec les mono- et les bicouches de phospholipides, principalement à travers des interactions électrostatiques. Par ailleurs, ils présentent un polymorphisme structural marqué : leurs formes sont libres en solution alors qu'ils adoptent une structure secondaire spécifique en feuillet β (c'est le cas pour le peptide amphiphile MPG) ou en hélice α (comme pour les peptides amphiphiles CADY et Pep-1) lors de l'interaction avec des phospholipides [116].

Les étapes d'internalisation des CPP amphipathiques sont dépendantes de la tension et suivent le modèle de Deshayes *et al.* (Figure II-18) [116] : (1) le peptide et le siARN se lient par des liaisons électrostatiques et hydrophobes, induisant un repliement partiel du peptide, pour former le « noyau » du complexe ; (2) les complexes sont stabilisés par des interactions peptide/peptide pour constituer la périphérie de la particule ; (3) les interactions électrostatiques du complexe avec les protéoglycanes de la surface cellulaire (4) initient la liaison avec les phospholipides ; (5) Ensuite, l'insertion dans la membrane cellulaire est autorisée par l'insertion des peptides situés en périphérie du complexe, créant un « pore » temporaire ; (6) enfin, l'insertion des complexes dans la membrane est associée à une transition du potentiel de la membrane et de la conformation du peptide. Ces transitions induisent des perturbations dans la

structure de la membrane, le remodelage du réseau d'actine, et la libération du complexe « cœur » dans le cytoplasme.

Parmi les CPP amphiphiles, trois peptides se démarquent : MPG, CADY et Pep-1. MPG est un peptide primaire dérivé d'une séquence hydrophobe de HIV-1 et d'une séquence de localisation nucléaire hydrophile riche en lysine issue de virus simien, SV40 [117]. Cette partie, riche en lysine, est nécessaire pour l'interaction avec les acides nucléiques et la solubilité du peptide tandis que la partie hydrophobe a un rôle dans la liaison avec la membrane cellulaire et l'internalisation. Dans la littérature, MPG a déjà montré des résultats intéressants *ex vivo* et *in vivo* pour la délivrance de siARN, améliorant l'accessibilité intracytoplasmique sur une large variété de cellules cancéreuses, et ceci sans montrer de cytotoxicité [118]. Ainsi, Crombez *et al.* rapportent une réduction du niveau protéique de la Cycline B1 de 80%, chez les cellules Hela, après 24 heures d'incubation avec le complexe MPG-8/siARN [119]. Cependant, la concentration élevée d'utilisation du siARN, à 100 nM, exige des tests complémentaires afin de prouver une efficacité optimale du vecteur [119].

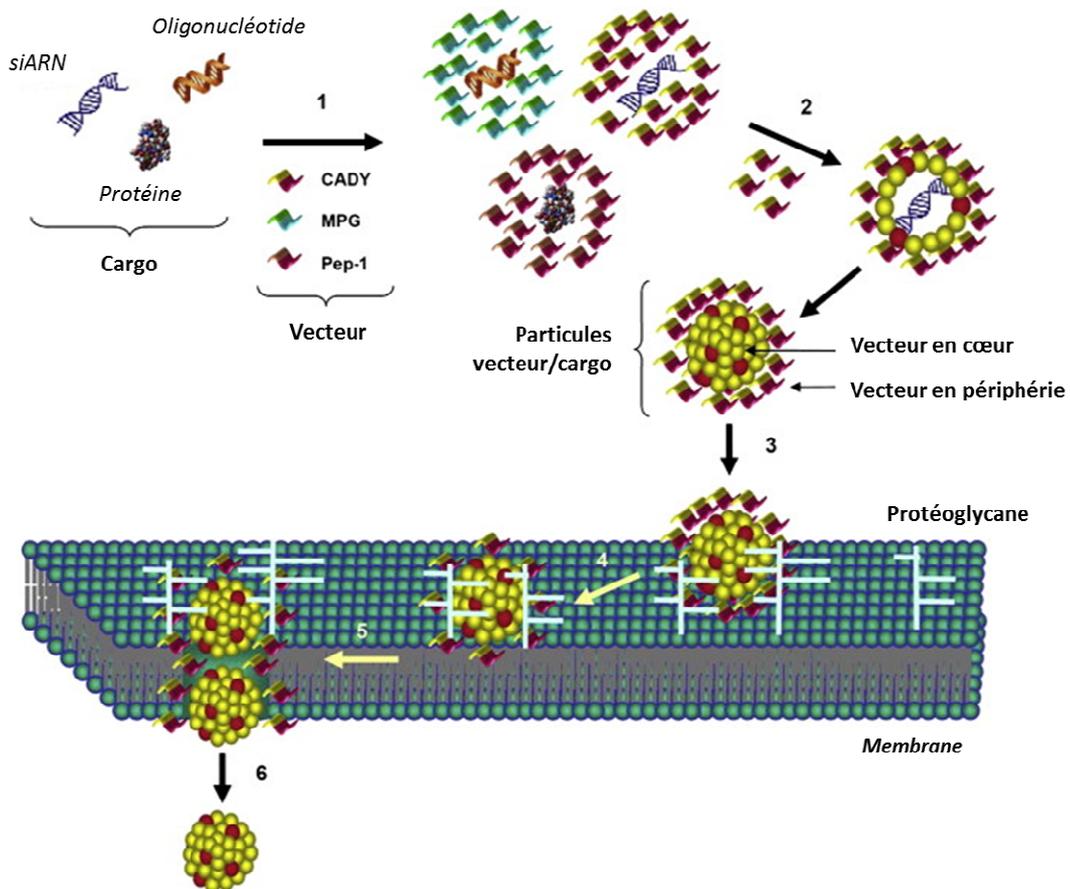


Figure II-18. Mécanisme d'internalisation des peptides amphiphiles : modèle mettant en évidence une structure du complexe peptidique permettant le passage de la membrane plasmique indépendamment des mécanismes d'endocytose (d'après Deshayes, 2010 [116]).

Cependant, il a été remarqué que la transfection de siARN avec les MPG était moins efficace qu'avec l'utilisation d'un agent commercial lipidique [120]. En effet, après 24 heures d'incubation sur des cellules ECV GL3, la quantité intracellulaire est 4 à 6 fois supérieure lors de l'utilisation de Lipofectamine 2000. En outre, la quantité de siARN bio-disponible dans les cellules est environ 30 fois plus faible après transfection par MPG par rapport à l'utilisation de lipides cationiques [120]. Veldhoen *et al.* ont démontré, qu'en dépit d'une partie des CPP amphiphiles suivant le modèle de Deshayes, une grande quantité de peptide était internalisée par les mécanismes d'endocytose [120]. Cependant, ces vecteurs ne possèdent pas les outils nécessaires pour permettre un échappement endosomal efficace et subissent une dégradation lysosomale sans avoir pu atteindre le compartiment cytoplasmique [120].

CADY est un peptide secondaire dérivé du peptide fusogène JTS1 qui adopte une conformation hélicoïdale. La transduction et la stabilité sont assurées par une acétylation en N-terminale et un groupement cystéamine en C-terminale ainsi que par un groupement aromatique. En présence de lipide ou de siARN, CADY adopte une structure secondaire en hélice alpha distribuant les siARN le long de l'hélice de manière stable [121]. Ce CPP forme des complexes stables avec les siARN par l'établissement de liaisons électrostatiques avec les résidus arginines et lysines qui les composent. En outre, CADY permet une transfection efficace des siARN et ne montre aucune cytotoxicité aiguë ou à long terme sur les cellules transfectées quel que soit le rapport molaire appliqué [122]. En effet, après 24 heures d'incubation du complexe CADY/siARN sur des cellules U₂OS, une diminution majeure de la quantité d'ARNm ciblé est observée ; un ratio N/P de 40/1, pour une concentration en siARN de 20 nmol/L, permet une inhibition de 95% de la quantité d'ARNm de GAPDH [122].

Quant à Pep-1, c'est un peptide primaire comprenant un domaine hydrophobe riche en tryptophane dérivé de HIV-1 et, comme MPG, un domaine hydrophile dérivant de SV40. Un groupe cystéine est également présent en partie C-terminale, groupement ayant un rôle crucial dans l'internalisation du cargo. Les parties hydrophiles et hydrophobes sont reliées par un résidu proline permettant de garder la flexibilité et l'intégrité des deux domaines. Ce CPP, contrairement à MPG ou CADY, est plus approprié pour le transport de protéines/peptides et de molécules neutres [118].

Ces peptides s'avèrent être très prometteur pour la délivrance de siARN. Cependant, un équilibre critique est établi entre la stabilité de la particule, la concentration en CPP utilisée et leur capacité à interagir avec les lipides de la membrane. Des changements dans la séquence peptidique, ou l'utilisation d'une

concentration trop importante de CPP amphiphile, peut provoquer une agrégation des complexes et induire l'utilisation d'une voie d'internalisation différente, notamment par les mécanismes d'endocytose [120, 123]. Les CPP amphiphiles n'étant que peu adaptés pour un échappement endosomal, la quantité de siARN bio-disponibles s'en trouve affectée, diminuant ainsi les efficacités de transfection.

Les vecteurs peptidiques ont la capacité de favoriser l'internalisation des siARN dans les cellules. Cependant, ces peptides empruntent préférentiellement les voies d'endocytose, exigeant une stratégie pour accéder au compartiment cytoplasmique. Or, les CPP ne possèdent pas d'activité induisant l'échappement endosomal (voir chapitre I), et nécessitent alors la complémentarité d'une autre molécule exerçant ce rôle.

2.2.2.4. Conclusion sur les vecteurs synthétiques non-lipidiques

Les classes de vecteur rapportées dans ce chapitre possèdent de nombreuses caractéristiques intéressantes pour la transfection de siARN. En effet, pour chaque étape de la transfection, un vecteur peut apporter un bénéfice favorisant la délivrance de siARN (Tableau II-4). La condensation des vecteurs polymériques avec les acides nucléiques permet de protéger les séquences des siARN. L'internalisation peut être facilitée par l'utilisation de peptides de pénétration cellulaire tandis que certains polymères permettent un échappement endosomal important, et ainsi l'accessibilité du compartiment cytoplasmique. Par ailleurs, les propriétés magnétiques des vecteurs inorganiques apportent une multifonctionnalité avec la possibilité de suivre la distribution des particules utilisées.

Cependant, indépendamment, chaque vecteur possède des limites pouvant nuire à une transfection efficace. Ainsi, l'utilisation de polymères, notamment synthétiques, peut être limitée pour des applications cliniques en raison de risques de toxicité importants. De même, le manque de reproductibilité des échantillons, notamment pour les polymères naturels, accentue la difficulté d'utiliser ce type de vecteur dans l'étude de nombreux siARN, par exemple avec du criblage haut-débit. Les vecteurs inorganiques nécessitent une association avec des molécules, polymériques, peptidiques et/ou lipidiques, favorisant la transfection des siARN. En outre, l'utilisation de métaux lourds peut engendrer une certaine toxicité, voire des problèmes de métabolisation lors d'applications *in vivo*. Les peptides, en dépit d'une internalisation facilitée, présentent un échappement endosomal limité nécessitant une association avec des molécules exerçant cette action.

	Vecteurs inorganiques		Vecteurs polymériques		Vecteurs peptidiques	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés magnétiques <i>visualisation, manipulation</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Polymères synthétiques</i> - Absence de toxicité <i>Polymères naturels</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Internalisation facilitée 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Association avec d'autres groupements nécessaire - Pas métabolisés / peu excrétés - Risques toxicologies 		<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité importante <i>Polymères synthétiques</i> - Faible pouvoir tampon / Faible échappement endosomal <i>Polymères naturels</i> - Reproductibilité des lots - Formulation utilisant des solvants 		<ul style="list-style-type: none"> - Faible échappement endosomal 	
Applications possibles		<ul style="list-style-type: none"> - In vivo limitées par l'absence de métabolisation - In vitro limitées par la toxicité possible - HTS 		<ul style="list-style-type: none"> - In vitro limitées par la toxicité - In vivo limitées par la toxicité - HTS limitées par le manque de contrôle 		<ul style="list-style-type: none"> - In vitro limitées par l'efficacité - In vivo limitées par l'efficacité - HTS Limitées par l'efficacité
		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter

Tableau II-4. Comparaison entre les différents vecteurs synthétiques non-lipidique : chaque classe de vecteur possède des caractéristiques pouvant constituer des avantages et des inconvénients pour la transfection de siARN.

À l'heure actuelle, d'après nos estimations et au regard des recherches effectuées chez les principaux fournisseurs, environ 75% des agents commercialisés pour la transfection des siARN ont une

nature lipidique. Cette famille de vecteur semble donc posséder des caractéristiques avantageuses pour l'application de transfection de siARN.

2.2.3. Les vecteurs synthétiques lipidiques

2.2.3.1. Les liposomes neutres

Les vecteurs lipidiques représentent actuellement la famille de particule la plus présente dans le commerce. Les liposomes sont d'ailleurs utilisés comme transporteur pour des applications biologiques et pharmaceutiques depuis de nombreuses années. Ces structures ont été parmi les premières à être étudiées et développées, et sont ainsi les nanoparticules les mieux caractérisées [123]. Ils comportent des lipides faciles à produire et sont parfaitement biocompatibles en raison d'une composition proche de celle des membranes cellulaires. Par ailleurs, leur fabrication est simple, consistant le plus souvent en un simple mélange de lipides avec la molécule à transporter. Les liposomes se présentent sous la forme d'un auto-assemblage sphérique de bicouche lipidique de taille variable, avec un cœur aqueux pouvant transporter des molécules hydrophiles (Figure II-19). La possibilité de greffer des polymères hydrophiles, de type PEG, en surface des particules permet de développer un encombrement stérique améliorant la furtivité de ces particules (Figure II-19) [60, 124]. Les liposomes sont des nanoparticules stables offrant une protection physique aux siARN transportés et se caractérisant par une innocuité importante.

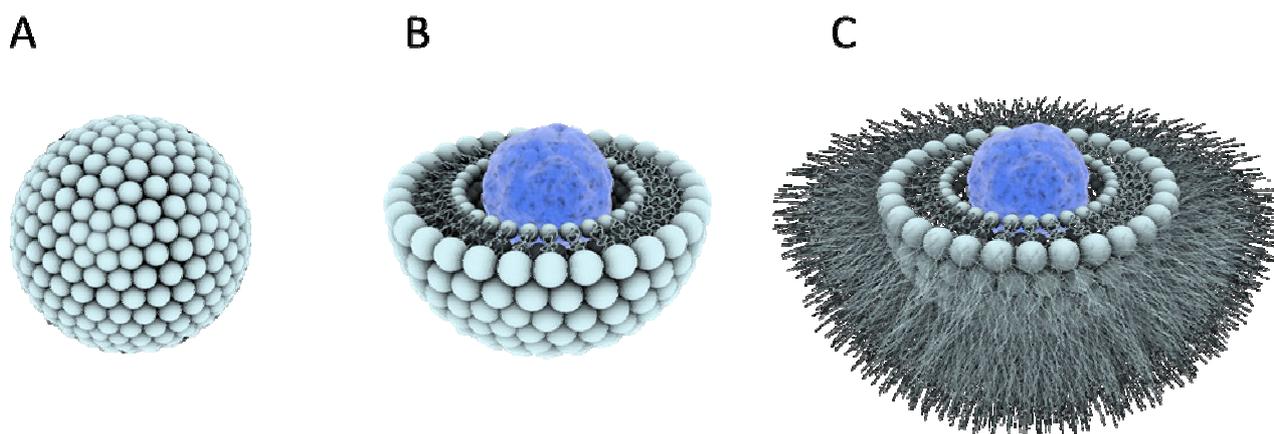


Figure II-19. Représentation tridimensionnelle des liposomes : les liposomes sont un auto-assemblage sphérique (A) de bicouche lipidique délimitant un cœur hydrophile (B). Des liposomes de seconde génération ont été développés avec un revêtement de polyéthylène glycol (C) afin d'améliorer protection et furtivité de la particule (Image issue du CNRS : <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/accueil.htm>).

Dans ce type de structure, les siARN de nature hydrophile ne peuvent se situer que dans le cœur de la particule pour être transporté. Des systèmes de liposome neutre, contenant des siARN ciblant l'expression d'un oncogène EphA2, ont été évalués sur des modèles tumorales orthoptiques de souris développant un cancer ovarien HeyA8 ou SKOV3 [125-127]. Ce système a ainsi pu induire la réduction de tumeurs sur les modèles étudiés après une répétition des doses [125-127]. Cet effet est d'ailleurs plus fort après une co-délivrance d'agent anticancéreux de type Paclitaxel [125-127]. Ce type de formulation est actuellement testé lors d'essais cliniques de phase I afin de définir les doses maximales tolérées chez des patients exprimant des cancers à un stade avancé. Cependant, malgré la démonstration de certains effets biologiques des oligonucléotides transportés par ce vecteur [125-129], le rendement de transfection s'est avéré trop faible, probablement en raison d'un rendement d'encapsulation des siARN non-optimal limitant leur action [123].

Dans ce contexte, une optimisation de la formulation est nécessaire pour augmenter la prise en charge des siARN par les vecteurs lipidiques. Comme décrit à travers les autres classes de vecteur, l'établissement de liaisons électrostatiques, entre les charges négatives des acides nucléiques et les charges positives portées par le vecteur, représente une solution efficace afin de former des lipoplexes et permettre la transfection.

2.2.3.2. Les lipoplexes

Par définition, un lipoplexe représente une complexation entre des lipides cationiques et des séquences d'acides nucléiques. L'un des facteurs majeurs pour l'obtention d'une délivrance de siARN efficace est la composition lipidique de ces vecteurs. Des études visant à identifier un lipide optimal pour ce type d'application ont permis d'améliorer grandement les efficacités de transfection et ainsi diminuer les doses de vecteur utilisées [130].

Les lipides utilisés dans les vecteurs lipidiques, qu'ils soient neutres ou cationiques, possèdent une structure commune malgré leur nature chimique différente : une tête hydrophile (cationique ou non), un espaceur et une partie hydrophobe (Figure II-20). La partie hydrophobe est souvent constituée par une ou deux chaînes d'acides gras ou groupements alkyls de 12 à 18 atomes de carbone. Les acides gras les plus fréquemment utilisés sont les acides oléiques (C18), palmitoléiques (C16) et myristyliques (C14). D'autres molécules telles que le cholestérol ou l'acide biliaire peuvent également occuper ce rôle.



Figure II-20. Représentation de la structure des lipides utilisés pour la formation des liposomes : ces lipides se composent d'une queue hydrophobe et d'une tête hydrophile portant la charge dans le cas des lipides cationiques.

Les lipides zwitterioniques peuvent apporter un pouvoir fusogène et favoriser l'échappement endosomal par appariement ionique (voir chapitre I). Un zwitterion est une espèce chimique moléculaire possédant des charges électriques formelles d'une unité. L'état zwitterionique d'un composé est dépendant du pH. En effet, ces espèces ont tendance à capter ou à céder des ions H^+ selon la valeur du pH de la solution. Le zwitterion est à l'équilibre avec le cation et l'anion correspondant. Ainsi, le 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (ou DOPE) est un exemple couramment utilisé dans la formulation de liposome. Concernant les lipides cationiques, ils permettent la complexation avec les siARN, à l'intérieur ou à l'extérieur de la sphère lipidique, augmentant la stabilité de la construction. De plus, les charges positives peuvent également favoriser l'interaction avec la membrane plasmique et provoquer l'échappement endosomal par l'effet « appariement ionique » (voir chapitre I). L'un des lipides cationiques le plus couramment utilisé dans les lipoplexes est le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane (ou DOTAP) ; il existe néanmoins une très grande variété de lipide utilisables pour cette application (Tableau II-5) [20].

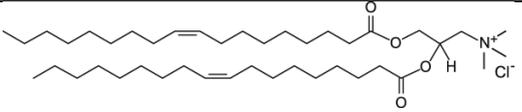
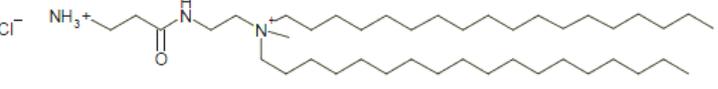
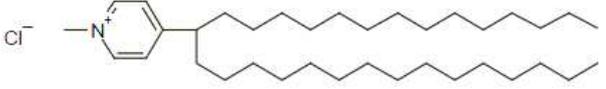
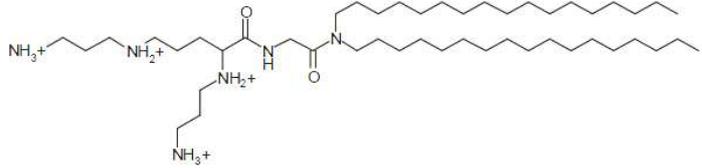
Nature de la tête	Exemple	Structure
Ammonium quaternaire	DOTAP	
Acides aminés	Alanine	
Guanidinium		
Pyridinium	SAINTs	
Polyamines	DOGS	

Tableau II-5. Inventaire des différents lipidiqes cationiques utilisés pour la formation des lipoplexes : Dans ces différentes structures, la charge positive vient de l'atome d'azote au niveau de la tête polaire.

Les liposomes cationiques instables

Les liposomes cationiques peuvent être séparés en deux catégories majeures, selon une application préférentiellement *in vitro* ou *in vivo*.

Pour une application *in vitro*, ces liposomes sont caractérisés par une certaine instabilité et les siARN se présentent à la surface des particules en se complexant aux têtes polaires cationiques [27]. Les lipoplexes formés peuvent alors interagir entre eux créant différentes structures (Figure II-21) : les siARN peuvent être intégrés entre les feuillettes lipidiques (A) et/ou dans le cœur de micelles formées par le réarrangement des lipides (B). Un empilement des feuillettes est possible par alternance des couches lipidiques et séquences d'acides nucléiques (C) [131]. De nombreux types de liposome adoptant ces conformations en présence de siARN sont commercialisés et utilisés en laboratoire comme agent de transfection (Lipofectamine[®], Oligofectamine[®], i-Fect[®],...). De par leur rapport efficacité/toxicité plus avantageux que d'autres familles de particule, les liposomes occupent aujourd'hui la première place parmi les vecteurs synthétiques, avec de nombreux essais cliniques les utilisant et une omniprésence sur le marché pour les applications *in vitro*.

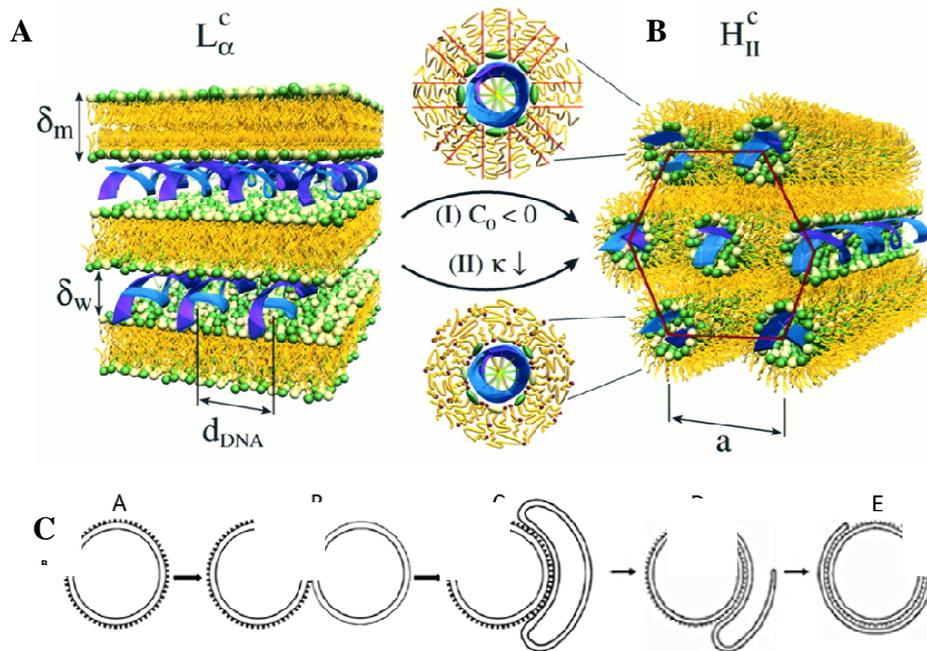


Figure II-21. Le lipoplexe sous forme de feuillet : les acides nucléiques peuvent se disposer entre des feuillettes de bicouche lipidique séparant les têtes polaires de deux couches (A) ou être au cœur de micelle inverse (B). La première possibilité peut permettre une conformation anarchique du lipoplexe ou une superposition de feuillettes autour d'un liposome (C) (d'après Koltover, 1998 [132]).

Le système lipoplexe le plus prometteur pour les essais cliniques est actuellement AtuPlex employé par Silence Therapeutic (Londres, Royaume-Uni). Ce lipoplexe comprend notamment un lipide polycationique AtuFect1 associé à du DOPE et un lipide PEGylé [133, 134]. Le système AtuPlex présente des efficacités d'inhibition fonctionnelle élevée *in vitro*. Cependant, lors d'étude *in vivo* sur des souris, la

délivrance rapide de siARN a été rapportée pour se produire essentiellement dans certains organes (foie, rate, poumons, cœur, pancréas et reins) après seulement cinq minutes post-administration [134]. Dès lors, ce laboratoire a développé un autre lipoplexe, Atu027, dont les tests sur des souris porteuses de tumeurs pancréatiques ou prostatiques orthoptiques ont démontré une inhibition de la croissance tumorale, après des injections répétées [135]. Toutefois, bien que la formation de métastases soit empêchée par ce moyen, l'injection répétée ne démontre aucune diminution du volume de la tumeur primaire [135]. En outre, des tests cliniques de phase I ont rapporté que la dose maximale tolérée sur les patients humains était de 0,336 mg/kg [136], démontrant une certaine toxicité pour les fortes doses et une limitation des concentrations employées.

Afin de rationaliser les formulations lipidiques et de s'émanciper de la synthèse empirique connue avec les liposomes cationiques, une banque de plus de 1200 molécules lipidiques a été élaborée par l'équipe de Langer et Anderson au MIT [137]. Ces molécules sont destinées à la synthèse et à l'utilisation pour le transport de siARN. Cette étude a permis de mettre en évidence une nouvelle famille de molécules apparentées aux lipides : les lipidoïdes (Figure II-22). Ils sont synthétisés par additions successives d'alkyl-acrylates et d'alkyl-amides à longues chaînes carbonées sur des amines primaires ou secondaires. Pour se différencier des lipides cationiques ionisables, les lipidoïdes possèdent un excès de charge positive dû aux multiples groupements amine pouvant être protonés.

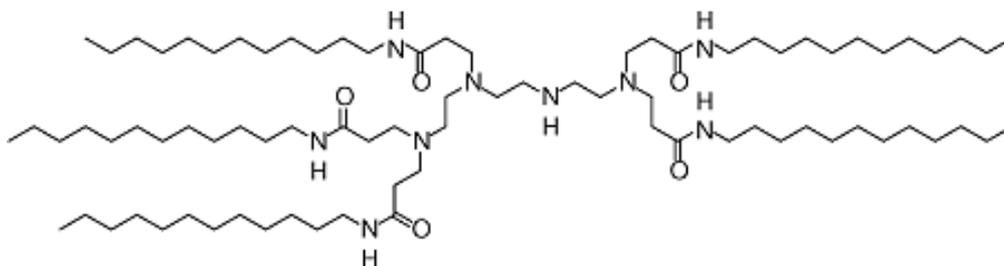


Figure II-22. Formule d'un lipidoïde : le 98N12-5(1) est un lipidoïde donc la formulation a été identifiée comme optimale pour la transfection de siARN *in vivo*. Il comprend cinq chaînes d'alkyl-acrylamide à 12 carbones attachées à un noyau amine.

Les formulations les utilisant comprennent des agglomérats de cette molécule conjuguée à des siARN et ont permis d'induire une extinction efficace et persistante sur différentes cibles hépatiques et pulmonaires chez la souris, le rat et le singe [137, 138]. En effet, Frank *et al.* ont utilisé des doses de 5 mg/kg de lipidoïdes pour transférer des siARN chez des primates non-humains et inhiber l'expression de PCSK9, une protéine impliquée dans une forme héréditaire dominante de l'hypercholestérolémie [138]. Ainsi, les niveaux plasmatiques de PCSK9 ont été diminués de 86%, démontrant une forte efficacité de ce vecteur lors de cette application [138].

Cependant, ce type de lipoplexe est souvent privilégié pour des applications *in vitro*. En effet, pour ce type d'application, une protection optimisée offerte par l'encapsulation des siARN n'est pas nécessaire (voir chapitre I). Une simple complexation post-formulation est suffisante pour permettre la transfection d'ARN interférents. L'utilisation de ce type de particule [139] et des agents de transfection commerciaux vont d'ailleurs dans ce sens et démontrent des efficacités d'inhibition très satisfaisantes [139]. De plus, ce type de particule peut provoquer une association avec les protéines sériques en raison des charges cationiques et entraîner une clairance rapide, voire une toxicité systémique importante. Par ailleurs, ces vecteurs permettent des complexations avec une faible stabilité et une taille excessive [140]. La faible stabilité rend les siARN vulnérables, notamment lors d'applications *in vivo*, et peut induire des variabilités au niveau des efficacités de transfection [140].

Les liposomes cationiques stabilisés : les SNALP

Felgner *et al.* ont été les premiers à montrer l'utilisation de lipides cationiques pour la transfection de séquences d'acides aminés *in vitro* [141]. Cependant, les applications *in vivo* sont fortement limitées par les systèmes de lipoplexe en raison d'une forte toxicité et d'une clairance extrêmement rapide, induisant un temps de circulation court, notamment en raison des charges cationiques et de la taille importante (> 200 nm). Ainsi, pour les applications *in vivo*, des liposomes cationiques plus stables ont été développés pour permettre un meilleur contrôle de la taille et une rétention plus élevée des siARN : les SNALP (*Stable Nucleic Acid Lipid Particle*) (Figure II-23) [141]. Ces particules sont des bicouches lipidiques comprenant divers lipides (cationiques, fusogènes, ...), ainsi que des polymères PEG pour favoriser la furtivité.

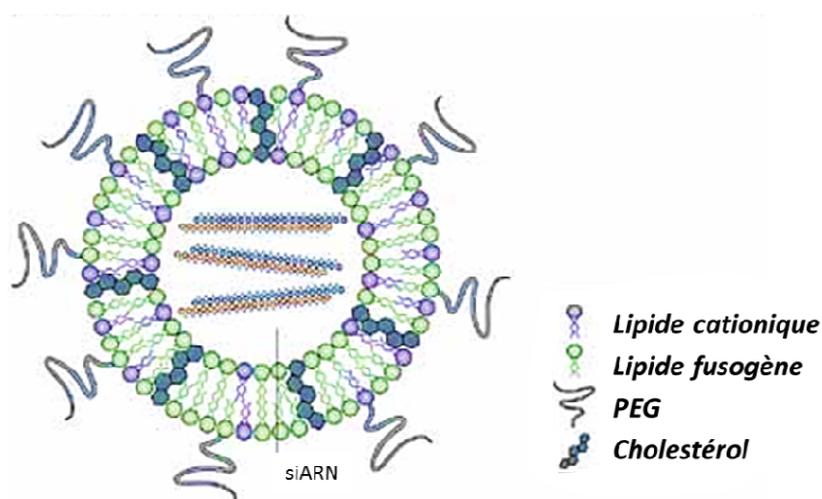


Figure II-23. Représentation d'une particule lipidique de type SNALP : les charges cationiques sur la surface interne du liposome autorise une complexation avec les siARN de manière stable.

En s'appuyant sur ces structures, les siARN sont fortement encapsulés dans le cœur hydrophile pendant la formulation, en partie en raison des lipides cationiques présents dans la bicouche lipidique, permettant une protection élevée des séquences d'acides nucléiques. En outre, l'utilisation de lipides ionisables peut s'avérer être un atout : alors que l'incubation dans un tampon acide permet à ces liposomes stables d'exprimer des charges positives, notamment lors de l'encapsulation des siARN ou dans l'internalisation par des vésicules endosomales, des conditions physiologiques induisent des caractéristiques neutres. Ainsi, la toxicité s'en trouve diminuée et le temps de circulation dans l'organisme augmenté. Par ailleurs, les SNALP ont la particularité de permettre l'internalisation, par endocytose, sans activation des récepteurs TLR, empêchant ainsi la stimulation de systèmes immunitaires [142].

L'un des résultats les plus représentatifs de l'efficacité des SNALP concerne les travaux rapportés par Zimmerman *et al.* qui représentent la première induction du mécanisme d'ARNi chez des primates non humains [143]. 48 heures après l'injection en intraveineuse de 1 à 2,5 mg/kg de SNALP encapsulant des siARN, une réduction de 90% de l'apolipoprotéine B a été mesurée [143]. De plus, une seule injection de 2,5 mg/kg a permis d'observer cet effet jusqu'à 11 jours après traitement [143].

En 2014, cinq essais cliniques réalisés par Alnylam et Tekmira ont été entrepris en se basant sur cette technologie, dont l'un en phase II et l'un en phase III. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la transthyréine (TTR) est évaluée à 50% pendant 28 jours après injection de doses de 1 mg/kg et 0,15 à 0,5 mg/kg pour respectivement ALNTTR01 et ALNTTR02 [144]. Cependant, même si une efficacité de transfection des siARN importante a été rapportée, l'utilisation de ce type de particule peut être limitée à des applications *in vivo*. En effet, l'encapsulation des siARN s'effectuant durant la formulation des nanoparticules, des tests sur un grand nombre de siARN différents peut exiger un travail considérable et fastidieux [145].

2.2.3.3. Les nanoparticules lipidiques cationiques

Entre les particules ciblant les applications *in vitro* (liposomes instables) et celles destinées aux applications *in vivo* (SNALP), une autre classe de vecteur lipidique peut être rapportée, avec l'intérêt de se positionner entre ces deux catégories. Longtemps utilisées pour d'autres applications, les nanoparticules avec un cœur lipidique commencent à émerger comme une solution multifonctionnelle pour la délivrance de siARN. Ces particules se présentent sous la forme d'une monocouche de lipides dont les chaînes carbonées sont orientées vers un cœur lipidique hydrophobe. Ce cœur permet l'encapsulation de diverses molécules lipophiles (médicaments, fluorophores,...) offrant la possibilité de fournir de multiples applications. Les charges cationiques se présentent alors en surface pour favoriser la complexation de siARN (Figure II-24). Cette stratégie permet l'étude de nombreux siARN par simple interaction électrostatique post-formulation

avec la particule, comme les vecteurs lipidiques instables, un avantage comparé aux particules de type SNALP. En effet, une étude sur des milliers de siARN différents peut alors être effectuée avec une même formulation nanoparticulaire. Ainsi, des résultats de délivrance de siARN, en s'appuyant sur cette technologie, ont été rapportés dans la littérature [146-148].

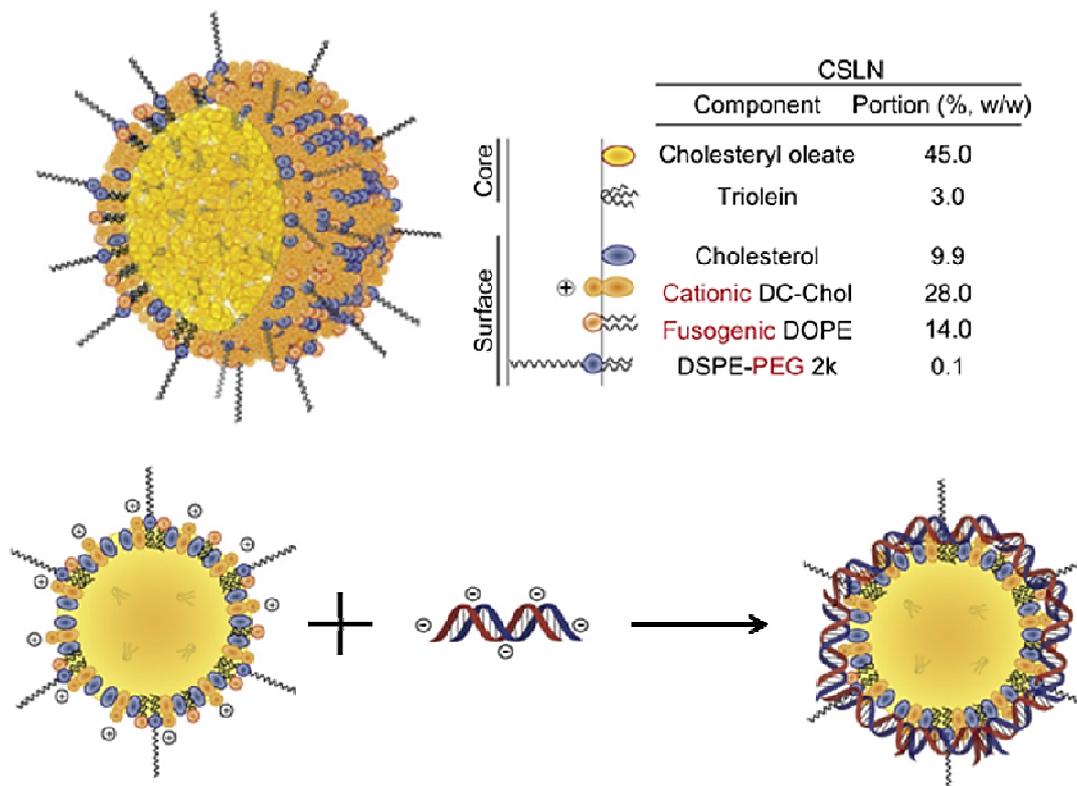


Figure II-24. La nanoparticule lipidique cationique (cLNP) : la particule présente un cœur lipidique hydrophobe et une surface possédant des charges cationiques où peuvent se complexer les siARN (d'après Kong, 2013 [140]).

En ce sens, Kong *et al.* ont démontré une internalisation facilitée des siARN sur des cellules HepG2 : jusqu'à 88% des cellules sont décrites comme positives pour l'internalisation de siARN après transfection par des cLNP d'environ 100 nm (Figure II-24) utilisées à un ratio massique cLNP/siARN de 30/1 [146]. Dans le même temps, le contrôle utilisant le lipoplexe commercial, la Lipofectamine, ne démontre une internalisation de siARN que dans 48% des cellules traitées [146]. En revanche, l'efficacité d'inhibition induite par cette transfection montre des limites. Alors qu'avec une concentration en siARN de 5 nM, le vecteur de type PEI 25kDa permet une inhibition de 40% du gène ciblée, l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg), l'utilisation de cLNP nécessite des concentrations en siARN de 100 nM pour obtenir un résultat d'inhibition équivalent [146]. Néanmoins, en dépit de cette efficacité d'inhibition moins importante,

un avantage est observé avec l'importante innocuité du vecteur : une concentration en cLNP de 80 µg/mL permet une viabilité supérieure à 90% alors qu'avec le PEI, la mortalité cellulaire est totale dès une concentration de 20 µg/mL [146]. Une autre étude, utilisant des cLNP similaires, a permis la vectorisation combinée d'un siARN et d'un agent anti-tumoral, le paclitaxel [148]. Yu *et al.* ont démontré que trois injections sur quatre jours de 0,17 mg/kg de siARN, ciblant la protéine MCL1, chez des souris BALB/C permettaient de diminuer le volume d'une xénogreffe de tumeur d'environ 50%. De plus, l'inhibition de MCL1 augmente la sensibilité des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques ; ainsi, la vectorisation de ce siARN combiné à celle de paclitaxel a permis de faire passer le volume de la tumeur de 1390 mm³ à 180 mm³, soit une diminution de 87% du volume [148]. Ces travaux prouvent l'intérêt de telles particules pour la multi-délivrance de molécules : une faible concentration de siARN complexée et transfectée suffit à induire une forte inhibition fonctionnelle, tout en maintenant la possibilité de multi-délivrance de molécules lipophiles dans le cœur des particules.

Une autre stratégie possible avec l'emploi de ces particules consiste à encapsuler les siARN dans le cœur huileux, comme pour les SNALP. De par leur nature hydrophile, les siARN requièrent une certaine adaptation : une pré-complexation avec une molécule liposoluble (telle que le cholestérol, le PEI [149], le DOTAP [150] ou même un liposome cationique instable [151, 152]) pourrait favoriser le maintien des siARN dans le cœur de la particule. Une autre technique consiste à créer des vésicules hydrophiles au sein du cœur lipophile dans une stratégie de double émulsion [152]. Par exemple, les équipes de Peer ont pré-complexé les siARN avec des lipoplexes de 120 nm avant de réussir à en encapsuler 40% dans des nanoparticules possédant un cœur huileux [152]. Une transfection de 37,5 ng de siARN par ce procédé a alors pu permettre une inhibition de 22% d'un gène ciblé sur des cellules U87MG *in vitro* [152]. Une augmentation des doses permet d'améliorer l'efficacité d'inhibition, cependant la cytotoxicité induite exige de rester à une concentration en siARN de 37,5 ng [152].

2.2.3.4. Conclusion sur les vecteurs lipidiques synthétiques

Les vecteurs lipidiques semblent être le compromis entre les vecteurs polymériques et peptidiques. Leur structure proche de celle des cellules les rend moins toxiques que les vecteurs polymériques tandis que la possibilité d'inclure des lipides fusogènes les rend plus efficaces que les vecteurs peptidiques. Cette raison explique d'ailleurs que la plupart des agents de transfection commerciaux pour des applications *in vitro* sont des liposomes cationiques non-stabilisés (Tableau II-6). En revanche, ces liposomes montrent certaines lacunes, notamment en termes de stabilité, pouvant influencer sur leur efficacité, mais surtout sur la maîtrise et

le contrôle de la transfection. Par ailleurs, à degré moindre comparé aux polymères, la grande proportion de charges positives composant la particule peut apporter des signes de cytotoxicité. En effet, certains rapports ont indiqué que l'administration systémique de siARN complexés à des nanoparticules lipidiques cationiques a entraîné une hépatotoxicité et une libération de cytokines pro-inflammatoires [153]. D'autre part, certains lipoplexes ont également montré une perte d'efficacité en présence de sérum en raison de la neutralisation des charges [65].

	Liposomes cationiques instables	SNALP	Nanoparticules lipidiques cationiques
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Complexation rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Toxicité limitée - <i>Furtivité par les polymères PEG</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Toxicité limitée - <i>Furtivité par les polymères PEG</i> - Multifonctionnalité - Encapsulation de molécules hydrophobes (médicaments, fluorophores, ...) - Complexation rapide
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité possible - Manque de stabilité - Manque de contrôle de la transfection (variabilité) 	<ul style="list-style-type: none"> - Complexation pendant la formulation - <i>limitation d'un lot de particule à un unique siARN</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection limitée
Applications possibles	 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro - HTS - <i>Protocole à adapter suivant la stabilité du vecteur</i> 	 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro - In vivo 	 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro limitées par l'efficacité - In vivo limitées par l'efficacité - HTS Limitées par l'efficacité
	 <ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transférer - In vivo limitées par le manque de stabilité et par la toxicité 	 <ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transférer - HTS 	 <ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transférer

Tableau II-6. Comparaison entre les différents vecteurs synthétiques lipidique : chaque classe de vecteur possède des caractéristiques pouvant constituer des avantages et des inconvénients pour la transfection de siARN.

Les liposomes cationiques plus stables, les SNALP, démontrent une efficacité de transfection fonctionnelle intéressante et sont régulièrement utilisés lors d'essais cliniques. Cependant, leur utilisation *in vitro* reste limitée en raison du procédé de complexation : un lot de particule ne peut être associé qu'à un siARN qui est encapsulé durant la formulation. Ainsi, pour une étude sur plusieurs siARN, un protocole de complexation post-formulation des particules semble plus adapté.

Les nanoparticules lipidiques peuvent représenter une alternative entre ces deux types de vecteur lipidique. En effet, leur faible toxicité, combinée à un protocole de complexation rapide post-formulation, rend ce type de vecteur potentiellement intéressant. La possibilité de multi-délivrance représente un avantage supplémentaire, notamment pour des applications multi-thérapeutiques. Cependant, ce type de vecteur nécessite d'être optimisé en raison d'une efficacité jusqu'ici insuffisante.

3. Conclusion sur les moyens de transfection de siARN

Chacun des moyens de transfection rapporté dans ce chapitre possèdent des caractéristiques utiles pour la transfection de siARN. Malgré leur action traumatique sur les cellules, les techniques physiques semble être, à notre connaissance, la technique la plus efficace pour la délivrance de siARN dans les cellules considérées comme difficiles à transfecter. Ce point reste un obstacle majeur à l'utilisation de vecteur [154]. Néanmoins, les études actuelles s'efforcent d'optimiser les différentes formulations de vecteur (polymériques, peptidiques, lipidiques) pour améliorer leurs paramètres en vue de transfection efficace *in vitro* et *in vivo*.

En ce sens, certaines études se sont appuyées sur des vecteurs composés d'un mélange de différentes familles de molécule. Par exemple, Tanaka *et al.* ont publié des travaux sur l'utilisation de copolymères (methoxypolyéthylène glyco-polycaprolactone ou MPEG-PCL) associés à des CPP pour la transfection de siARN [155]. Ces vecteurs permettent une protection des siARN vis-à-vis des RNAses, une internalisation optimale et des efficacités d'inhibition élevées sans apporter de toxicité importante [155]. L'un des points faibles de son utilisation semble être un faible contrôle des paramètres physico-chimiques de la particule, en particulier un diamètre hydrodynamique très variable du complexe [155]. Un exemple d'association polymères/lipides a été mentionné précédemment avec la possibilité d'encapsuler les siARN dans des nanoparticules avec un cœur lipidique [149]. D'autres études montrent l'utilisation de lipides avec des polymères tels que le chitosan [156] ou le PEI [157], ces derniers étant utilisés pour l'association aux siARN et/ou pour l'échappement de l'endosome alors que le lipide entre en contact avec la cellule lors de l'internalisation pour diminuer la cytotoxicité [159]. Une autre stratégie a vu le jour récemment promouvant

l'utilisation de polymères cationiques, pour la complexation avec les siARN, et de lipides anioniques pour diminuer les risques de toxicité dus aux charges [160]. Le mélange particules lipidiques/CPP a également montré une potentialité intéressante pour la délivrance d'acides nucléiques. Une association a été étudiée entre des liposomes contenant des lipides fusogènes et des CPP composés de larges proportions d'arginine, augmentant alors considérablement l'internalisation des siARN *in vitro* et *in vivo* [159, 160].

Ainsi, à l'heure actuelle, que cela soit pour des applications *in vitro* ou *in vivo*, des outils sont développés pour la transfection de siARN. Les travaux retrouvés au niveau de la littérature permettent d'évaluer les besoins actuels et ainsi les recherches qu'il est nécessaire de développer.

4. Objectifs de la thèse

Pour ces travaux de thèse, nous souhaitons développer un vecteur générique permettant la transfection de siARN. Ainsi, ce vecteur doit permettre des applications *in vitro* et être transposable pour une utilisation *in vivo*. Comme nous l'avons évoqué au cours de ce chapitre, une utilisation *in vitro* permettant de tester de nombreux siARN différents nécessite de privilégier un outil favorisant une complexation rapide, post-formulation du vecteur. Dans des conditions optimales, cet outil doit permettre une transfection efficace de siARN, en assurant une rétention et une innocuité élevée. La rétention élevée peut avoir une importance pour un maintien des mêmes conditions entre les échantillons, indépendamment du temps de préparation. Par ailleurs, une stratégie autorisant l'accessibilité du compartiment cytoplasmique doit être intégrée pour permettre d'initier l'ARNi ; le vecteur doit ainsi présenter une certaine versatilité dans sa composition. Un paramètre important que nous souhaitons retenir concerne l'industrialisation possible de tels vecteurs, et ainsi une reproductibilité élevée et une facilité de production. Des stratégies permettant de développer les applications *in vivo* doivent être possibles pour octroyer une multifonctionnalité au vecteur formulé. En outre, toute possibilité de multi-délivrance constituerait un atout supplémentaire augmentant l'intérêt d'utiliser un tel outil.

En s'appuyant sur ces différentes revendications, et sur l'état de l'art rapporté lors de ce chapitre, nous avons orienté nos recherches sur les vecteurs lipidiques cationiques possédant un cœur hydrophobe. En effet, une formulation de nanoparticules dont les caractéristiques sont maîtrisées (taille inférieure à 100 nm, charges cationiques) offre des avantages en termes d'internalisation et d'innocuité. En outre, une complexation rapide et post-formulation permet l'étude de milliers de siARN différents avec un seul lot de nanoparticule, offrant un avantage considérable pour des applications *in vitro* à grande échelle (criblage à haut-débit notamment). Par ailleurs, la versatilité de ces nanovecteurs, en particulier concernant les

possibilités d'ingénierie de surface, peut contribuer à une adaptation de la formulation selon l'application souhaitée. De plus, la simplicité de production peut ouvrir des perspectives intéressantes pour une industrialisation potentielle des vecteurs développés. Enfin, le cœur huileux de ces particules démontre un potentiel dans la multi-délivrance de molécules lipophiles. À l'heure actuelle, leur principale limitation semble concerner l'efficacité de transfection.

Ainsi, les prochains chapitres décriront les différentes classes de particules lipidiques avec un cœur lipophile. En outre, nous développerons les stratégies employées afin d'améliorer les propriétés de ce type de nanoparticule pour une délivrance efficace de siARN. Nous rapporterons également les différentes étapes effectuées, de l'optimisation de la formulation, jusqu'à la description des caractéristiques de ces vecteurs, ainsi que les résultats obtenus dans la transfection de siARN fonctionnels. Les avantages de ces nanoparticules lipidiques seront mis en avant au regard des autres agents actuellement disponibles, ainsi que les perspectives offertes pour la délivrance de siARN sur les cellules et/ou structures décrites comme étant difficiles à transfecter.

Bibliographie

1. Potter H, Heller R. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2003 May;Chapter: Unit-9.3.
2. Balakrishnan S, Sadasivam M, Kannan A, Panneerselvam A, Prahalathan C. Glucose modulates Pax6 expression through the JNK/p38 MAP kinase pathway in pancreatic beta-cells. *Life sciences*. 2014 Jul 25;109(1):1–7.
3. Jensen K, Anderson J a, Glass EJ. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2014 Apr 15;158(3-4):224–32.
4. Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *Journal of biomolecular techniques*. 2008 Dec;19(5):328–34.
5. Wasungu L, Marty AL, Bureau MF, Kichler A, Bessodes M, Teissie J, Scherman D, Rols MP, Mignet N. Pre-treatment of cells with pluronic L64 increases DNA transfection mediated by electrotransfer. *J Controlled Release*. 2011;149:117-125.
6. Fyrberg A, Lotfi K. Optimization and evaluation of electroporation delivery of siRNA in the human leukemic CEM cell line. *Cytotechnology*. 2010 Dec;62(6):497–507.
7. Bureau MF, Jugé L, Seguin J, Rager MN, Scherman D, Mignet N. Muscle transfection and permeabilization induced by electrotransfer or pluronic L64 paired study by optical imaging and MRI. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;:537-543.
8. Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound in medicine & biology*. 2004 May;30(4):519–26.
9. Fan Z, Liu H, Mayer M, Deng CX. Spatiotemporally controlled single cell sonoporation. *PNAS*. 2012 October ;109(41):16486-491.
10. Inoue H, Arai Y, Kishida T, Shin-Ya M, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Tsuchida S, Inoue A, Shirai T, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound. *Ultrasonics*. 2014 Mar;54(3):874–81.

11. Kinoshita M, Hynynen K. A novel method for the intracellular delivery of siRNA using microbubble-enhanced focused ultrasound. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005 Sep 23;335(2):393–9.
12. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff J a, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nature genetics*. 2002 Sep;32(1):107–8.
13. Lewis DL, Wolff J a. Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection. *Advanced drug delivery reviews*. 2007 Mar 30;59(2-3):115–23.
14. Wilcox DM, Yang R, Morgan SJ, Nguyen PT, Voorbach MJ, Jung PM, Haasch DL, Lin E, Bush EN, Opgenorth TJ, Jacobson PB, Collins CA, Rondinone CM, Surowy T, Landschulz KT. Delivery of RNAi reagents in murine models of obesity and diabetes. *Journal of RNAi and gene silencing : an international journal of RNA and gene targeting research*. 2006 Jan;3(1):225–36.
15. Kikkert JR, Vidal JR, Reisch BI. by Particle Bombardment / Biolistics. *Methods*. 286:61–78.
16. Svarovsky S, Borovkov A, Sykes K. Cationic gold microparticles for biolistic delivery of nucleic acids. *BioTechniques*. 2008 Nov;45(5):535–40.
17. O'Brien J a, Holt M, Whiteside G, Lummis SC, Hastings MH. Modifications to the hand-held Gene Gun: improvements for in vitro biolistic transfection of organotypic neuronal tissue. *Journal of neuroscience methods*. 2001 Nov 15;112(1):57–64.
18. O'Brien J a, Lummis SCR. Nano-biolistics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC biotechnology*. 2011 Jan;11(1):66.
19. Usui I, Imamura T, Huang J, Satoh H, Olefsky JM. Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Apr 18;278(16):13765–74.
20. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeplich S, Guo S., Shu Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Advanced drug delivery reviews*. 2010 Apr 30;62(6):650–66.
21. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998. 391 (6669):806–11.
22. Choung S, Kim YJ, Kim S, Park H-O, Choi Y-C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006 Apr;342(3):919–27.

23. Stessl M, Marchetti-Deschmann M, Winkler J, Lachmann B, Allmaier G, Noe CR. A proteomic study reveals unspecific apoptosis induction and reduction of glycolytic enzymes by the phosphorothioate antisense oligonucleotide oblimersen in human melanoma cells. *Journal of proteomics*. 2009 Aug 20;72(6):1019–30.
24. Hall AHS, Wan J, Shaughnessy EE, Shaw BR, Alexander KA. RNA interference using boranophosphate siRNAs : structure – activity relationships. *Mol Cell*. 2004;32(20):5991–6000.
25. De Paula D, Bentley MVLB, Mahato RI. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA (New York, N.Y.)*. 2007 Apr;13(4):431–56.
26. Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, Zavolan M, Tuschl T, Meister G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *Spring*. 2008;:263–74.
27. Whitehead K a, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug discovery*. 2009 Feb;8(2):129–38.
28. Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007 Sep;15(9):1663–9.
29. Layzer JM, Mccaffrey AP, Tanner AK, Huang ZAN, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. 2004;:766–71.
30. Mook OR, Baas F, de Wissel MB, Fluiter K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. 2007 Mar;6(3):833–43.
31. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2009 Jan;48(8):1378–98.
32. Parrish JZ, Xue D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Molecular cell*. 2003 Apr;11(4):987–96.
33. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):173–8.
34. Schwarz DS, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. 2002;10:537–48.

35. Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher H-peter. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004;14:4975–7.
36. Gao S, Dagnaes-hansen F, Juel E, Nielsen B, Wengel J, Besenbacher F, Howard KA, Kjems J. The Effect of Chemical Modification and Nanoparticle Formulation on Stability and Biodistribution of siRNA in Mice. *Nature*. 2009;17(7):1225–33.
37. Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T, Koteliensky V, Manoharan M, Stoffel M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature biotechnology*. 2007 Oct;25(10):1149–57.
38. Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α -Tocopherol. *Molecular Therapy*. 2008;16(4):734–40.
39. Manjunath N, Dykxhoorn DM. Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov Med*. 2010;9(48):418-30.
40. McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nature biotechnology*. 2006 Aug;24(8):1005–15.
41. Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *Cell*. 2004;558:63–8.
42. Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic acids research*. 2005 Jan;33(1):439–47.
43. Bramsen JB, Pakula MM, Hansen TB, Bus C, Langkjær N, Odadzic D, Smicius R, Wengel SL, Chattopadhyaya J, Engels JW, Herdewijn P, Wengel J, Kjems J. A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects. *Nucleic acids research*. 2010 Sep;38(17):5761–73.
44. Griveau a, Bejaud J, Anthiya S, Avril S, Autret D, Garcion E. Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *International journal of pharmaceutics [Internet]*. 2013 May 31;454(2):765-774.
45. Edelstein ML. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *Journal of Gene Medicine, The*. 2007;(August):833–42.

46. Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*. 2007 Aug;8(8):573–87.
47. Zhang X, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering B. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58:515–34.
48. Cavazzana-calvo M, Cavazzana-calvo M, Hacein-bey S. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)– X1 Disease. *Science*. 2014;669(2000).
49. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 1999;401(6753):517-8.
50. Palmer DJ, Ng P. Helper-dependant adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2005;16(1):1-16.
51. George JAS. Gene therapy progress and prospects : adenoviral vectors. *Gene Therapy*. 2003;(January 2002):1135–41.
52. Jin L-Y, Li C-F, Zhu G-F, Wu C-T, Wang J, Yan S-F. Effect of siRNA against NF- κ B on sepsis-induced acute lung injury in a mouse model. *Molecular medicine reports*. 2014 Aug;10(2):631–7.
53. Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Letters*. 2003 Mar;539(1-3):111–4.
54. Wadman M. Gene therapy might not have caused patient's death. *Nature*. 2007;449:270.
55. Ptak K, Farrell D, Panaro NJ, Grodzinski P, Barker AD. The NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer: achievement and path forward. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2010;2(5):450–60.
56. Moghimi SM, Kissel T. Particulate nanomedicines. *Advanced drug delivery reviews*. 2006 Dec 1;58(14):1451–5.
57. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, Mcneil SE. Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*. 2008;5(4):487–95.
58. Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GGM. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Feb 18;100(4):1972–7.

59. Tseng Y-C, Mozumbar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 July 25;61(9):721-731.
60. Pasut G, Veronese FM. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2012 Jul 20;161(2):461–72.
61. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods in molecular biology.* 2010;624:25-37.
62. Drobek T, Spencer N, Heuberger M. Compressing PEG brushes. *Macromolecules.* 2005;38:5254-5259.
63. Leal C, Rögnvaldsson S, Fosseheim S, Nilssen EA, Topgaard D. Dynamic and structural aspects of PEGylated liposomes by NMR. *Journal of colloid and interface science.* 2008;325:485-493.
64. Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, Ansell SM, Du X, Tam YYC, Lin PJC, Chen S, Narayanannair JK, Rajeev KG, Monaharan M, Akinc A, Maier MA, Cullis P, Madden TD, Hope MJ. Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2(e139).
65. Audouy S, Hoekstra D. Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review). *Mol Membr Biol.* 2001 Apr-Jun;18(2):129-43.
66. Moore A, Medarova Z, Potthast A. In Vivo Targeting of Underglycosylated MUC-1 Tumor Antigen Using a Multimodal Imaging Probe In Vivo Targeting of Underglycosylated MUC-1 Tumor Antigen Using a Multimodal Imaging Probe. *Cancer.* 2004;:1821–7.
67. Medarova Z, Pham W, Farrar C, Petkova V, Moore A. In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nature medicine.* 2007 Mar;13(3):372–7.
68. Veisheh O, Gunn J, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 March 8;62(3):284-304.
69. Zhao Y, Zhao L, Zhou L, Zhi Y, Xu J, Wei Z, Zhang KX, Ouellette BFF, Shen H. Quantum dot conjugates for targeted silencing of Bcr/Abl gene by RNA interference in human myelogenous leukemia K562 cells. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology.* 2010;10(8):5137-43.

70. Jung J, Solanki A, Memoli K a, Kamei K-ichiro, Kim H, Drahl M a, Williams LJ, Tseng HR, Lee KB. Selective inhibition of human brain tumor cells through multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2010 Jan;49(1):103–7.
71. Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubyko F, Aigner a. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene therapy*. 2005 Mar;12(5):461–6.
72. Taratula O, Garbuzenko O, Savla R, Wang YA, He H, Minko T. Multifunctional nanomedicine platform for cancer specific delivery of sirna by superparamagnetic iron oxide nanoparticles-dendrimer complexes. *Current Drug Delivery*. 2011;8(1):59-69.
73. Jiang S, Eltoukhy AA, Love KT, Langer R, Anderson DG. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery. *Nano Lett*. 2013;13:1059–64.
74. Qi L, Shao W, Shi D. JAM-2 siRNA intracellular delivery and real-time imaging by proton-sponge coated quantum dots. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013;1(5):654.
75. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology*. 2007 Oct;25(10):1165–70.
76. Ohnishi S, Lomnes SJ, Laurence RG, Gogbashian A, Mariani G, Frangioni JV. Organic Alternatives to Quantum Dots for Intraoperative Near-Infrared Fluorescent Sentinel Lymph Node Mapping. *Molecular Imaging*. 2005;4(3):172–81.
77. Wang Y, Li Z, Han Y, Liang LH, Ji A. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo. *Current drug metabolism*. 2010;11(2):182-196.
78. Wu ZW, Chien CT, Liu CY, Yan JY, Lin SY. Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *Journal of drug targeting*. 2012;20(7):551-560.
79. Nguyen J, Szoka FC. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Accounts of chemical research*. 2012 Jul 17;45(7):1153–62.
80. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A Two-Stage Poly (ethylenimine) -Mediated Cytotoxicity : Implications for Gene Transfer / Therapy. *Gene Therapy*. 2005;11(6):990–5.
81. Hunter AC, Moghimi SM. *Biochimica et Biophysica Acta* Cationic carriers of genetic material and cell death : A mitochondrial tale. *BBA - Bioenergetics*. 2010;1797(6-7):1203–9.

82. Dai J, Zou S, Pei Y, Cheng D, Ai H, Shuai X. Biomaterials Polyethylenimine-grafted copolymer of poly (L -lysine) and poly (ethylene glycol) for gene delivery. *Biomaterials*. 2011;32(6):1694–705.
83. Majoros J, Myc A, Thomas T, Mehta CB, Baker JR. PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy : Synthesis, Characterization , and Functionality. *Technology*. 2006;(Mwco 3500):572–9.
84. Singha K, Namgung R, Kim WJ. *Polymers in Small-Interfering RNA Delivery*. 2011;21(3):133–48.
85. Perez-Martinez FC, Ocana AV, Perez-Carrion MD, Cena V. Dendrimers as vectors for genetic material delivery to the nervous system. *Curr.Med.Chem*.2012;19:5101-5108.
86. Tomalia DA, Reyna LA, Svenson S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. *Biochemical Society Transactions*. 2007;(i):61–7.
87. Zhou J, Neff CP, Liu X, Zhang J, Li H, Smith DD, Swidersky P, Aboellail T, Huang Y, Du Q, Liang Z, Peng L, Akkina R, Rossi JJ. Systemic Administration of Combinatorial dsRNAs via Nanoparticles Efficiently Suppresses HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Molecular Therapy*.
88. Lee J-ho, Eun K, Soo M, Won H, June D, Ryu G, Myung H. Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*. 2009;190:202–7.
89. Patil ML, Zhang M, Taratula O, Garbuzenko OB, He H, Minko T. Internally Cationic Polyamidoamine PAMAM-OH Dendrimers for siRNA Delivery : Effect of the Degree of Quaternization and Cancer Targeting. *Control*. 2009;:258–66.
90. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature reviews. Drug discovery*. 2004 Dec;3(12):1023–35.
91. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing’s sarcoma. *Cancer research*. 2005 Oct 1;65(19):8984–92.
92. Liu X, Howard K a, Dong M, Andersen MØ, Rahbek UL, Johnsen MG, Hansen OC, Besenbacher F, Kjems J. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(6):1280–8.

93. Jean M, Smaoui F, Lavertu M, Méthot S, Bouhdoud L, Buschmann MD, Merzouki M. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene therapy*. 2009 Sep;16(9):1097–110.
94. Howard K a, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J. RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2006 Oct;14(4):476–84.
95. Alameh M, Dejesus D, Jean M, Darras V, Thibault M, Lavertu M, Buschmann MD, Merzouki A. Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International journal of nanomedicine*. 2012 Jan;7:1399–414.
96. Singha K, Namgung R, Kim WJ. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic acid therapeutics*. 2011 June;21(3):133-147.
97. Yuan X, Naguib S, Wu Z. Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery*. 2011; 8(4):521-536.
98. Jeon SY, Park JS, Yang HN, Lim HJ, Yi SW, Park H, Park KH. Co-delivery of Cbfa-1-targeting siRNA and SOX9 protein using PLGA nanoparticles to induce chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2014 Sep;35(28):8236–48.
99. Rozema DB, Lewis DL, Wakefield DH, Wong SC, Klein JJ, Roesch PL, Bertin SL, Reppen TW, Chu Q, Blokhin AV, Hagstrom JE, Wolff JA. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Aug 7;104(32):12982–7.
100. Mendoza-espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-oliva J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;365:8–15.
101. Lazaridis T. Binding affinity and specificity from computational studies. *Curr. Org. Chem*. 2002;6:1319-1332.
102. Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS letters*. 2004 Jan 30;558(1-3):63–8.
103. Davidson TJ, Harel S, Arboleda V a, Prunell GF, Shelanski ML, Greene L a, Troy CM. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before

- mRNA degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004 Nov 10;24(45):10040–6.
104. Chiu YL, Ali A, Chu CY, Cao H, Rana TM. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi living cells. *Chem. Biol.* 2004;11:1165-1175.
105. Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG : implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Biochimie*. 2003;31(11).
106. Nakase I, Tanaka G, Futaki S. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* 2013;9:855-861.
107. Fuchs SM, Raines RT. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*. 2004 Mar 9;43(9):2438–44.
108. Lundin P, Johansson H, Guterstam P, Holm T, Hansen M, Langel U, Andaloussi SEL. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjugate chemistry*. 2008 Dec;19(12):2535–42.
109. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*. 2000 Nov;56(5):318–25.
110. Takeuchi T, Kosuge M, Tadokoro A, Sugiura Y, Nishi M, Kawata M, Sakai N, Matile S, Futaki S. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS chemical biology*. 2006 Jun 20;1(5):299–303.
111. Kim WJ, Christensen LV, Jo S, Yockman JW, Jeong JH, Kim Y-hee, Kim SW. Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. *Gene Therapy*. 2006;14(3):343–50.
112. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007 Jul 5;448(7149):39–43.
113. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 Dec;1816(2):232–46.

114. Arthanari Y, Pluen A, Rajendran R, Aojula H, Demonacos C. Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010 Aug 3;145(3):272–80.
115. Lundberg P, El-Andaloussi S, Sützlü T, Johansson H, Langel U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007 Sep;21(11):2664–71.
116. Deshayes S, Konate K, Aldrian G, Crombez L, Heitz F, Divita G. Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: highway to cellular uptake. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Dec;1798(12):2304–14.
117. Simeoni F. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 2003 Jun 1;31(11):2717–24.
118. Gros E, Deshayes S, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Depollier J, Heitz F, Divita G. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochimica et biophysica acta*. 2006 Mar;1758(3):384–93.
119. Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Mc Master G, Coll J-L, Heitz F, Divita G. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic acids research*. 2009 Aug;37(14):4559–69.
120. Veldhoen S, Laufer SD, Trampe A, Restle T. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic acids research*. 2006 Jan;34(22):6561–73.
121. Crowet J-M, Lins L, Deshayes S, Divita G, Morris M, Brasseur R, Thomas A. Modeling of non-covalent complexes of the cell-penetrating peptide CADY and its siRNA cargo. *Biochimica et biophysica acta*. 2013 Mar;1828(2):499–509.
122. Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, Nguyen QN, McMaster GK, Brasseur R, Heitz F, Divita G. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009 Jan;17(1):95–103.
123. Li W, Szoka FC. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical research*. 2007 Mar;24(3):438–49.

124. Ambegia E, Ansell S, Cullis P, Heyes J, Palmer L, MacLachlan I. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 May 20;1669(2):155–63.
125. Lander CN jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt S, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting *in vivo* using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*. 2005;65(15):6910-6918.
126. Landen CN, Merritt WM, Mangala LS, Sanguino AM, Bucana C, Lu C, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Schmandt R, Coleman RL, Gershenson DM, Lopez-Berestein G, Sood AK. Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(12):1708-1713.
127. Mangala LS, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. Liposomal siRNA for ovarian cancer. *Methods Mol Biol*. 2009;555:29-42.
128. Leonetti JP, Machy P, Degols G, Lebleu B, Leserman L. Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(7):2448-51
129. Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem biophys res commun*. 1993;190(3):952-60.
130. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature biotechnology*. 2010 Feb;28(2):172–6.
131. Dan N, Danino D. Structure and kinetics of lipid – nucleic acid complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014;205:230–9.
132. Koltover I, Salditt T, Ra JO. An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome – DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery. *Science*. 2014;78(1998).
133. Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Durieux B, Löffler K, Fechtner M, Röhl T, Fisch G, Dames S, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther*. 2006 ;13(18) :1360-1370.
134. Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. A novel lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther*. 2006 ;13(16) :1222-1234.

135. Aleku M, Schulz P, Keil O, Santel A, Schaeper U, Dieckhoff B, Janke O, Endruschat J, Durieux B, Röder N, Löffler K, Lange C, Fechtner M, Möpert K, Fisch G, Dames S, Arnold W, Jochims K, Giese K, Wiedenmann B, Scholz A, Kaufmann J. Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res.* 2008 ;68(23) :9788-9798.
136. Santel A, Aleku M, Roder N, Möpert K, Durieux B, Janke O, Keil O, Endruschat J, Dames S, Lange C, Eisermann M, Löffler K, Fechtner M, Fisch G, Vank C, Schaeper U, Giese K, Kaufmann J. Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models. *Clin Cancer Res.* 2010 ;16(22) :5469-5480.
137. Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, Leshchiner ES, Busini V, Hossain N, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nature biotechnology.* 2008 May;26(5):561–9.
138. Frank-Kemenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, Butler D, Charisse K, Dorkin R, Fan Y, Gamba-Vitalo C, Hadwiger P, Jayaraman M, John M, Jayaprakash KN, Maier M, Lechev L, Rajeev KG, Read T, Röhler I, Soutschek J, Tan P, Wong J, Wang G, Zimmermann T, De Fougerolles A, Vornlocher H-P, Langer R, Anderson DG, Manoharan M, Koteliansky V, Horton JD, Fitzgerald K. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. 2008 Aug;105(33):11915-11920.
139. Chen X, Zhu Y, Han L, Lu H, Hao X, Dong Q. Chemokine receptor 4 gene silencing blocks neuroblastoma metastasis in vitro. *Neural regeneration research.* 2014 May;9(10):1063-67.
140. Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of neuroscience methods.* 2001 Dec 15;112(2):95–9.
141. Felgner PI, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1987;84(21):7413-7417.
142. Rossi JJ. RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Therapy.* 2005 Oct 6;13(7):583–4.
143. Zimmermann TS, Lee ACH, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 2006 May 4;441(7089):111–4.
144. Coelho T, Adams D, Silva A et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013;369(9):819-829.

145. Yousefi A, Bourajjaj M, Babae N, Noort PIV, Schaapveld RQJ, Beijnum JRV, Griffioen AW, Storm G, Schiffelers RM, Mastrobattista E. Anginex lipoplexes for delivery of anti-angiogenic siRNA. *International journal of pharmaceutics*. 2014 Jun 17;472(1-2):175–84.
146. Kong WH, Park K, Lee M-Y, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials*. 2013 Jan;34(2):542–51.
147. Kim HR, Kim IK, Bae KH, Lee SH, Lee Y, Park TG. articles Cationic Solid Lipid Nanoparticles Reconstituted from Low Density Lipoprotein Components for Delivery of siRNA. 2008;5(4):622–31.
148. Yu YH, Kim E, Park DE, Shim G, Lee S, Kim YB, Kim CW, Oh YK. Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012 Feb;80(2):268–73.
149. Xue H-Y, Wong H-L. Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS nano*. 2011 Sep 27;5(9):7034–47.
150. Lobovkina T, Jacobson GB, Gonzalez-Gonzalez E, Hickerson RP, Leake D, Kaspar RL, Contag CH, Zare RN. In vivo sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS nano*. 2011 Dec 27;5(12):9977–83.
151. David S, Resnier P, Guillot A, Pitard B, Benoit J-P, Passirani C. siRNA LNCs--a novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012 Jun;81(2):448–52.
152. Resnier P, David S, Lautram N, Delcroix GJ-R, Clavreul A, Benoit J-P, Passirani C. EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. *International journal of pharmaceutics*. 2013 Oct 1;454(2):748–55.
153. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(26):6867–75.
154. Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of neuroscience methods*. 2001 Dec 15;112(2):95–9.

155. Tanaka K, Kanazawa T, Horiuchi S, Ando T, Sugawara K, Takashima Y, Seta Y, Okada H. Cytoplasm-responsive nanocarriers conjugated with a functional cell-penetrating peptide for systemic siRNA delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2013 Oct 15;455(1-2):40–7.
156. Messaoudi K, Saulnier P, Boesen K, Benoit JP, Lagarce F. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. *International Journal of Nanomedecine*. 2014;9(1):1479-1490.
157. Navarro G, Essex S, Sawant RR, Biswas S, Nagesha D, Sridhar S, de Larduya CT, Torchilin VP. Phospholipid-modified polyethylenimine-based nanopreparations for siRNA-mediated gene silencing: implications for transfection and the role of lipid components. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2014 Feb;10(2):411–9.
158. Tagalakis AS, Lee DHD, Bienemann AS, Zhou H, Munye MM, Saraiva L, McCarthy D, Du Z, Vink CA, Maeshima R, White EA, Gustafsson K, Hart SL. Multifunctional, self-assembling anionic peptide-lipid nanocomplexes for targeted siRNA delivery. *Biomaterials*. 2014. Article in press.
159. Asai T, Tsuzuku T, Takahashi S, Okamoto A, Dewa T, Nango M, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Oku N. Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014 Feb 21;444(4):599–604.
160. Hayashi Y, Yamauchi J, Khalil I a, Kajimoto K, Akita H, Harashima H. Cell penetrating peptide-mediated systemic siRNA delivery to the liver. *International journal of pharmaceutics*. 2011 Oct 31;419(1-2):308–13.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour ces travaux de thèse, nous avons adopté une démarche en trois étapes. D'abord, nous nous concentrerons sur la formulation et l'optimisation de la composition des nanoparticules. Ainsi, les protocoles de fabrication de nanovecteurs lipidiques LNP et un plan d'expérience ont été développés afin d'obtenir des nanoparticules optimisées pour la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques. Ces vecteurs ont alors été caractérisés par diverses techniques, notamment en termes de taille et de stabilité colloïdale.

Ensuite, nos travaux se sont concentrés sur les caractérisations des complexes nanovecteurs cLNP avec des séquences d'ARN interférents. En ce sens, les efficacités de complexation et de rétention ont été étudiées.

Enfin, les vecteurs cLNP développés ont été testés pour diverses applications *in vitro* afin de valider l'efficacité de transfection d'ARN interférents permise par leur utilisation. Les étapes d'internalisation, mais également d'extinction de l'expression d'un gène ciblé suite à la transfection d'ARN interférents, ont été étudiées sur différents modèles cellulaires.

1. Préparation des nanoparticules cationiques

1.1. Matériels

Les nanoparticules sont des dispersions huileuses dans une phase aqueuse. L'émulsion possède un cœur semi-cristallin composé d'huile de soja raffiné (Croda Uniqema, Chocques, France) et de Suppocire NBTM (Gattefossé, Saint-Priest, France). En surface, la coquille est formée de différents tensioactifs tels que des phospholipides (Lipoid S75-3, Lipoid, Allemagne) et des polymères de type polyéthylène glycol (Myrj S40-PW, Croda Uniqema, Chocques, France). Des lipides apportant des caractéristiques particulières sont intégrés à la surface des particules : le DOTAP (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) pour l'apport des charges positives et le DOPE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) pour le pouvoir fusogène.

1.2. Protocole de fabrication des cLNP

La préparation des cLNP a généralement été effectuée sur des échantillons de 2 mL, dans des tubes fermés de 5 mL de volume (Figure E-1). La phase huileuse a été préparée en mélangeant les lipides solides (Suppocire NBTM) et les lipides liquides (Super-refined Soybean oilTM) avec les phospholipides (Lipoid S75-3), les lipides cationiques (DOTAP) et fusogènes (DOPE). Dans le même

temps, la phase aqueuse a été préparée en solubilisant du polymère PEG (Myrj S40-PW) dans un tampon aqueux (PBS 1X ou NaCl 154 mM, pH 7,4).

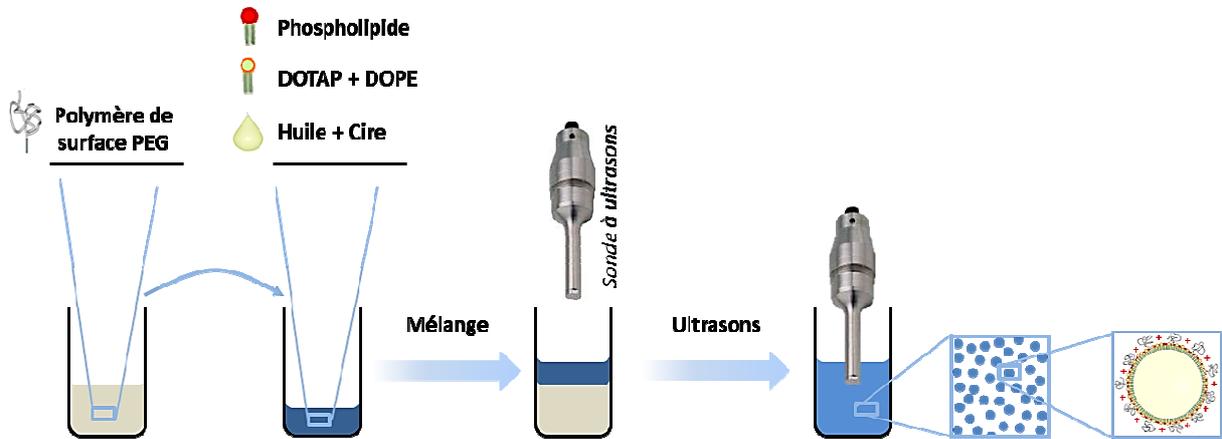


Figure E-1. Protocole de formulation des cLNP : Une phase aqueuse (beige) et une phase huileuse (bleu foncé) sont mélangées et soumises à des ultrasons pour former une solution de nanoparticules (bleu clair).

Après homogénéisation à 60°C, les deux phases ont été mélangées à l'aide d'un vortex, puis le mélange a subi un apport d'énergie important par des cycles d'ultrasons avec un sonificateur AV505® (Sonics, Newtown, USA) : des impulsions de 10 secondes ont été espacées par des temps de repos de 30 secondes. Les ultrasons ont été utilisés à une puissance de 115 watts durant une période totale de 40 minutes, induisant une réduction des nanoparticules en termes de taille et de PDI (Figure E-2). Le sonotrode, utilisé pour cette étape, est une sonde conique de 3 mm de diamètre final.

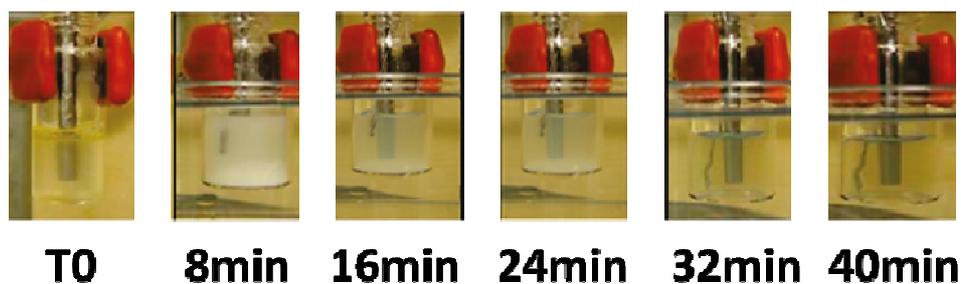


Figure E-2. Évolution visuelle des nanoémulsions au cours de l'étape d'émission des ultrasons : Les deux phases présentes à T0 subissent un apport d'énergie important permettant la formation d'émulsions. Au cours du temps, la solution devient plus translucide témoignant de la diminution de taille des nanoparticules.

Les cLNP ainsi produites ont ensuite été purifiées par dialyse (seuil de coupure : 12-14 kDa contre le tampon utilisé dans la phase aqueuse, le NaCl 154 mM, sur une nuit) pour éliminer les composants non-intégrés aux nanoémulsions. La dilution subie lors de l'étape de dialyse a été prise en compte lors du calcul de la concentration en particule. Pour terminer, la solution de cLNP a été stérilisée par filtration sur membrane de cellulose possédant des pores de 0,22 μm de diamètre en moyenne.

1.3. Plan d'expérience

Un plan d'expérience a été réalisé en se basant sur un mélange de cinq paramètres de formulation avec effets principaux afin d'étudier les caractéristiques des cLNP pour la transfection de siARN. Quatre paramètres décrivent la composition de la couronne de la nanoparticule (le pourcentage molaire en lipides cationiques (X_1), en lipides fusogènes (X_2), en polymères PEG (X_3) et en phospholipides (X_4)) tandis qu'un paramètre qualitatif permet d'étudier l'influence de la taille de la particule (X_5). Ce dernier paramètre est important car il dicte la composition du cœur des particules en se basant sur les travaux de Delmas *et al.* [1, 2] sur les LNP.

Les formulations proposées ont été testées sur des réponses de polydispersité (Y_1) et de stabilité dans les milieux de culture (Y_2). Ces deux premières réponses ont été rapportées suite à des mesures par DLS. En outre, des réponses biologiques ont été déterminées avec les mesures d'efficacité de transfection fonctionnelle : Y_3 et Y_4 représentent des tests biologiques sur deux modèles cellulaires sur-exprimant la protéine GFP, respectivement les cellules de type Hela et PC3. L'efficacité d'extinction est alors corrélée à la diminution de l'intensité de fluorescence verte, mesurée par cytométrie en flux, suite à la transfection d'ARN interférent inhibant spécifiquement l'expression de la GFP.

La sélection des points optimaux a été permise par l'utilisation du logiciel Design Expert 07®.

2. Caractérisation physico-chimique des cLNP

2.1. Diffusion dynamique de la lumière

La taille des cLNP et leur potentiel zêta ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* ou DLS) avec un ZetaSizer NanoZS (Malvern, Royaume Uni). Cet

outil s'appuie sur l'observation du mouvement Brownien des particules. Ainsi, la diffusion de la lumière d'un laser par les particules en solution permet de déterminer un coefficient de diffusion qui, intégré dans la relation de Stokes-Einstein, permet de déduire la taille des particules :

$$D_H = 2 \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta_s D} \left\{ \begin{array}{l} \kappa_B : \text{constante de Boltzmann} \\ T : \text{température} \\ \eta_s : \text{viscosité} \\ D : \text{coefficient de diffusion} \end{array} \right.$$

Lors de cette mesure, l'indice de polydispersité a été déterminé permettant de caractériser l'homogénéité de distribution en taille de la solution de particule.

Concernant la mesure de la charge de surface, elle est conditionnée par la nature de la particule, mais également par le milieu qui l'entoure (Figure E-3). En effet, différentes couches électriques, constituées de contre-ions, entourent la particule. Le potentiel zêta est une mesure de la charge au niveau des couches électriques les plus stables (comprenant la couche de Stern et la première couche diffuse (Figure E-3)). Le ZetaSizer NanoZS calcule le potentiel zêta par la détermination de la mobilité électrophorétique des particules en s'appuyant sur l'équation de Henry :

$$Z = \frac{U_\epsilon 3\eta}{2\epsilon f(ka)} \left\{ \begin{array}{l} Z : \text{potentiel zêta} \\ \epsilon : \text{constante diélectrique} \\ \eta : \text{viscosité} \\ U_\epsilon : \text{mobilité électrophorétique} \\ f(ka) : \text{fonction de Henry} \end{array} \right.$$

Pour nos mesures, tous les échantillons ont préalablement été dilués dans un milieu NaCl 0,15 mM à une fraction massique de 0,1% (m/m) afin d'éviter tout problème de diffusion multiple, diminuant ainsi les charges dans la couche de Stern et la couche diffuse : de cette façon, le potentiel zêta évalué est plus proche des valeurs réelles.

Pour l'évaluation du diamètre hydrodynamique ou du potentiel zêta, les mesures ont été effectuées à un angle fixe de 173° avec un laser 633 nm et chaque point est la moyenne de trois mesures indépendantes réalisées en mode automatique (16 séquences de mesure de 10 secondes). Chaque point expérimental consiste en la moyenne de mesures effectuées à 25 ± 1°C sur trois échantillons préparés séparément.

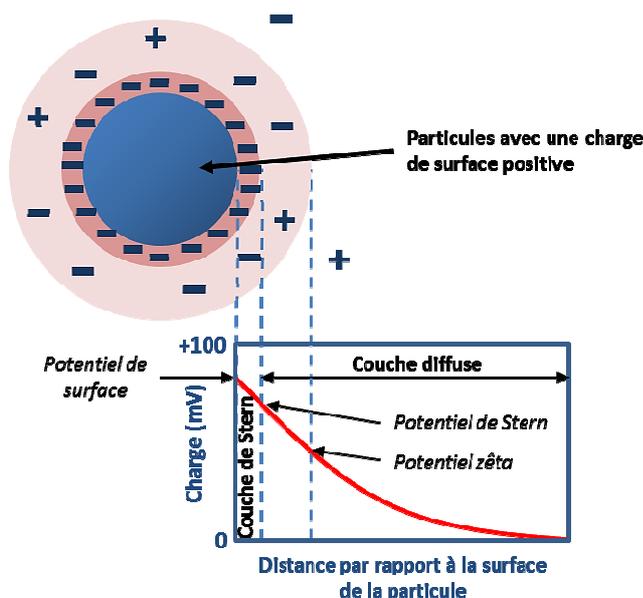


Figure E-3. Représentation du potentiel zêta : La mesure du potentiel zêta correspond à la mesure du potentiel de surface auquel est ajouté le potentiel de Stern, ainsi que le potentiel d'une couche diffuse bordant la nanoparticule.

2.2. Étude de la stabilité par des expériences de FRET

Le cœur semi-cristallin des cLNP autorise l'encapsulation de fluorophores lipophiles. Ainsi, le transfert d'énergie par résonance de type Förster a pu être utilisé par l'encapsulation de deux types de fluorophore répondant aux critères nécessaires à cette application. Les fluorophores ont été intégrés à la phase huileuse et chauffés quelques minutes en présence d'argon pour évaporer le solvant dans lequel ils ont été stockés. Ensuite, le protocole de formulation a été le même que celui précédemment détaillé : un mélange avec la phase aqueuse et l'application d'ultrasons. En tant que donneur d'énergie, le DiI a été intégré dans les particules à une concentration de 25 nM tandis que l'accepteur, le DiD, un dérivé de la cyanine 5, a été ajouté dans une concentration finale de 100 nM. Ces données ont été calculées en prenant en considérant une efficacité d'encapsulation supérieure à 95% [2].

Avant chaque expérience, une calibration a été effectuée en s'appuyant sur différents ratios de trois échantillons de particule encapsulant respectivement du DiI, du DiD ou un mélange DiI/DiD dans les concentrations rapportées précédemment : un pourcentage de FRET a été défini en fonction du rapport des émissions de fluorescence DiD sur DiI. Préalablement aux mesures de fluorescence, et afin de ne pas être confronté à un effet de filtre de type Inner, affectant la fluorescence, les échantillons ont été mesurés en absorbance, à la longueur d'onde d'excitation, pour

ne pas dépasser 0,1. Les spectres d'émission de fluorescence et d'absorbance ont été enregistrés respectivement avec un fluorimètre Perkin-Elmer LS50B et un spectrophotomètre Cary 300 Scan (Varian) en utilisant des cuves jetables contenant typiquement 2 mL d'échantillon. Les dilutions appliquées et les tampons utilisés ont été choisis en fonction des expériences sur la résistance à la dilution et la stabilité dans les milieux de culture. Pour les expériences de résistance à la dilution, les tests ont été effectués dans un tampon PBS 1X à différentes concentration en nanoparticule. Pour les expériences de résistance dans le milieu de culture utilisé pour la transfection, les tests ont été effectués dans un milieu RPMI supplémenté à 6,8% de sérum de veau foetal et mélangé à du milieu OptiMEM. La quantité de milieu RPMI 6,8% représente 60% de l'échantillon tandis que la quantité de milieu OptiMEM et d'échantillon en nanoparticule en représente 40%. Chaque expérience a été réalisée à trois reprises.

3. Caractérisation des complexes cLNP/siARN

3.1. Complexation

L'un des objectifs de cette étude consiste en la possibilité de complexer des vecteurs lipidiques avec des siARN de manière simple et rapide, post-formulation des nanoparticules. En s'appuyant sur les protocoles mentionnés dans la littérature [3-5] et sur l'expertise acquise concernant la transfection de siARN dans nos laboratoires, un protocole a été défini, compatible avec les études de complexation par électrophorèse et les études de transfection.

Ce protocole comporte une première étape de préparation des siARN : un eppendorf a été préparé avec la concentration désirée en siARN mélangée à du milieu OptiMEM. Le volume de cet eppendorf représente 20% du volume total mis au contact des cellules pour la transfection, ou déposé dans les puits des gels pour les études d'électrophorèse. La seconde étape a permis la préparation des nanoparticules lipidiques dans un deuxième eppendorf : les cLNP ont été diluées au ratios N/P désirés dans du milieu OptiMEM. Comme pour la première étape, le volume contenu dans cet eppendorf représente 20% du volume total. Ensuite, les deux préparations ont été mélangées et mixées à température ambiante durant 30 minutes à 700 rpm. Au niveau de la littérature, vitesse et temps de complexation sont décrits comme étant important pour l'efficacité de transfection de siARN [6]. Ainsi, ces paramètres de complexation ont été maintenus tout au long de l'étude.

Pour les expériences de transfection *in vitro*, du milieu de culture supplémenté par 6,8% de sérum de veau foetal a été déposé sur les cellules. Le volume utilisé représente 60% du volume final mis au contact des cellules. Concernant les études de complexation par électrophorèse, le tampon

Hepes 5 mM a été privilégié dans les mêmes proportions. Une fois mélangés, les échantillons ont été ajoutés sur les cellules, pour les tests de transfection *in vitro*, ou mélangés au tampon avec dépôt dans les puits pour les tests électrophorétiques.

3.2. Tests électrophorétiques pour les études de complexation de siARN

Pour l'étude des complexes et de la rétention, une électrophorèse sur gel d'agarose a permis de séparer les siARN libres des siARN complexés aux particules, et ainsi déterminer le rendement de complexation. En suivant le protocole de complexation, une concentration en siARN de 20 µg/mL, soit 1,5 µM, a été utilisée pour cette étude. Pour des ratios molaires N/P allant de 1/1 à 12/1, les concentrations lipidiques en cLNPa associées varient de 130 µg/mL à 1,6 mg/mL pour les cLNPa. Pour les cLNpb, ne possédant pas la même quantité de DOTAP, les concentrations en lipides varient de 380 µg/mL à 4,6 mg/mL, pour les mêmes ratios N/P.

Les complexes ont été déposés dans les puits d'un gel comprenant 4% d'agarose et l'électrophorèse a été effectuée sur un E-gel Imager (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suivant le protocole fourni pour l'utilisation de cet appareil. Les siARN couplés à l'Alexa-488 (excitation : 496 nm ; émission : 519 nm) sont révélés par fluorescence. De même, l'encapsulation du DiD par les cLNP (excitation : 644 nm ; émission : 665 nm) permet une révélation par fluorescence. Pour cette application, la concentration en DiD de la solution de particule utilisée a été estimée à 10 µmol/L.

4. Transfection

4.1. Culture cellulaire - mise en place des modèles

Toutes les cellules étudiées lors de ces travaux ont été fournies par ATCC (Manassas, VA, USA). De plus, pour tous les modèles cellulaires étudiés, le milieu de culture a été changé toutes les 48 heures et les cellules ont été repiquées lorsque la confluence était d'environ 80%. Les cellules ont été maintenues dans des conditions optimales (37°C, 5% CO₂, 95% d'humidité) dans un incubateur.

Concernant les expériences de transfection sur cellules immortalisées étudiées dans les chapitres III et V, les lignées (PC3, Hela, U2OS) ont été modifiées, par transfection du plasmide pEGFPC1 (Clontech, CA, USA), pour sur-exprimer de façon stable la protéine GFP. Pour les PC3, les cellules ont été transfectées par un agent commercial, la Lipofectamine 2000, selon les

recommandations données par le fournisseur. Pour les cellules Hela, l'internalisation des plasmides est permise par un protocole d'électroporation, suivant les informations du fournisseur. Enfin, les cellules U2OS ont été transfectées par un lentivirus. Une sélection clonale a été effectuée par dilution limite dans des plaques 96 puits afin d'obtenir une seule cellule par puits. Chaque puits présentant une unique colonie cellulaire a été cultivé et analysé en cytométrie de flux (FACS BD LSRII) afin d'isoler les clones possédant le profil de fluorescence GFP le plus pertinent pour notre étude, c'est-à-dire une expression modérée. Une analyse sur 10^4 cellules a été effectuée avec le logiciel FACSDiva (BD Biosciences, New Jersey, USA). Cependant, malgré les nombreux clones testés, il n'a pas été possible d'obtenir des clones exprimant modérément cette protéine, et seuls des clones exprimant très fortement la GFP ont finalement pu être amplifiés.

Pendant l'entretien des lignées, les cellules sur-exprimant la protéine GFP ont subi une sélection par un agent, la généticine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilisé à une concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les cellules modifiées pour exprimer la GFP possèdent un gène de résistance à cet antibiotique, la néomycine phosphotransférase. Ce gène code pour l'enzyme aminoglycoside 3'-phosphotransférase qui inactive la généticine par phosphorylation, conférant ainsi une résistance à cet antibiotique.

Les cellules humaines de type PC3, dérivées d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome de grade IV issu de la prostate, ont été cultivées avec du milieu RPMI Glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (PAA) et 1% d'antibiotique (pénicilline/streptomycine, Invitrogen). Les cellules Hela, issues d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, ont été cultivées avec du milieu DMEM Glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotique. Les cellules U2OS, dérivées d'un ostéosarcome des os du tibia humain, ont été cultivées avec le même milieu de culture que les cellules Hela.

Trois modèles cellulaires réputés difficile à transfecter ont également été étudiés dans le chapitre VI. Les Huvec, cellules endothéliales humaines primaires issues de la veine ombilicale, ont été cultivées sur un revêtement de fibronectine ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) avec du milieu complet EndoGRO (Millipore, Molsheim, France). Les cellules Jurkat, une lignée humaine immortalisée de lymphocyte T, sont des cellules non-adhérentes cultivées avec du RPMI complémenté comme les cellules PC3. Les cellules PC12, dérivée d'un phéochromocytome de la médullosurrénale du rat, possèdent la particularité de pouvoir se différencier en structures hautement différenciées proche des neurones avec un traitement adéquat. Ces cellules ont été cultivées sur une matrice de collagène IV ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en présence de milieu RPMI Glutamax complémenté de 10% de sérum de cheval inactivé par

la chaleur (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 5% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotique. La différenciation en structures proche des neurones a été induite par l'addition de 50 ng/mL de NGF (*Nerve Growth Factor*, Millipore, Molsheim, France) dans le milieu de culture, pendant cinq à sept jours. L'origine embryologique des cellules neuroblastiques signifie que les cellules PC12 peuvent facilement se différencier en cellules proches des neurones, même si elles ne sont pas considérées comme des neurones adultes. Cependant, elles partagent des propriétés semblables aux neurones, notamment pour la libération des neurotransmetteurs.

4.2. Cytotoxicité des nanoparticules cationiques

Les cellules PC3 ont étéensemencées à 2.10^5 cellules/mL dans des plaques 96 puits (Nunc) puis incubées en présence de nanoparticules à différentes concentrations. La complexation se rapportant à la concentration en DOTAP lors de l'établissement de ratio N/P, nous nous sommes appuyés sur ce référentiel pour exprimer la quantité de nanoparticule testée. Ainsi, des quantités de nanoparticule, ayant des concentrations en DOTAP de 3,13 à 200 µg/mL, ont été incubées en présence des cellules pendant 24 heures. Puis le milieu de culture a été changé pour une nouvelle incubation de 24 heures. Chaque concentration a été testée six fois.

Le test WST-1 est basé sur la réduction de la molécule WST-1 (ou *water-soluble tetrazolium-1*) permise par l'activité déshydrogénase des enzymes de la chaîne mitochondriale (Figure E-4). De façon plus précise, la molécule WST-1 se retrouve dans le milieu extracellulaire en raison de ses deux groupements sulfonates chargés négativement bloquant son internalisation [7]. Ainsi, WST-1 est réduit de façon extracellulaire suite à un transport d'électrons à travers la membrane plasmique, autorisant une cascade d'oxydo-réduction depuis le cofacteur NADH. Les sels de tétrazolium sont alors clivés en Formazan, dont l'absorbance reflète la quantité de cellule métaboliquement active en culture [7]. Une augmentation de l'absorbance de cette molécule témoigne d'une augmentation du nombre de cellules viables ou d'une activité de la chaîne mitochondriale exacerbée. À l'inverse, une diminution de l'absorbance de cette molécule peut être expliquée par une diminution de l'activité de la chaîne mitochondriale et/ou une diminution de la quantité de cellules suite à la mort cellulaire.

L'activité métabolique des cellules a été estimée en ajoutant 10% de WST-1 (Roche), un réactif dérivé de formazan soluble, pendant trois heures. Des cellules sans nanoparticule et des cellules incubées avec une solution de 10 mM de H₂O₂ représentent respectivement les contrôles négatifs et positifs. L'absorbance a ensuite été mesurée à 450 nm (titration du formazan soluble) et à 690 nm (bruit de fond) à l'aide d'un lecteur de microplaque (Infinite M1000, Tecan). La différence

d'absorbance (450 nm – 690 nm) est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La viabilité cellulaire a ainsi été déterminée à partir de l'équation : Viabilité (%) = ((AE-ACP)/(ACN-ACP)x100) ; AE, ACP et ACN représentent respectivement les absorbances de l'échantillon, du contrôle positif et du contrôle négatif.

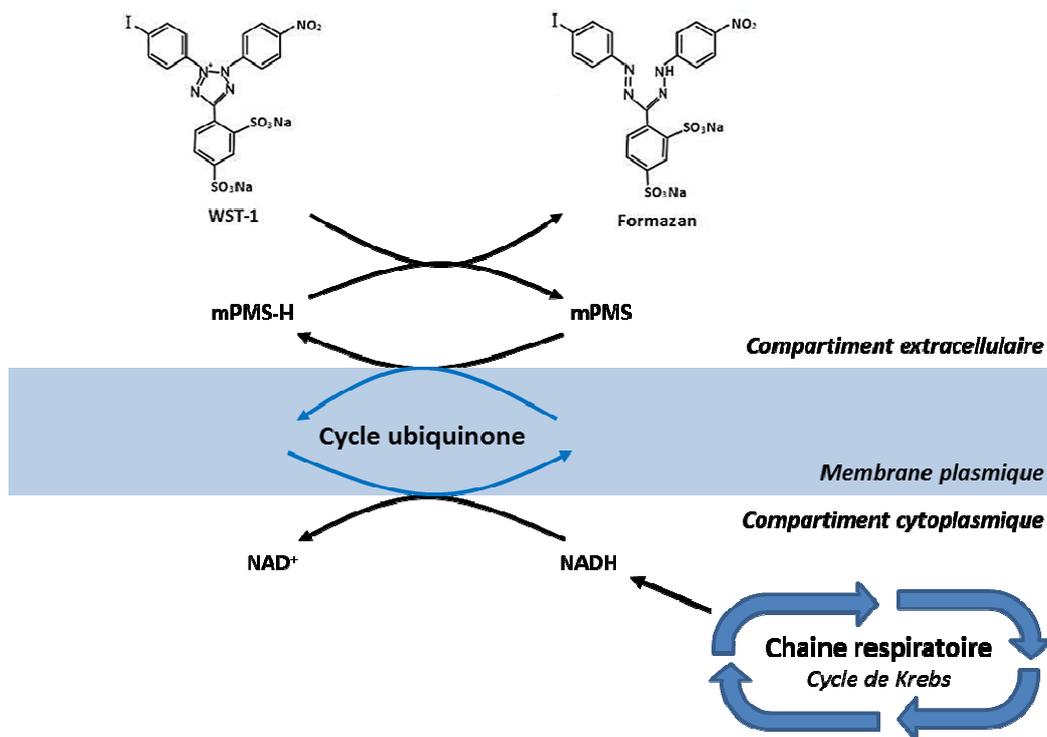


Figure E-4. Principe de l'étude de cytotoxicité par un test WST-1 : le test WST-1 permet de quantifier l'activité métabolique des cellules en culture.

La cytolysse et la cytotoxicité cellulaire a été suivie par la quantification du lactose déshydrogénase (LDH). La présence de LDH entraîne la conversion de lactate en pyruvate, réduisant ainsi le NAD^+ en NADH. Cette réaction entraîne la réduction des sels d'ionodinitrotétrazolium en formazan en présence de diaphorase (Figure E-5). La LDH extracellulaire dans le milieu de culture a été mesurée par une réaction enzymatique (Pierce LDH cytotoxicity assay kit, ThermoScientific) de 45 minutes qui aboutit à un produit rouge (formazan) dont l'absorbance a été lue à 490 nm et 680 nm avec le lecteur de microplaque. Des cellules avec 10% d'eau et 10% de tampon de lyse 10X ont été étudiées pour déterminer le relargage spontané de LDH et le relargage maximum de LDH. Le pourcentage de cytotoxicité, avec comme témoin la quantité de LDH, a été évalué à partir de l'équation : Cytotoxicité (%) = ((AE-ARS)/(ACP-ARS)x100) ; AE, ARS et ACP

représentent respectivement les absorbances de l'échantillon, du relargage spontané et du contrôle positif.

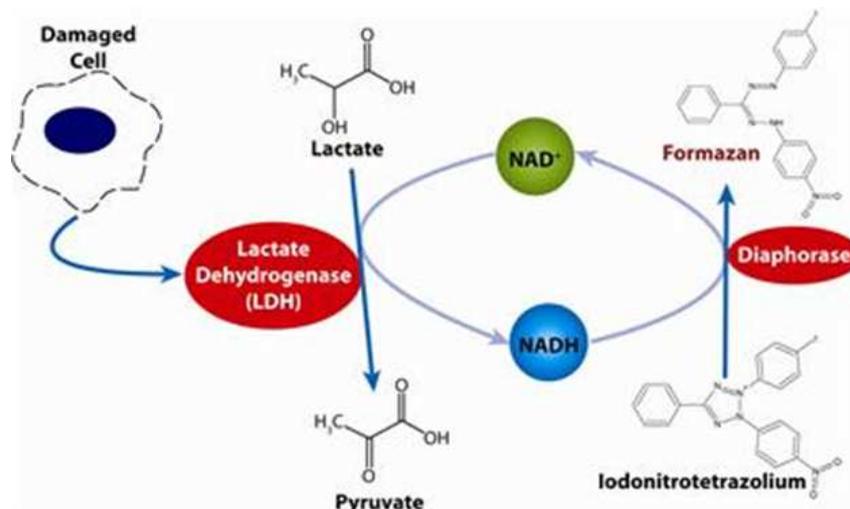


Figure E-5. Principe de l'étude de cytotoxicité par la mesure du LDH relargué : la mesure de l'enzyme LDH dans le milieu extracellulaire permet d'établir le niveau d'intégrité de la membrane plasmique.

Un test d'efficacité de formation de colonie (*Colony Forming Efficiency* ou CFE) a également été testé après une incubation des cellules pendant 72 heures (10^4 cellules/cm²) et un traitement de 72 heures avec différentes quantités de cLNP possédant des concentrations en DOTAP de 3,13 à 200 µg/mL. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X, puis fixées avec du paraformaldéhyde 2%. Pour finir, une coloration par du Giemsa 0,02% a permis de compter manuellement les colonies dans les boîtes de pétri.

4.3. Étude de l'internalisation des nanoparticules et des siARN

Les cellules PC3 et Jurkat ont étéensemencées dans des plaques 12 puits (10^5 cellules/puits) 24 heures avant transfection, tandis que pour les Huvec, des plaques 6 puits recouverts de fibronectine ont été utilisées ($5 \cdot 10^4$ cellules/puits). Les PC12 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits recouverts de collagène IV ($5 \cdot 10^4$ cellules/puits), puis traitées cinq à sept jours avec du NGF pour induire la différenciation en structures proches des neurones.

Des nanoparticules cLNP encapsulant 0,3 µmol/L de DiD, complexées ou non aux siARN marqués par de l'Alexa-488, ont été ajoutées aux cellules pour différents temps d'incubation, entre 30 minutes et 6 heures, afin d'établir une cinétique d'internalisation. À la fin de l'expérience, les cellules ont été lavées deux fois par du PBS 1X, puis décollées à l'aide de trypsine. Une analyse de la

fluorescence sur 10^4 évènements par cytométrie en flux (FACS BD LSRII) a permis d'évaluer les vitesses d'internalisation. Pour l'étude de l'internalisation de siARN-Alexa488, les cellules ont été incubées en présence de bleu trypan 1% pour inhiber la fluorescence extracellulaire.

Concernant l'étude des mécanismes d'internalisation des nanoparticules cLNPa-DiD, complexées ou non aux siARN-Alexa488, un traitement de 30 minutes avec différents antibiotiques a été réalisé afin d'inhiber sélectivement certaines voies d'entrée dans les cellules. Le nocodazole, perturbateur de l'arrangement des microtubules, a été utilisé à une concentration de 20 μM ; la cytochalasine A, inhibant la polymérisation de l'actine, a été déposée sur les cellules à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la génistéine et la chlorpromazine, inhibiteurs respectifs des voies d'endocytose dépendantes des cavéolines et des clathrines, ont été utilisées à une concentration de 200 μM et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les cellules traitées ont ensuite été incubées en présence des particules, ou des complexes particules/siARN, pendant deux heures. Enfin, les cellules ont été lavées deux fois par du PBS 1X, décollées, puis fixées par du paraformaldéhyde 2%. Une analyse de la fluorescence sur 10^4 évènements par cytométrie en flux (FACS BD LSRII) a été effectuée à l'aide du logiciel FACSDiva.

4.4. Étude de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle

L'analyse des efficacités d'inhibition fonctionnelle des LNP a été réalisée sur quatre types de modèle différents. Pour le premier modèle, l'inhibition de la fluorescence verte de cellules sur-exprimant la protéine GFP a été permise par l'internalisation de siGFP-22 (Qiagen, Pays-Bas). Les cellules traitées ont été décrites précédemment (PC3, Hela, U2OS). Les cellules ont été transfectées par des concentrations finales en siARN de 20 nM pendant 72 heures.

Les autres modèles testés pour l'étude de l'inhibition fonctionnelle concernent les cellules réputées comme étant difficile à transfecter (Huvec, Jurkat, PC12 différenciées). Ainsi, les concentrations finales en siARN utilisées ont été augmentées jusqu'à 50 nM.

Le second modèle concerne les cellules Huvec : les siARN Cell death, induisant la mort cellulaire chez les cellules humaines, ont été transfectées pendant 48 heures. La quantification de la viabilité cellulaire est permise par l'utilisation du kit WST-1 (Roche) décrit précédemment.

De même, les cellules non-adhérentes de type Jurkat ont été transfectées pendant 48 heures par des siARN autorisant l'inhibition des récepteurs de surface CD2 (siARN CD2, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Afin de quantifier l'efficacité de transfection, un anticorps fluorescent,

utilisé à une concentration de 0,4 µg/mL pendant 2 heures, a permis de cibler spécifiquement ces récepteurs (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA).

Les PC12, différenciées en structure proche des neurones, possèdent des récepteurs au facteur de croissance NGF, p75, dont les ARNm sont ciblés spécifiquement par des siARN NGF p75 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Après une transfection de 72 heures, la quantification de l'efficacité de transfection fonctionnelle a été permise par une incubation de 2 heures avec 4 µg/mL d'anticorps fluorescent reconnaissant spécifiquement le récepteur p75 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA).

Le siAllstar, n'induisant aucune inhibition post-transcriptionnelle chez les cellules de mammifère, a été utilisé en tant que contrôle négatif pour chacune des expériences de transfection fonctionnelle, à la même concentration que le siARN testé. Hormis pour les tests sur les cellules Huvec (voir protocole de cytotoxicité avec le kit WST-1), les quantifications des niveaux d'expressions des protéines d'intérêt ont été réalisées par cytométrie en flux de type FACS BD LSRII, piloté par le logiciel FACSDiva. Les résultats représentent la moyenne de 10^4 évènements des conditions réalisées en triplicat. Les contrôles effectués avec les différents agents de transfection commerciaux ont été effectués en suivant les protocoles donnés par les différents fournisseurs.

Une cinétique d'inhibition fonctionnelle de la protéine GFP, sur-exprimée par les cellules PC3, a été réalisée par vidéomicroscopie. Ainsi, une image a été prise toutes les 20 minutes pendant 26 heures, sur un même champ, en utilisant un grossissement x10 (Zeiss).

4.5. Immuno-détection de la protéine par immuno-empreinte (Western-blotting)

Après transfection, les cellules PC3-GFP ont été lavées deux fois avec du PBS 1X, contenant calcium et magnésium, puis incubées 10 minutes à 4°C en présence de tampon de lyse RIPA (Roche) contenant un cocktail complet d'inhibiteurs de protéase. Les lysats obtenus sont centrifugés pendant 10 minutes, à 4°C, à 14.10^3 G.

La concentration en protéine totale a été évaluée par un dosage de type BCA (Pierce). Cette méthode s'appuie sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique, un réactif hautement spécifique de l'ion cuivreux Cu(I) permettant d'obtenir une couleur pourpre en sa présence. Les protéines réduisant

l'ion cuivrique Cu(II) en ion cuivreux Cu(I), l'absorbance mesurée à 562 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéine. Ainsi, après réalisation d'une gamme d'étalonnage avec une protéine de référence, la BSA, la quantité de protéine totale a été mesurée afin de rapporter chaque échantillon à une même concentration. Les échantillons, contenant 10 µg de protéine, ont été mélangés avec un agent réducteur (DTT) et un tampon Laemmli contenant 10% de SDS, puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Ensuite, les échantillons ont été déposés dans un gel de polyacrylamide, avec un gradient de 4 à 12% (NuPAGE, Invitrogen), pour une étape d'électrophorèse de 45 minutes à 120 V. La migration des protéines s'effectue ainsi en fonction de leur masse moléculaire apparente.

Après cette étape de migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham, Royaume-Uni) pendant 1 heure (30V-175mA). La qualité du transfert a été évaluée par une étape de marquage des protéines au rouge ponceau, puis les sites de fixation non-spécifiques ont été saturés par du lait en poudre écrémé 5% (m/v dans un tampon TBS Tween 1X). Les protéines d'intérêt ont alors subi un marquage primaire avec des anticorps ciblant les protéines GFP et le contrôle α -tubuline (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni. Ac de souris spécifiques des protéines humaines). Ces anticorps ont été dilués au 1/5000 dans un tampon TBS Tween 1X contenant 5% de lait en poudre écrémé (m/v), et le marquage a été effectué durant une nuit à 4°C. Après un lavage répété avec le tampon TBS Tween 1X, la membrane de nitrocellulose a été incubée 1 heure avec un anticorps secondaire reconnaissant l'isotype de l'anticorps primaire (Jackson Immunoresearch, PA, USA), utilisé à une dilution au 1/5000 dans un tampon TBS Tween 1X contenant 5% de lait en poudre écrémé (m/v). Un kit ECL (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) a permis la révélation, et ainsi la détection des protéines par immuno-empreinte. La quantification des données a ensuite été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ (n = 3). L'intensité relative a été calculée, pour chaque échantillon, en divisant l'intensité absolue représentant la protéine GFP par l'intensité absolue représentant le contrôle α -tubuline.

5. Culture tridimensionnelle des cellules PC3

5.1. Protocole de formation des sphéroïdes

Les cellules PC3 sur-exprimant la GFP ont été cultivées selon le protocole développé dans notre laboratoire. Pour cela, du matrigel (BD Biosciences, New Jersey, USA) a été déposé dans les chambres de culture d'une lame LAB-TEK 4 puits (Dutscher, Brumath, France) pour ainsi permettre aux cellules de se développer de façon tridimensionnelle dans cette matrice. Après 30 minutes

d'incubation à 37°C, le matrigel se solidifie. Ainsi, les cellules ont été déposées dans les différentes chambres (7.10^3 cellules/chambre) avant une nouvelle incubation de 30 minutes, autorisant les cellules à sédimenter à l'intérieur de la matrice. Après ce nouveau temps d'incubation, du milieu de culture RPMI Glutamax, supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotique, et contenant 8% de matrigel, a été ajouté avec précaution dans les chambres de culture.

Le milieu de culture a, en parti, été changé tous les deux jours. Seulement 60% du milieu a été renouvelé afin de ne pas altérer la couche de matrigel. Après quatre jours d'incubation, les cellules ont été visualisées sous forme d'amas tridimensionnels, majoritairement composés de sphéroïdes, voire d'acinis. Ces structures ont ainsi été soumises à des expériences de transfection.

5.2. Transfection et analyse des résultats

Le protocole de complexation et de transfection reste identique aux étapes décrites précédemment. La récupération de cellules pour une analyse au cytomètre en flux nécessite cependant des étapes supplémentaires. Le matrigel a été dépolymérisé pendant 40 minutes, à 4°C, à l'aide de *Cell Recovery*[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), permettant aux cellules d'être libérées sans dommage. Par ailleurs, les cellules ont été incubées 15 minutes supplémentaires en présence de trypsine EDTA afin de favoriser leur détachement et pour obtenir des cellules individualisées. Après ces traitements, les cellules traitées peuvent être analysées par cytométrie en flux comme précédemment.

Un test de cytotoxicité a été réalisé sur des cellules PC3, n'exprimant pas la GFP, cultivées dans du matrigel afin de former des structures tridimensionnelles. Ainsi, des étapes de transfection ont été réalisées, comme décrit précédemment, avec un siARN contrôle de type siAllstar. La quantification du nombre de cellules apoptotiques a été permise par l'utilisation de *CellEvent*[®]. Ce produit à la particularité d'être clivé lors de l'activation des caspases 3 et 7, autorisant une liaison à l'ADN et entraînant ainsi une émission de fluorescence à 530 nm.

Bibliographie

1. Delmas T, Couffin A-C, Bayle PA, de Crécy F, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J, Texier I. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *Journal of colloid and interface science*. 2011 Aug 15;360(2):471–81.
2. Delmas T. Caractérisation physicochimique et compréhension des propriétés de vectorisation des nanoparticules lipidiques pour les applications biomédicales. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie. 2011.
3. del Pozo-Rodríguez a, Delgado D, Solinís M a, Gascón a R, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *International journal of pharmaceutics*. 2007 Jul 18;339(1-2):261–8.
4. Montana G, Bondì ML, Carrotta R, Picone P, Craparo EF, San Biagio PL, Giamonna G, Di Carlo M. Employment of cationic solid-lipid nanoparticles as RNA carriers. *Bioconjugate chemistry*. 2007;18(2):302–8.
5. Sioud M, Sørensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003 Dec;312(4):1220–5.
6. Barichello JM, Kizuki S, Tagami T, Soares LAL, Ishida T, Kikuchi H, et al. Agitation during lipoplex formation harmonizes the interaction of siRNA to cationic liposomes. *International journal of pharmaceutics*. 2012 Jul 1;430(1-2):359–65.
7. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005 Jan;11(05):127–52.

CHAPITRE III

**Conception de nanoparticules
lipidiques cationiques en vue de
transférer des ARNi**

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN	151
1. Les différentes classes de nanoparticules lipidiques	153
1.1. Les nanoémulsions	155
1.2. Les vecteurs lipidiques solides	156
1.3. Les nanovecteurs lipidiques nanostructurés	157
1.4. Conclusion sur les différentes classes de nanoparticules lipidiques	158
1.5. Les vecteurs développés au CEA-LETI : les LNP	159
2. Stratégie de modification des nanoparticules LNP	160
2.1. Approche par modification de surface des particules	160
2.2. Preuve de concept : les LNP pour la transfection	162
2.2.1. Formulation de particules cationiques cLNP	162
2.2.2. Résultats préliminaires en transfection fonctionnelle	166
2.2.3. Conclusion des essais préliminaires	168
2.3. Rationalisation de l'étude : développement d'un plan d'expérience	169
2.3.1. Plan mathématique	169
2.3.2. Mise en place du plan d'expérience	169
2.3.3. Optimisation du plan d'expérience	171
2.3.4. Modélisation des différentes réponses obtenues	172
2.3.4.1. Interprétation de la réponse quantitative en polydispersité	172
2.3.4.2. Interprétation de la réponse quantitative pour la stabilité dans les milieux	174
2.3.4.3. Interprétation de la réponse quantitative pour l'efficacité d'inhibition fonctionnelle	176
2.3.4.4. Bilan du plan d'expérience	179
3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules issues du plan d'expérience	182
3.1. Caractéristiques des nanoparticules cationiques cLNPA et cLNPb	182
3.2. Compréhension des particules cLNPA et cLNPb à travers leur composition	183
3.3. Étude de la stabilité colloïdale des cLNP	185
4. Discussion	188
5. Conclusion sur la conception des cLNP	189

L'objectif de ces travaux de thèse consiste à élaborer un vecteur lipidique, pour la transfection de siARN, permettant de surmonter les limites des techniques actuellement disponibles (voir chapitre II). Ainsi, nous souhaitons développer un vecteur générique autorisant une transfection fonctionnelle efficace de siARN, chez les cellules immortalisées comme chez les cellules difficiles à transférer. Par ailleurs, ce vecteur doit présenter une méthode de fabrication simple et reproductible, pour permettre une transposition à l'industrie, une stabilité colloïdale élevée et une innocuité avérée.

En ce sens, nous nous sommes appuyés sur des nanoparticules lipidiques très stables possédant un cœur hydrophobe, les LNP (*Lipid NanoParticles*), développées dans nos laboratoires pour des applications d'imagerie *in vivo*, ou de délivrance de principes actifs, après une injection systémique [1-6]. Ainsi, nous souhaitons utiliser cette base de formulation en préservant les propriétés intéressantes, stabilité colloïdale [7] et innocuité notamment [8], tout en implémentant des caractéristiques favorisant la transfection de siARN. La stratégie que nous avons choisi de développer, en accord avec les propriétés souhaitées décrites dans le chapitre II, consiste à modifier les particules lipidiques en surface pour favoriser l'établissement de liaisons électrostatiques avec les siARN. De cette façon, les étapes de complexation peuvent être effectuées post-formulation et autoriser le test de milliers de siARN différents avec un unique lot de particules.

Ce chapitre décrit les différents types de nanoparticules lipidiques, possédant un cœur hydrophobe, et plus particulièrement les LNP développées au sein de nos laboratoires. Leurs caractéristiques, ainsi que la stratégie employée pour un transfert de cette technologie vers des applications de transfection, sont également exposées de façon détaillée. Ce chapitre est conclu par la description des formulations lipidiques, optimisées par une approche mathématique, pour la délivrance de siARN.

1. Les différentes classes de nanoparticules lipidiques

De par leur origine physiologique, les lipides ont largement été utilisés comme matériaux pour former des systèmes biocompatibles, biodégradables et bioassimilables [9, 10]. Les chercheurs ont ainsi développé différentes familles de vecteurs lipidiques tels que les liposomes, les nanocapsules et les nanosphères de lipides [11, 12, 13]. Déjà évoqué dans le chapitre II, nous ne nous attarderons pas sur les liposomes dont les limites mentionnées, notamment en termes de stabilité, ne correspondent pas aux critères souhaités.

Dès lors, nous nous focaliserons sur les nanosphères qui ont la particularité de pouvoir encapsuler des molécules hydrophiles (Figure III-1). Pour rappel, ce type de particule peut se détailler en plusieurs générations tout comme les liposomes. En effet, la seconde génération voit l'incorporation de polymères de type PEG, en surface des particules, permettant de favoriser les propriétés de furtivité et de stabilité. Une troisième génération consiste à fonctionnaliser la particule avec des agents de ciblage tels que des anticorps ou des molécules favorisant la reconnaissance de récepteurs spécifiques présents sur la cellule.

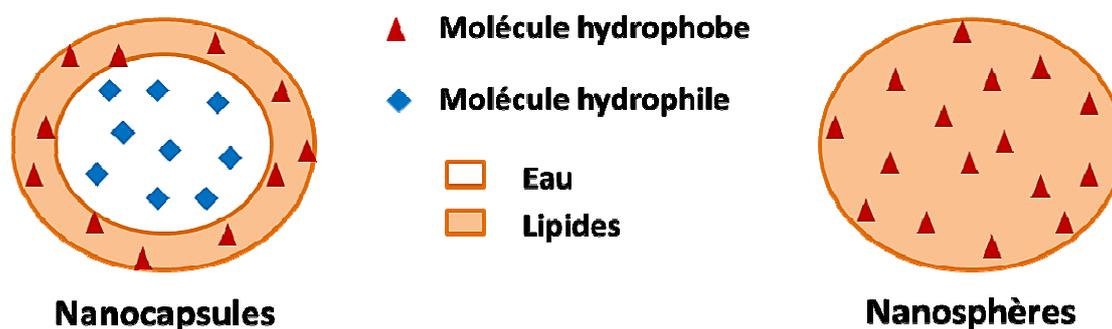


Figure III-1. Nanocapsules et nanosphères lipidiques : contrairement aux nanocapsules qui renferment un cœur hydrophile, les nanosphères représentent une goutte entièrement lipidique permettant uniquement l'encapsulation de molécules lipophiles.

Par ailleurs, ces particules présentent également des avantages liés à leur procédé de fabrication, la possibilité de transposition à grande-échelle et un contrôle important des cinétiques de relargage des molécules encapsulées [12, 14]. En ce qui concerne leur fabrication, ces particules présentent l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de solvant, limitant les coûts de production et les problèmes de leur élimination [11], contrairement à ce qui se fait avec les polymères par exemple. En effet, la production de nanosphères lipidiques est basée sur la simple préparation d'émulsions par agitation mécanique, par homogénéisation haute pression ou encore par utilisation d'ultrasons [11, 15, 16]. Ces techniques permettent d'apporter la quantité d'énergie nécessaire à la formation de petites particules. En outre, ces procédés permettent d'obtenir des concentrations particulières très élevées et sont transposables à l'industrialisation [11], apportant des avantages respectivement par rapport aux polymères et aux liposomes.

Ainsi, différentes classes de vecteur lipidique peuvent être différenciées : les nanoémulsions, les SLN (ou *Solid Lipid Nanoparticles*) et les NLC (ou *Nanostructured Lipid Carriers*).

1.1. Les nanoémulsions

Les nanoémulsions sont des dispersions de gouttelettes nanométriques formées par rupture due au cisaillement. En effet, par convention, le terme « nano » peut être exprimé quand au moins l'une des dimensions de l'objet se trouve dans une gamme allant de 1 à 100 nanomètres. De façon plus précise concernant la taille, il est nécessaire de mentionner si le rayon de la goutte ou son diamètre est pris en compte ; en général, la définition la plus souple est appliquée dans laquelle la grande majorité des gouttelettes ont des rayons inférieurs à 100 nm [17]. Dans le cadre des nanosphères lipidiques, ce sont des gouttelettes d'huile stabilisées par des tensio-actifs dans une phase continue aqueuse [18, 19].

Les tensio-actifs possèdent une structure amphiphile leur conférant une affinité pour les interfaces huile/eau. Ils ont la capacité de diminuer la tension de surface, permettant de réduire l'énergie libre alors utilisée pour la formation des particules. De plus, les tensio-actifs permettent d'éviter la recombinaison immédiate des gouttes formées en apportant des répulsions électrostatiques et/ou stériques entre elles.

L'avantage de telles particules est qu'elles peuvent solubiliser une large quantité de molécules présentant un caractère lipophile. Cependant, ces systèmes présentent une stabilité limitée due à une dégradation physique par mûrissement d'Ostwald et/ou par coalescence (Figure III-2). La coalescence est due à la rupture de la paroi séparant deux gouttelettes, tandis que le mûrissement d'Ostwald est issu d'une différence de pression à l'intérieur des gouttelettes lipidiques. En effet, la pression à l'intérieur de la gouttelette dépendant de sa taille, les plus petites particules se vident dans les particules plus grandes et disparaissent. Ces deux phénomènes conduisent à la déstabilisation des gouttelettes et à la séparation de la phase huile/eau [18, 20]. En outre, la dilution élevée lors de l'utilisation de ces particules peut entraîner la désorption des surfactants, pouvant également induire une déstabilisation majeure [21]. Ainsi, la dilution provoquée par l'utilisation de ces particules peut entraîner une perte des molécules encapsulées. Enfin, de par la faible viscosité du cœur de la particule et le manque de rigidité de la membrane des surfactants, les molécules encapsulées peuvent être rapidement relarguées par diffusion [22]. C'est pourquoi de nouveaux systèmes particuliers ont été développés afin d'améliorer ces caractéristiques, notamment en termes de stabilité.

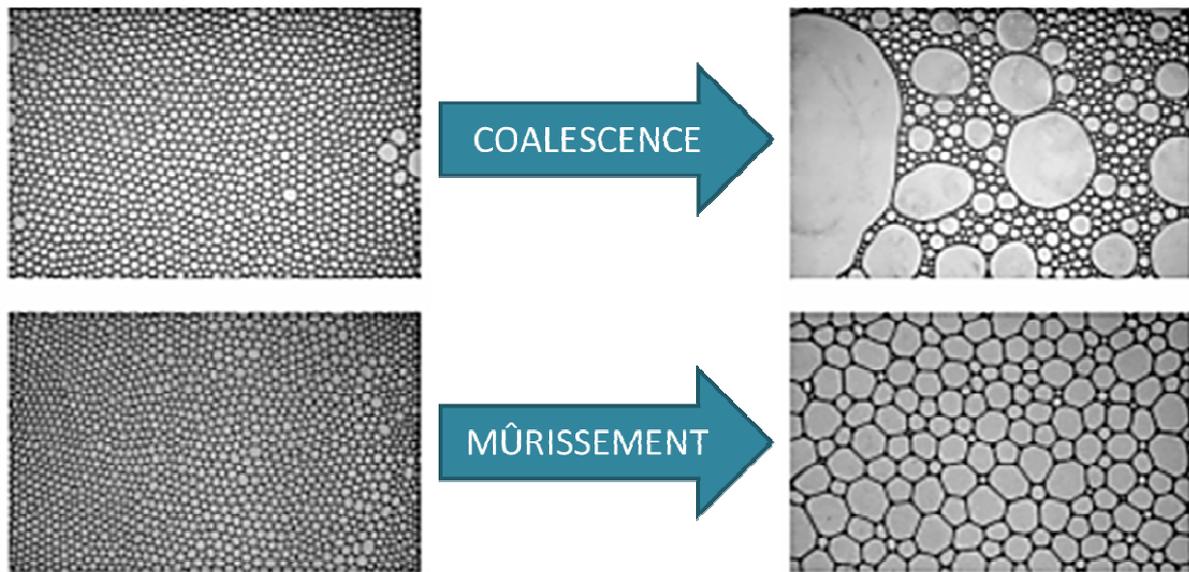


Figure III-2. Principes de déstabilisation des gouttelettes : les principes physique de coalescence et de mûrissement conduisent à une déstabilisation majeure des gouttelettes induisant la séparation des phases huile/eau (images issues du Laboratoire de Physique des Solides : <https://www.equipes.lps.u-psud.fr/sil/spip.php?rubrique77>).

1.2. Les nanoparticules lipidiques solides

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont identiques aux nanoémulsions, à la seule différence qu'elles possèdent un cœur comprenant des lipides solides cristallins (Figure III-3). Les SLN se composent ainsi de triglycérides à longues chaînes alkyles, de cires ou encore d'acides carboxyliques, l'ensemble étant stabilisé par des tensio-actifs [11]. Le renforcement du cœur permet de limiter les phénomènes de mûrissement d'Ostwald, ainsi que d'améliorer les stratégies d'encapsulation et de relargage des molécules prise en charge au niveau du cœur. Dès lors, selon la position de la molécule au sein de la particule (au niveau du cœur ou en périphérie), un relargage plus ou moins rapide peut être déterminé pour obtenir un contrôle plus précis.

Cependant, la cristallisation des lipides limite le taux de charge au sein des SLN [11, 12]. En outre, ce cœur dense et la modification de l'arrangement des lipides au cours du temps peuvent induire une expulsion des principes actifs encapsulés au cours du stockage [11, 12]. Par ailleurs, cette cristallisation peut entraîner une gélification de la particule nuisant à sa stabilité colloïdale [13]. Afin de limiter ces inconvénients, une autre classe de nanoparticule lipidique a été développée : les NLC.

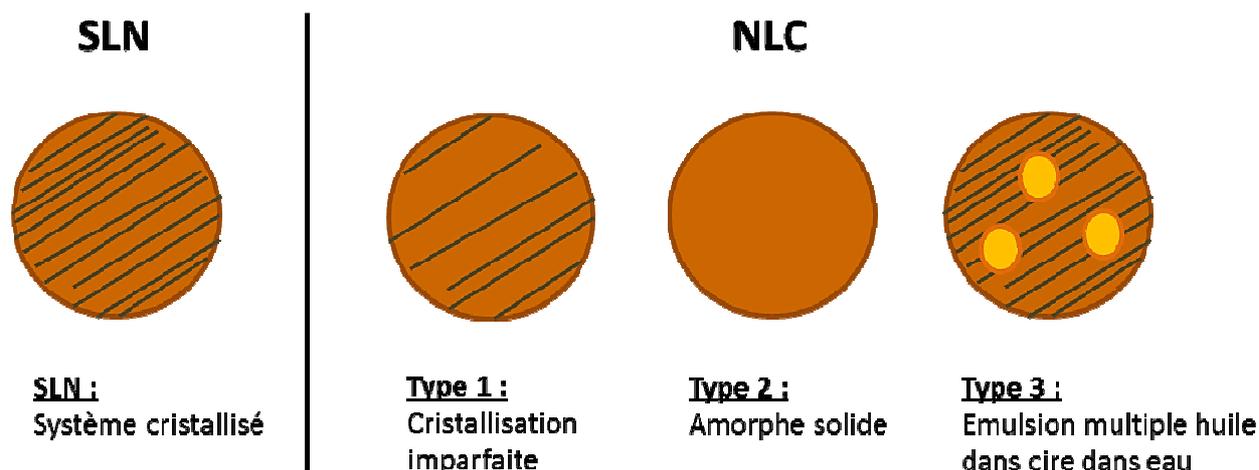


Figure III-3. Les différents types de particules lipidiques solides : Alors que les SLN possèdent un cœur totalement cristallisé, les NLC ne sont que partiellement cristallisés.

1.3. Les nanovecteurs lipidiques nanostructurés

Les nanovecteurs lipidiques nanostructurés (NLC) possèdent des structures relativement proches des SLN. Le changement réside essentiellement dans une conception physico-chimique différente au niveau du cœur de la particule. Dans le cadre de formulation de particules de type NLC, le cœur est constitué d'un mélange de lipides chimiquement très différents, certains étant solides et d'autres liquides. Le principe est de limiter la perfection des cristaux de lipides, créant ainsi des volumes libres dans la particule pour favoriser l'insertion des molécules à encapsuler [23].

En fonction de la compatibilité entre les différents lipides utilisés, plusieurs structures peuvent théoriquement être obtenues (Figure III-3) : le modèle de cristallisation imparfaite, le modèle amorphe solide et le modèle d'émulsions multiples d'huile dans cire dans eau [24] :

- Type 1 – modèle de cristallisation imparfaite : une cristallisation imparfaite du cœur est obtenue par un mélange complexe de glycérides possédant différents degrés d'hydroxylation et différentes longueurs de chaînes alkyles. Ainsi, une matrice lipidique partiellement ordonnée est obtenue, limitant la cristallisation néfaste à la stabilité et à l'encapsulation de principes actifs.

- Type 2 – modèle amorphe : l'hétérogénéité importante du mélange lipidique composant le cœur de la particule permet de s'émanciper totalement de la cristallisation des lipides. De cette façon, une matrice solide, mais amorphe, est obtenue.

- Type 3 – modèle d'émulsions multiples d'huile dans cire dans eau : ce modèle est plus complexe et voit la formation de globules huileux, liquides, dans une matrice solide

crystallisée composée de cire. Ces globules constitués un site privilégié pour l'encapsulation d'une plus grande quantité de molécule lipophile dont la diffusion est limitée par la matrice solide.

Néanmoins, les modèles de type 2 et de type 3 sont critiqués au niveau de la littérature. En effet, différentes équipes rapportent des conclusions divergentes et des théories réfutant la faisabilité de ces modèles de particule. L'obtention de solides amorphes a été remise en cause, suggérant que les lipides non cristallisés se trouvaient finalement dans un état de surfusion liquide et non dans un état solide [25, 26]. De même, la modèle 3 semble, dans la plupart des cas, aboutir au modèle 1, certaines équipes rapportant une séparation complète de l'huile liquide et des lipides cristallisés [27].

1.4. Conclusion sur les différentes classes de nanoparticules lipidiques

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il est nécessaire d'obtenir des particules possédant une stabilité élevée au cours du temps. Ainsi, les propriétés favorisant la transfection de siARN pourront être maintenues, permettant un stockage sur le long terme. Par ailleurs, la possibilité d'encapsuler des molécules dans le cœur de la particule constitue un atout indéniable pour obtenir un objet autorisant la multifonctionnalité : la co-délivrance de siARN complexés en surface et de molécules anticancéreuses lipophiles peut être envisagée pour des applications de multi-thérapie.

Les nanoparticules lipidiques réunissent différents types de structures présentant des propriétés de biocompatibilité et biodégradabilité. L'état liquide des nanoémulsions facilite l'encapsulation de quantités importantes de principes actifs mais limite le contrôle de leur cinétique de relargage. Surtout, ces nanoparticules sont hautement susceptibles de subir des phénomènes d'instabilité limitant leur utilisation pour une application telle que la transfection d'acides nucléiques.

Les particules de type SLN démontrent une amélioration de ces propriétés, réduisant alors la vitesse de relargage des molécules encapsulées. Cependant, l'arrangement cristallin limite le taux de charge et entraîne des risques de gélification pouvant nuire à la stabilité du vecteur.

Les nanovecteurs lipidiques de type NLC semblent être l'alternative pour pallier aux limites des deux autres classes de vecteur. En effet, leur matrice solide imparfaitement cristalline limite les risques de gélification, favorisant la stabilité colloïdale, et améliore les taux de charge de molécules lipophiles, sans pour autant nuire au relargage.

D'après ces conclusions, nos laboratoires se sont orientés vers la conception de nanovecteurs lipidiques nanostructurés, les NLC, dont les caractéristiques sont plus en adéquation avec les thématiques développées, notamment en ce qui concerne la stabilité des particules.

1.5. Les vecteurs développés au CEA-LETI : les LNP

Depuis plusieurs années, le CEA-LETI a développé des nanoparticules lipidiques pour la vectorisation de molécules. D'abord utilisé pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles pour des applications d'imagerie biomédicale *in vivo* et la détection de tumeurs [3, 5, 6], ce système s'est développé pour d'autres applications, en particulier l'encapsulation de principes actifs pour la chimiothérapie. Notre objectif est d'utiliser ce support et de le modifier afin d'obtenir un vecteur de siARN efficace répondant aux critères exigés.

Ces particules, nommées LNP (*Lipid NanoParticles*), sont des nanoémulsions produites par l'émission de cycles d'ultrasons (voir la partie expérimentale page 134). Elles sont composées d'un cœur huileux semi-cristallin, mélange de lipides solides (suppocire) et lipides liquides (huile de soja), stabilisées par une monocouche de tensio-actifs. Cette monocouche est composée de phospholipides insolubles (lécithine) et de polymères hydrophiles (polymère de type PEG) qui permettent l'obtention de nanoparticules stables (Figure III-4).

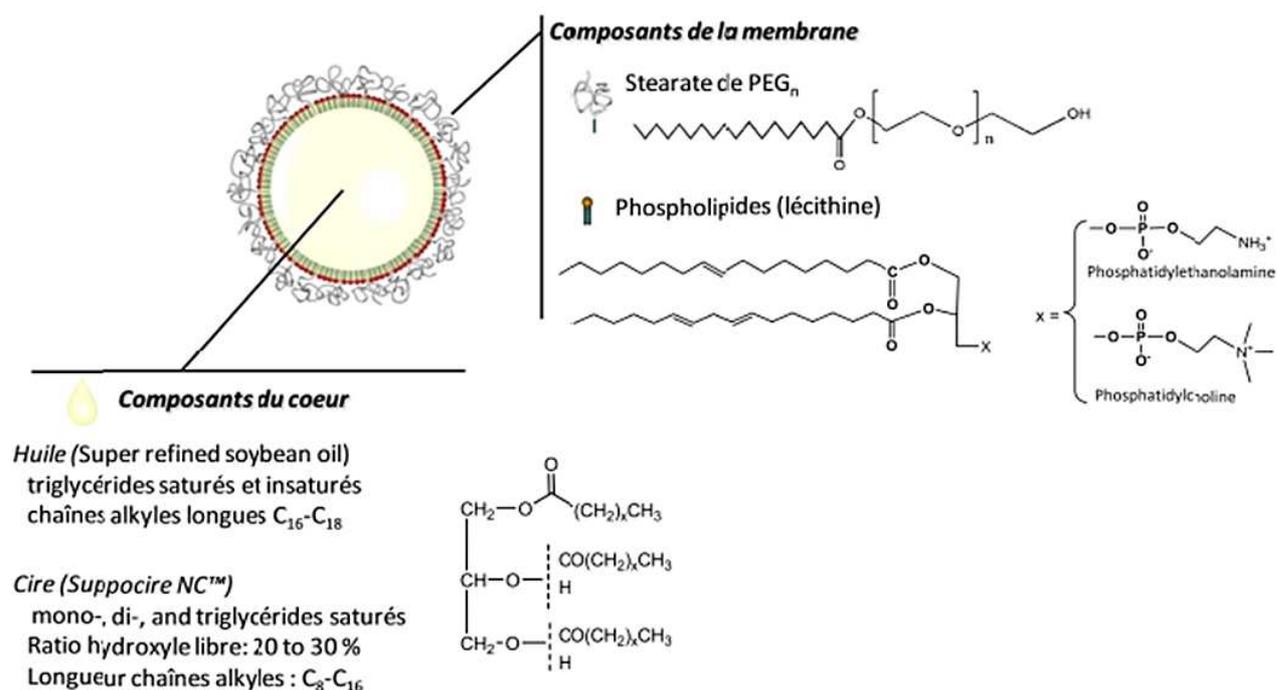


Figure III-4. Composition des LNP du CEA-LETI : sur une base de NLC, les LNP possèdent un cœur semi-cristallin stabilisé par une monocouche de tensio-actifs.

La biocompatibilité des particules est assurée par une composition en produits de grade pharmaceutique approuvés chez l'Homme par la FDA (*Food and Drug Administration*) et permet

d'envisager un transfert vers des applications *in vivo*. Le cœur hydrophobe permet l'encapsulation de composés hautement lipophiles ne pouvant être délivrés sous forme libre et, dans le cas des fluorophores lipophiles, un suivi de la distribution de la particule. La couronne des particules, comprenant en partie des tensio-actifs PEGylés, permet d'envisager le greffage de molécules ou de biomolécules d'intérêt (peptides, anticorps, ...) par des protocoles classiques de bio-conjugaison, apportant un caractère versatile exploitable pour tous les types d'application.

Par ailleurs, la taille des particules lipidiques formulées est modulable, apportant un intérêt supplémentaire, notamment pour obtenir un outil adaptable selon l'application souhaitée. En effet, il est possible de synthétiser de façon reproductible des nanoparticules de 30 à 120 nanomètres de diamètre hydrodynamique. Les propriétés du cœur sont également modulables en ajustant le rapport cire/huile afin d'apporter la viscosité désirée [7, 28].

2. Stratégie de modification des nanoparticules LNP

2.1. Approche par modification de la surface des particules

Comme décrit précédemment, l'un de nos objectifs principaux est de concevoir un vecteur nanoparticulaire permettant une complexation rapide, robuste et simple pour la transfection de siARN. En particulier, ce vecteur doit autoriser l'étude de nombreuses séquences d'acides nucléiques en parallèle, et ainsi être facilement transposable pour des applications *in vitro* telles que le criblage à haut-débit. En se basant sur les vecteurs de type LNP développés au CEA-LETI et en s'appuyant sur la littérature, la solution la plus évidente pour répondre à ces critères consiste à modifier la surface des particules afin de favoriser la complexation avec des siARN. Ainsi, la couronne de la particule doit être modifiée pour apporter des charges cationiques favorisant l'établissement de liaisons électrostatiques avec les acides nucléiques chargés négativement [29-32].

Notre première stratégie a été de remplacer une quantité définie de lécithine, le phospholipide amphiphile neutre ou légèrement anionique, présent dans la couronne des particules par un lipide cationique (Figure III-5). Après quelques tests préliminaires, notre attention s'est portée sur le *1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane* (ou DOTAP) (voir chapitre II), l'un des lipides cationiques les plus couramment utilisés et montrant les résultats les plus pertinents pour la transfection de siARN [33].

En outre, les LNP possèdent un revêtement polymérique en chaînes PEG très dense pour augmenter leur stabilité et leur furtivité. Cependant, dans une volonté de complexation de

biomolécules en surface des particules, ces polymères peuvent créer un encombrement stérique pouvant nuire à l'accessibilité des charges positives, et ainsi à la complexation. À partir de ce critère, une seconde stratégie est apparue visant, en plus de l'apport de lipides cationiques, à diminuer la quantité de polymère de surface (Figure III-5).

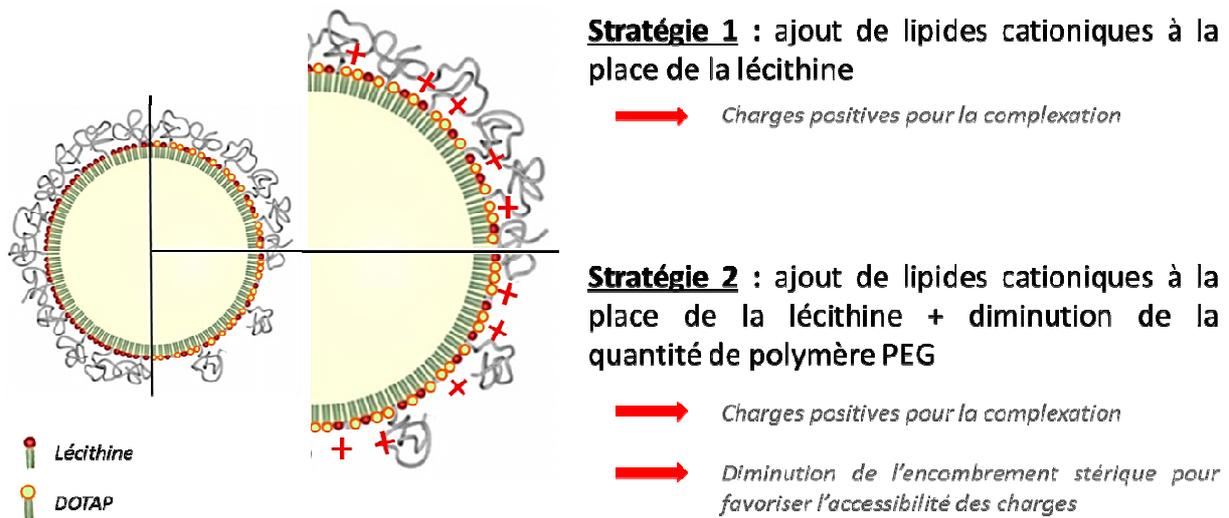


Figure III-5. Stratégies envisagées dans la modification des LNP pour la transfection de siARN : à partir des formulations de LNP utilisées pour l'imagerie, deux stratégies majeures ont été envisagées pour favoriser l'établissement de liaisons électrostatiques avec les siARN anioniques.

Les proportions de lipides cationiques et de polymères PEG s'avèrent être les points clés pour la formulation des nanoparticules pour la transfection. En effet, une concentration trop faible en lipide cationique peut être insuffisante pour une complexation efficace tandis qu'une concentration trop importante peut, de par les charges positives, provoquer des risques de cytotoxicité. De même, une concentration trop élevée en polymère PEG ne permet pas une différenciation assez importante par rapport à la stratégie 1, alors qu'une diminution trop importante peut provoquer des problèmes de stabilité [28]. Ainsi, l'obtention des caractéristiques désirées nécessite une définition précise des bornes concernant les proportions utilisées pour ces deux composants.

2.2. Preuve de concept : les LNP pour la transfection

2.2.1. Formulation de particules cationiques cLNP

Des premières tentatives de formulation de particules cationiques ont été effectuées de manière empirique. Bien que dans la littérature, une utilisation de particules lipidiques possédant des tailles supérieures à 100 nm semble être privilégiée pour la transfection d'acides nucléiques [29, 31, 32], nous nous sommes orientés vers des particules possédant un diamètre hydrodynamique inférieur, mieux caractérisé dans nos laboratoires. Par ailleurs, les nanoparticules possédant une taille plus importante ont une composition comprenant une quantité de matière plus élevée au niveau du cœur de la particule, au dépend de la couronne (représentée par la lécithine et le polymère PEG) (Tableau III-1). En effet, en dépit d'une quantité de matière totale plus importante, les particules, possédant un diamètre hydrodynamique supérieur ou égal à 100 nm, ont une composition avec plus de 78% de matière comprise dans le cœur (Tableau III-1). Dès lors, il semble plus intéressant de travailler sur de plus petites particules pour optimiser les formulations en (1) apportant un pourcentage molaire de DOTAP par rapport à la particule plus important et (2) en permettant une diminution de PEG conséquente sans altérer la stabilité de la particule [28]. Ainsi, nos premiers essais ont été effectués sur des particules basées sur une formulation de diamètre hydrodynamique égal à 50 nm, qui démontre à ce jour les meilleures propriétés de stabilité dans nos laboratoires.

Taille (nm)	Quantité totale en LNP (mole)	Pourcentage molaire par rapport à la particule		
		Cœur (Huile + Cire)	Lécithine	PEG
30	5,23E-04	28,14	38,41	33,44
50	7,60E-04	65,85	11,46	22,69
80	8,21E-04	73,56	8,16	18,28
100	1,08E-03	78,68	6,23	15,10
120	1,05E-03	84,04	5,74	10,22

Tableau III-1. Composition des nanoparticules lipidiques du CEA-LETI : selon la taille de la particule, la quantité de matière sera prédominante dans le cœur (pour les diamètres hydrodynamiques importants) ou la couronne (pour les faibles diamètres hydrodynamiques).

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

À partir de ces données, trois formulations ont été réalisées, basées sur des particules de 50 nm : des LNP ne contenant pas de DOTAP (**JB-01**), des particules avec un remplacement de 50% de lécithine par du DOTAP (m/m) (**JB-02**) et des particules avec 75% de modification (m/m) (**JB-03**). L'impact de ces modifications sur les quantités de matière dans les particules est rapporté dans le tableau III-2. Le pourcentage molaire de lécithine est ainsi divisé par deux dans les particules JB-02 et par quatre dans les particules JB-03, par rapport à la formulation de base JB-01.

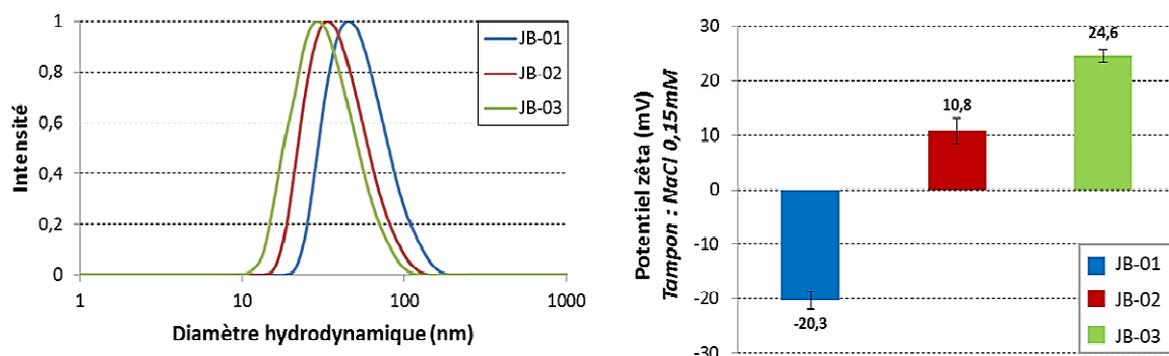
Formulation	Quantité totale (mole)	Pourcentage molaire par rapport à la particule			
		Cœur (Huile + Cire)	Lécithine	PEG	DOTAP
JB-01	7,60E-04	65,85	11,46	22,69	0,00
JB-02	7,62E-04	65,66	5,71	22,62	6,00
JB-03	7,64E-04	65,57	2,85	22,59	5,99
JB-04	6,77E-03	73,92	3,21	12,73	10,13

Tableau III-2. Composition des nanoparticules lipidiques modifiées : selon les modifications apportées à la formulation de 50 nm, la quantité de matière varie pour la lécithine, le DOTAP et le polymère PEG.

Malgré les possibilités d'associations privilégiées entre le cœur et l'enveloppe [33], nous avons décidé de focaliser les modifications essentiellement sur la couronne afin de ne pas dénaturer les caractéristiques physico-chimique de la particule, notamment du cœur. De cette façon, les particules maintiennent leurs propriétés de base, dont la possibilité d'utiliser le vecteur pour transporter des molécules lipophiles dans le cœur (fluorophores, agents thérapeutiques, ...). Ce choix ouvre ainsi sur des possibilités de multi-modalité conférées par ces formulations particulières.

L'incorporation de lipides cationiques dans la formulation, à la place de la lécithine, modifie légèrement le diamètre hydrodynamique (Figure III-3), avec une diminution de 4,2 nm pour JB-02 (rouge) et 5,5 nm pour JB-03 (vert), sans affecter le caractère monodisperse des particules. Ainsi, le DOTAP incorporé semble jouer le rôle de tensio-actif des phospholipides soustraits. Plus important, l'incorporation du lipide cationique provoque une augmentation majeure du potentiel zêta (Figure III-6) : en effet, par rapport à la particule non-modifiée JB-01, la charge mesurée pour JB-02 (rouge)

est augmentée de 31 mV tandis que pour JB-03, elle est augmentée de 45 mV, permettant d'obtenir des particules possédant une charge globale positive dans un tampon NaCl 0,15 mM.



	JB-01	JB-02	JB-03
Diamètre hydrodynamique (nm)	53,37 ± 2,62	49,20 ± 0,96	47,84 ± 1,88
PDI	0,162 ± 0,005	0,160 ± 0,012	0,158 ± 0,008
Potentiel zêta (mV)	-20,31 ± 1,61	10,80 ± 2,38	24,66 ± 1,25

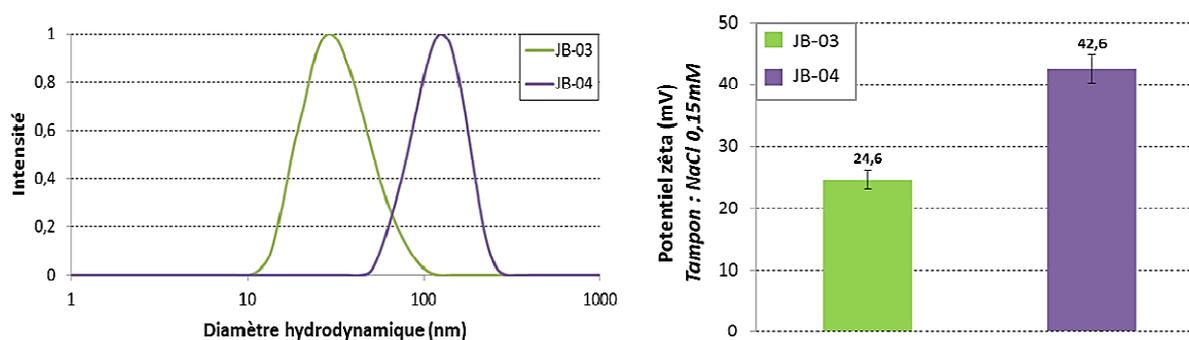
Figure III-6. Caractérisation des particules issues de la stratégie 1 : cette stratégie permet de formuler des particules dont le diamètre hydrodynamique varie très peu mais qui autorise une augmentation importante du potentiel de surface (n=3). Analyse par DLS (Malvern).

Pour la seconde stratégie, une formulation particulière a été effectuée en se basant sur JB-03 et en diminuant la concentration de polymère. Afin de ne pas dépasser le seuil de stabilité de la particule [28], la quantité de polymère PEG a été divisée par deux uniquement (m/m), permettant la formation des particules JB-04 (Tableau III-2). Comparé à JB-03, cette modification provoque une diminution majeure du pourcentage molaire de la quantité de PEG dans les particules, qui est divisée par 1,7. Par ailleurs, ce changement entraîne une augmentation des pourcentages molaires de la quantité du cœur (+ 8,35%) et de la quantité de DOTAP (+ 4,14%). Ces variations dans la composition peuvent entraîner des conséquences directes sur les propriétés physico-chimiques de la particule (Figure III-7).

La diminution importante du polymère PEG, jouant également un rôle de tensio-actif pour la nanoparticule, induit une augmentation importante du diamètre hydrodynamique, le multipliant par 2,2 (violet). Cette observation de l'augmentation du diamètre hydrodynamique est corrélée à

l'augmentation du pourcentage de la quantité de matière dans le cœur de la particule décrit précédemment, correspondant d'avantage aux particules de taille plus importante (Tableau III-2). De plus, la réduction de la quantité de polymère, pouvant masquer les charges de surface de la particule, permet une augmentation conséquente du potentiel zêta (Figure III-7). En effet, celui-ci est multiplié par 1,7 offrant un caractère cationique plus fort à la formulation de nanoparticule JB-04. Cette augmentation de la charge globale de la particule est également en adéquation avec l'augmentation du pourcentage de la quantité de matière représentée par le DOTAP dans la particule (Tableau III-2). Par ailleurs, comme précédemment, cette modification ne modifie pas le caractère monodisperse de la formulation, caractérisé par un PDI inchangé (Figure III-7).

Un test a été réalisé en remplaçant 100% de lécithine par du DOTAP. Cependant, cet essai n'a pas permis d'obtenir une formulation stable, démontrant qu'une quantité minimale de phospholipide est nécessaire pour permettre le développement des nanoparticules de manière stable ($\approx 2,8\%$ molaire de la particule totale).



	JB-03	JB-04
Diamètre hydrodynamique (nm)	47,84 ± 1,88	102,86 ± 2,06
PDI	0,158 ± 0,008	0,162 ± 0,024
Potentiel zêta (mV)	24,66 ± 1,25	42,60 ± 1,91

Figure III-7. Caractérisation des particules issues de la stratégie 2 : La diminution de la quantité de polymère de surface aboutit à une augmentation du diamètre hydrodynamique et du potentiel de surface ($n=3$). Analyse par DLS (Malvern).

Concernant les particules JB-01 (bleu), JB-02 (rouge), JB-03 (vert) et JB-04 (violet), leur stabilité colloïdale a été suivie au cours du temps en suivant un protocole de vieillissement accéléré à 40°C, élaboré d'après les recommandations du développement pharmaceutique [37] (Figure III-8). Après 92 jours, le diamètre hydrodynamique, mesuré pour ces quatre formulations de particule, reste sensiblement identique, variant seulement de 0,3 à 2,6 nm au cours du temps (Figure III-8).

Ainsi, la modification de surface des nanoparticules lipidiques de 50 nm, par incorporation de lipides cationiques, est possible sans altérer la monodispersité et la stabilité colloïdale de la formulation.

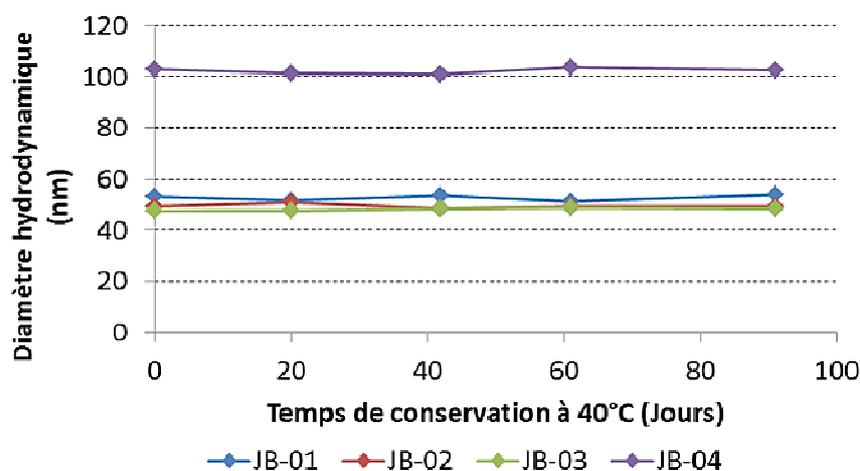


Figure III-8. Stabilité accélérée des particules cationiques : le diamètre hydrodynamique des nanoparticules formulées reste inchangé au cours du temps. Analyse par DLS (Malvern).

2.2.2. Résultats préliminaires en transfection fonctionnelle

L'obtention de particules cationiques ne permet pas obligatoirement d'obtenir un outil efficace pour la transfection de siARN. Ainsi, ces LNP cationiques (cLNP) ont été utilisées pour transférer des siARN inhibant spécifiquement la protéine GFP sur-exprimée par des cellules U2OS (voir le protocole page 134). Pour cette expérience, la quantité de particule utilisée pour transférer les séquences d'acides nucléiques est définie en fonction de la concentration en siARN, au regard de l'état de l'art concernant ce type de particule. Ainsi, pour ces expériences préliminaires, nous nous sommes appuyés sur les travaux de del Pozo-Rodríguez *et al.*, concernant la transfection de séquences d'ADN plasmidique, afin de définir un rapport N/P égal à 4/1 [29].

Par définition, le rapport N/P correspond au rapport molaire du « nombre de groupement ammonium N », présent sur les molécules de DOTAP incluses dans les particules, sur le « nombre de

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

groupement phosphate P » présent sur les siARN. Ainsi, le rapport N/P molaire permet d'établir un rapport « nombre de charge positive » sur « nombre de charge négative ».

Conditions	Analyses de l'expression de la GFP	Efficacité d'inhibition de l'expression de la GFP (par rapport aux cellules seules)
U2OS-GFP Aucun agent de transfection siGFP – 100 nM		0,00%
U2OS-GFP Lipofectamine RNAiMAX siGFP – 100 nM		97,77%
U2OS-GFP JB-03 siGFP – 100 nM		0,00%
U2OS-GFP JB-04 siGFP – 100 nM		26,68%

Tableau III-3. Inhibition de l'expression de la protéine GFP suivant différentes stratégies de transfection : analyse de la fluorescence des cellules U2OS sur-exprimant la GFP après une transfection de 72 heures avec différents vecteurs complexés avec des siGFP (n=3) ([siARN] = 100 nM). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ évènements (FACS BS LSRII).

La transfection de siARN avec l'agent commercial, la Lipofectamine RNAimax, provoque une inhibition majeure de l'expression de la GFP (Tableau III-3). En effet, le pourcentage de cellule exprimant cette protéine est diminué de 97,8% par rapport au contrôle sans transfection. Dans le même temps, l'utilisation des particules lipidiques JB-03, comme vecteur de siGFP, n'induit aucun changement dans le profil d'expression de la fluorescence de la protéine GFP.

En revanche, les particules JB-04, correspondantes à la stratégie 2, en tant que vecteur de siGFP permet de diminuer le nombre de cellule, exprimant la protéine GFP, de 26,7% (Tableau III-3). Même si ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec l'agent commercial, cette inhibition fonctionnelle démontre l'hypothèse selon laquelle, en plus de la proportion en lipide cationique, la proportion de polymère PEG à la surface des particules doit être régulée afin d'éviter les phénomènes d'encombrement stérique gênant la complexation et/ou l'internalisation dans les cellules.

2.2.3. Conclusion des essais préliminaires

Nous souhaitons établir une preuve de concept pour démontrer la possibilité d'utiliser les LNP en tant qu'agent de transfection fonctionnelle de siARN. Par la formulation de particules cationiques, nous avons pu démontrer cette faisabilité, mais nous avons également défini les stratégies nécessaires pour optimiser ce type de vecteur afin de transférer des séquences d'acides nucléiques. Cependant, les efficacités obtenues sont bien en dessous des agents commerciaux tels que la Lipofectamine RNAimax. La formulation de ces particules exige d'être remaniée et améliorée afin d'obtenir des résultats plus compétitifs au regard de l'état de l'art. Un développement de manière empirique a permis d'isoler quelques paramètres améliorant la particule pour cette application, notamment l'intégration de lipides cationiques et la réduction de polymères PEG. Néanmoins, l'étude d'une variable à la fois, consistant à faire varier uniquement un paramètre tout en gardant les autres constants, peut s'avérer fastidieuse et insuffisante pour l'étude de systèmes complexes, en particulier avec un grand nombre de paramètres à étudier [35]. En effet, dans la recherche en nanomédecine, le temps passé pour la découverte d'un produit utilisable pour une étape ultérieure du développement peut s'avérer très long (Figure III-9). Il est donc nécessaire de rationaliser ce type d'étude en utilisant des méthodes mises à notre disposition, notamment des outils mathématiques.

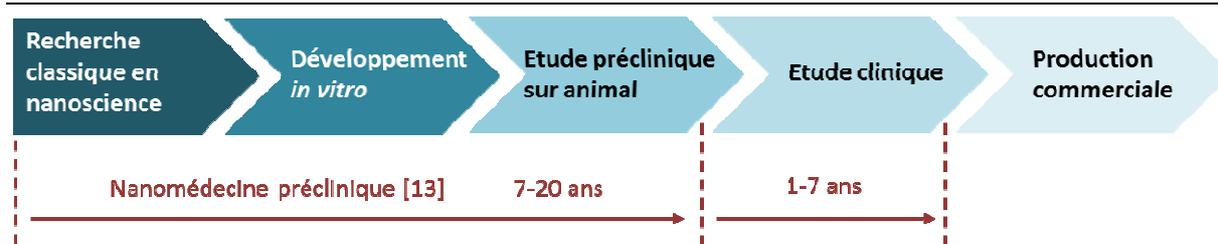


Figure III-9. Les cinq étapes du développement en nanomédecine : le temps nécessaire au développement de nanoparticules utilisables pour diverses applications peut se mesurer en dizaines d'années.

2.3. Rationalisation de l'étude : développement d'un plan d'expérience

2.3.1. Plan mathématique

Un plan d'expérience (*Design Of Experiment* ou DOE) consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'essais expérimentaux de manière à révéler les effets de différents paramètres. Chaque essai permet d'acquérir de nouvelles connaissances, en contrôlant un ou plusieurs paramètres d'entrée, pour obtenir les résultats validant un modèle. Ainsi, par une approche mathématique, il est possible de maximiser la quantité et la qualité des informations obtenues, tout en minimisant le nombre d'expérience. Cette approche est d'ailleurs de plus en plus utilisée dans l'industrie et dans les recherches académiques [36-38].

L'utilisation d'un plan d'expérience peut donc permettre de comprendre plus finement l'influence des différents paramètres de la composition de la particule sur les différentes étapes de la transfection étudiées. Ainsi, les formulations potentielles issues de cette étude répondront aux exigences spécifiquement définies, notamment en termes de stabilité et d'efficacité d'inhibition fonctionnelle.

La mise en place de ce plan d'expérience a été élaborée en collaboration avec François de Crecy (CEA Grenoble, LETI DCOS) et son interprétation, en vue des expériences de biologie, avec le Dr. Bastogne (CNRS, CRAN, Université de Lorraine/CYBERNano).

2.3.2. Mise en place du plan d'expérience

Tout en fixant la composition du cœur dans les rapports utilisés pour les particules de base, nous avons choisi d'étudier cinq facteurs de composition décrivant les nanoparticules lipidiques cationiques (Figure III-10). Ces facteurs sont définis en fonction de la fraction molaire de la couronne

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

de la particule (les composants du cœur étant exclus pour l'expression des pourcentages molaires définis) :

- La fraction molaire de lipide cationique, le DOTAP, par rapport à la surface de la particule, notée X_1 ;
- La fraction molaire de lipide fusogène, le DOPE, par rapport à la surface de la particule, notée X_2 . En effet, au regard de la littérature [39], l'échappement endosomal peut s'avérer être un facteur limitant. C'est pourquoi nous avons choisi d'intégrer un composant favorisant cette étape de la distribution intracellulaire ;
- La fraction molaire de polymère de surface PEG par rapport à la surface de la particule, notée X_3 ;
- La fraction molaire de lécithine par rapport à la surface de la particule, notée X_4 ;
- Un facteur qualitatif a été ajouté en intégrant la possibilité de choisir entre plusieurs diamètres hydrodynamiques, noté X_5 . Il a été défini auparavant que la surface disponible variait fortement en fonction de la taille de la particule, exigeant d'intégrer ce type de paramètre. Ainsi, nous avons sélectionné trois tailles, dont la composition du cœur correspond à des particules avec un diamètre hydrodynamique de 30 (petite), 50 (moyenne) et 120 nm (grande). Évidemment, le diamètre hydrodynamique final sera différent en raison des variations dans la composition en tensio-actif, notamment en polymère PEG.

Par ailleurs, quatre paramètres de sortie ont été évalués pour définir le modèle. Afin d'optimiser le temps de travail sur ce type de variable biologique, les réponses sont étudiées les unes après les autres : chaque formulation ne satisfaisant pas les critères demandés pour une réponse donnée est exclue pour l'étude des réponses suivantes.

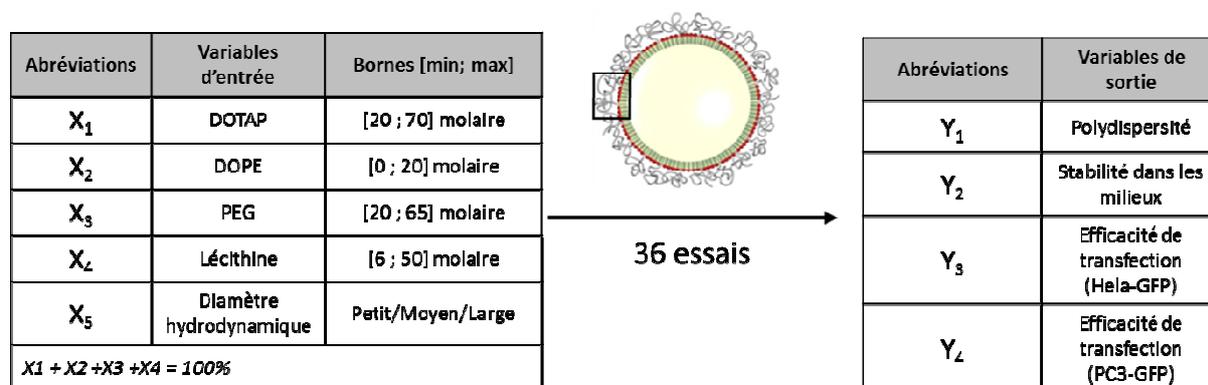


Figure III-10. Définition du plan d'expérience : Établissement des paramètres d'étude. Les bornes définies pour les paramètres d'entrées sont définies en termes de pourcentage molaire par rapport à la quantité de matière présent dans la couronne de la particule.

Un plan d'expérience nécessite des réponses quantitatives excluant les réponses binaires. Ainsi, pour définir la stabilité physique des particules, l'indice de polydispersité (Y_1) a été utilisé suivant la règle suivante : plus une population est monodisperse, plus elle sera stable, étant moins encline au mûrissement d'Ostwald [40]. De plus, pour une étude sur la transfection de siARN, les nanoparticules doivent maintenir leur intégrité dans les milieux de culture afin de leur laisser le temps d'être internalisées. Dès lors, la stabilité dans le milieu de culture complet, supplémenté en sérum de veau fœtal, utilisé pour la transfection doit être assurée pendant plusieurs heures (Y_2). La réponse Y_2 a été étudiée par diffusion de la lumière (voir protocole page 136) suite à l'observation de l'évolution du diamètre hydrodynamique. Enfin, le paramètre primordial de cette étude, la faculté de la particule à transférer un siARN, et induire une inhibition fonctionnelle, doit être mesurée. Dans ce but, deux lignées cellulaires ont été étudiées, s'appuyant pour les deux cas sur un modèle sur-exprimant la GFP (voir protocole page 140). D'autres réponses non-intégrées dans le plan d'expérience ont été relevées afin de favoriser l'interprétation, notamment le diamètre hydrodynamique final des particules formulées. La définition complète du plan d'expérience est résumée dans la figure III-10.

2.3.3. Optimisation du plan d'expérience

Hormis le lipide fusogène qui n'a pas été testé dans les expériences préliminaires, chacun des constituants de la particule, intégré dans les paramètres d'entrée, a été défini pour avoir une influence sur le comportement physico-chimique de la particule et/ou la faculté de se complexer et de transférer les siARN. De plus, l'interaction des différents constituants entre eux peut également conduire à des effets importants [33, 41]. Les plans d'expérience factoriels complets sont propices à l'étude de tels systèmes complexes, mais nécessitent la réalisation d'un grand nombre d'essais expérimentaux [42]. L'utilisation d'un plan « D-optimal » autorise une réduction de ce nombre en permettant d'imposer des contraintes souhaitées sur les différents facteurs de composition [42], ceci en maintenant une valeur informative importante (Figure III-11).

Ainsi, le principe est de pouvoir modéliser le comportement des particules à travers les relations liant les réponses Y_i aux facteurs de composition X_i . Pour permettre d'établir un modèle, une hypothèse est émise définissant des mélanges avec effets principaux pour lesquels les interactions de premier et second ordre sont considérées alors que les interactions d'ordre supérieur sont négligées. Dès lors, les réponses Y_i s'expriment sous la forme suivante :

$$\begin{cases} Y_i = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j \\ \sum X_i = 1 \end{cases}$$

Avec l'expertise développée sur les LNP ces dernières années, en complément des conclusions issues des expérimentations préliminaires, des contraintes sont imposées sur les facteurs de composition afin de réduire le domaine d'étude. Par cette démarche, 36 essais expérimentaux ont été sélectionnés dont les composants sont inclus dans les bornes prédéfinies. Parmi ces essais expérimentaux, trois ont été répétés pour les formulations possédant des poids statistiques supérieur à 0,9 démontrant une probabilité plus importante de répondre aux critères de réponse désiré. Ainsi, la reproductibilité de ces essais peut fournir des informations supplémentaires sur la robustesse de cette approche.

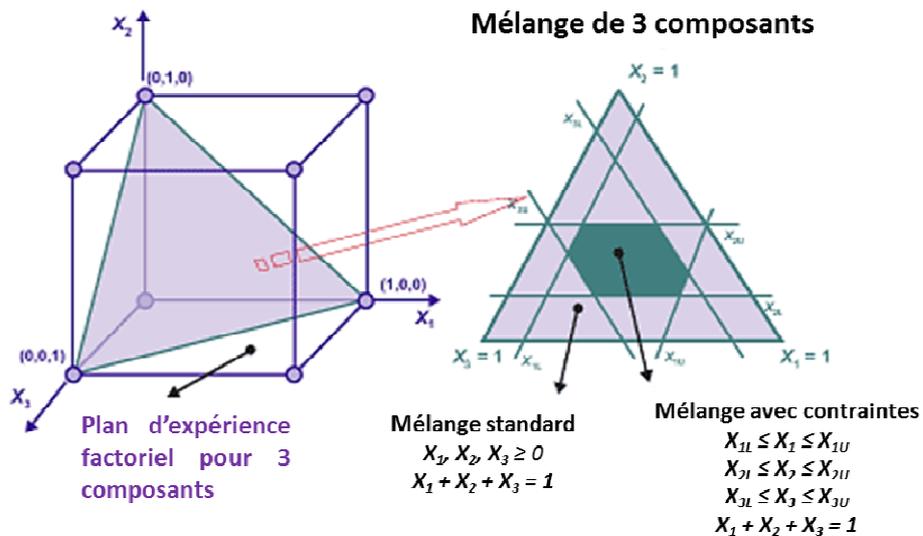


Figure III-11. Différence entre un plan d'expérience factoriel complet et un plan d'expérience « D-optimal » : l'établissement de contraintes permet de diminuer le nombre d'essais expérimentaux nécessaires pour valider un modèle.

2.3.4. Modélisation des différentes réponses obtenues

2.3.4.1. Interprétation de la réponse quantitative en polydispersité

Des essais expérimentaux ont permis de modéliser les différentes réponses. De cette façon, le diamètre hydrodynamique post-formulation a été défini mathématiquement pour être le seul

facteur d'influence sur l'établissement du PDI. Évidemment, les différents composants de la membrane des particules, exerçant une action tensio-active, influent sur le diamètre hydrodynamique de la particule, tout comme le rapport cœur/couronne. Toutefois, en dehors du diamètre hydrodynamique post-formulation, aucun des différents paramètres de composition ne s'affirme comme prédominant pour l'établissement du PDI. L'équation du modèle de PDI est décrite dans la figure III-12 : ce modèle présente un coefficient de régression élevé ($R^2 = 0,91$) et une fiabilité confirmée par la proximité des coefficients de détermination R^2 et R^2 ajusté [43]. La valeur du R^2 peut s'interpréter comme la part de dispersion autour de la moyenne de la variable dépendante.

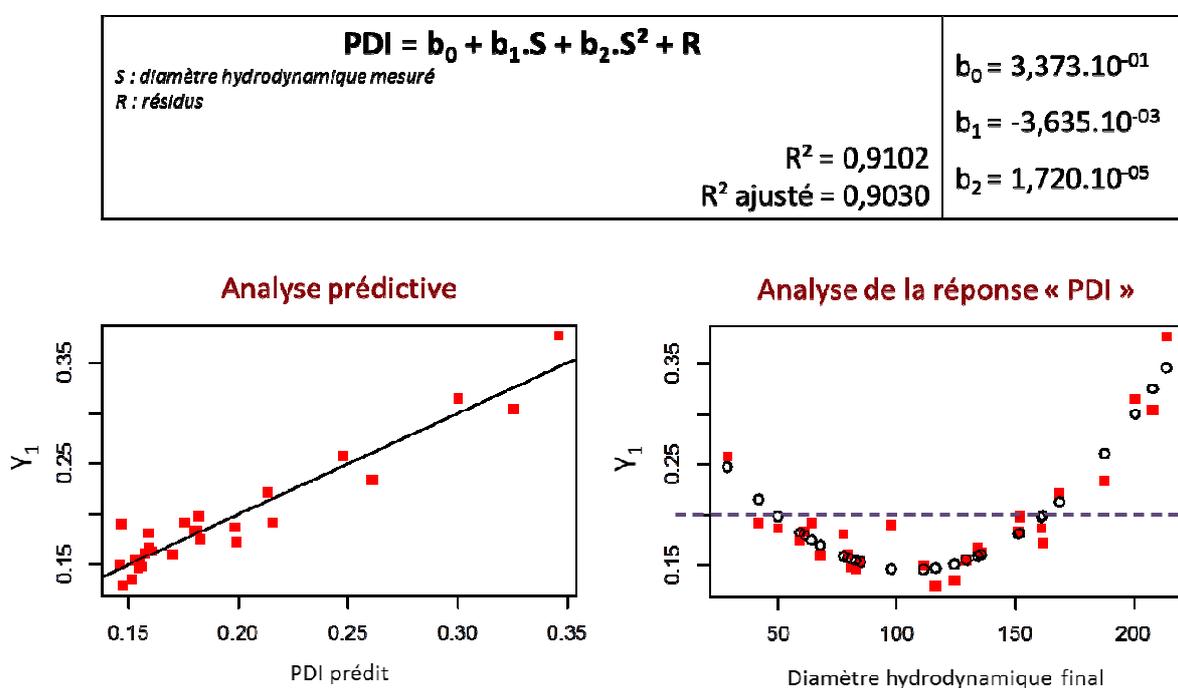


Figure III-12. Modèle de la stabilité colloïdale des particules : dans notre étude, le PDI des particules est lié à leur diamètre hydrodynamique. Sur la courbe de gauche est représenté le PDI expérimental par rapport au PDI prédit. Sur la courbe de droite est représenté l'évolution du PDI en fonction du diamètre hydrodynamique de la particule – les carrés rouges représentent les valeurs expérimentales tandis que les ronds blancs représentent les valeurs prédites. La ligne pointillée définit le seuil de PDI au-dessus duquel les formulations sont considérées comme polydisperses. Analyse par DLS (Malvern).

La figure III-12 montre le diagramme de corrélation entre PDI prédits par le modèle et PDI mesurés expérimentalement. Une corrélation élevée est observée entre le modèle et les données expérimentales, attestant de la robustesse et de la validité des conclusions observées. Pour obtenir

une population considérée comme monodisperse, un seuil pour les valeurs du PDI est fixé à 0,2 d'après les critères fournis par Malvern. Au-delà de cette valeur, les nanoparticules seront définies avec une polydispersité en termes de taille. Une tendance est déterminée quant à l'évolution du PDI en fonction du diamètre hydrodynamique mesuré post-formulation (Figure III-12) : les particules possédant un diamètre hydrodynamique entre 40 et 160 nm présentent des populations de nanoparticule lipidique monodisperses. Pour un diamètre hydrodynamique inférieur à 40 nm, ou supérieur à 160 nm, les valeurs du PDI, prédites et expérimentales, sont supérieures à 0,2 démontrant un caractère polydisperse des formulations.

La modification des concentrations en tensio-actifs apporte une difficulté pour la prédiction des diamètres hydrodynamiques post-formulation, et ainsi pour respecter les bornes définies. Cependant, une démarche mathématique favorise l'accessibilité de telles données, de telle sorte que la composition d'une particule peut être identifiée en fonction du diamètre hydrodynamique post-formulation désirée.

2.3.4.2. Interprétation de la réponse quantitative pour la stabilité dans les milieux

Comme mentionné précédemment, les formulations ne répondant pas aux critères « PDI » établis, à savoir un PDI inférieur ou égal à 0,2, n'ont pas été sélectionnées pour l'évaluation des autres réponses biologiques. Ainsi, sur les 36 essais expérimentaux de départ, seulement 22 ont été testés en termes de stabilité dans les milieux de culture. Toutefois, un modèle a pu être établi au regard des résultats obtenus, et seulement deux facteurs sont décrits comme prédominant dans la détermination de la stabilité dans les milieux de culture : le pourcentage molaire en polymère PEG dans la couronne (X_3) et le diamètre hydrodynamique post-formulation, comme pour le modèle du PDI (Figure III-13).

La stabilité dans les milieux de culture a été définie d'après l'évolution du diamètre hydrodynamique après incubation des nanoparticules pendant 3 heures, 6 heures, 24 heures et immédiatement après l'incorporation des particules dans le milieu de culture. Ainsi, deux zones sont isolées en fonction de ces deux paramètres : une zone dont les caractéristiques permettent d'obtenir des particules stables dans les milieux pendant au minimum 6 heures (zone verte en bas à droite du graphique) et une zone présentant une stabilité limitée, au mieux, à 3 heures (zone rouge en haut à gauche du graphique) (Figure III-13). Un modèle peut alors être identifié : des particules possédant une taille supérieure à 100 nm avec une faible concentration en polymère PEG (< 40% de la couronne) montrent des risques d'instabilité dans les milieux de culture complets. À l'inverse, quelle

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

que soit leur taille (entre 40 et 160 nm prédéfini par le PDI), les particules montrent une stabilité élevée si elles possèdent une concentration en PEG suffisante (> 40% de la couronne). Par ailleurs, une diminution du pourcentage de polymère PEG peut être effectuée, sans altérer la stabilité des particules dans les milieux de culture complets, si les particules présentent un diamètre hydrodynamique post-formulation inférieur à 100 nm.

L'équation permettant de définir la stabilité des nanoparticules dans les milieux complets a pu être établie suite à cette interprétation. Ainsi, la particule possède des caractéristiques permettant d'être positionnée dans la « zone de stabilité » si la condition suivante est respectée : $400X_3 - S > 10$ (S étant le diamètre hydrodynamique mesuré post-formulation).

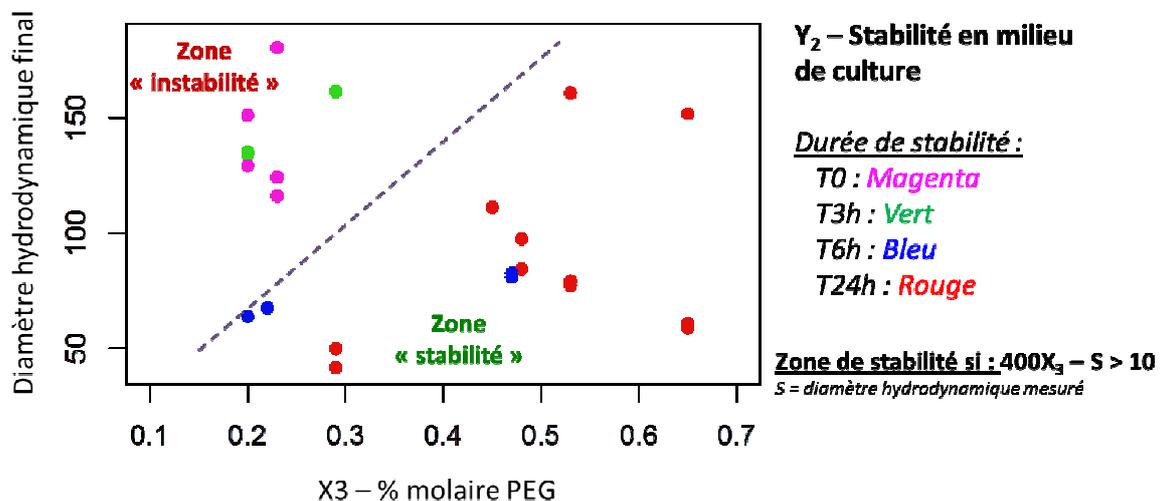


Figure III-13. Modèle de la stabilité des particules dans un milieu de culture complet : la stabilité dans un milieu complet, supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, dépend de deux facteurs : le pourcentage molaire en polymère PEG dans la couronne de la particule et le diamètre hydrodynamique final de la particule. Les nanoparticules ont été mises dans du milieu de culture utilisé pour les expériences de transfection et l'évolution de la taille a permis de déterminer des temps de stabilité. Le temps de stabilité est matérialisé par différentes couleurs – magenta pour une instabilité directe ; vert pour 3 heures de stabilité ; bleu pour 6 heures de stabilité ; rouge pour 24 heures de stabilité. Deux zones dites « d'instabilité » et « de stabilité » ont été mises en évidence à posteriori, et séparées par une ligne pointillée. Analyse par DLS (Malvern).

Cependant, les tests préliminaires ont mis en exergue que la concentration en PEG influait sur l'efficacité de transfection, ceci probablement due à un encombrement stérique élevé pouvant nuire à la complexation et/ou à la transfection. La zone de stabilité à privilégier semble exiger des tailles inférieures à 100 nm, avec une concentration molaire en polymère PEG dans la couronne comprise entre 20 et 50%.

2.3.4.3. Interprétation de la réponse quantitative pour l'efficacité d'inhibition fonctionnelle

Les premières réponses explorées correspondent d'avantage à la physico-chimie de la particule, et en particulier à sa stabilité colloïdale dans diverses conditions. La faculté de transférer des siARN actifs et d'induire une inhibition post-transcriptionnelle représente l'aspect majeur de notre étude. Ainsi, différentes formulations de particule ayant répondu aux critères précédents, soit 14 essais, ont été testées pour la transfection de siARN fonctionnels sur deux lignées cellulaires sur-exprimant la protéine GFP (voir le protocole page 145).

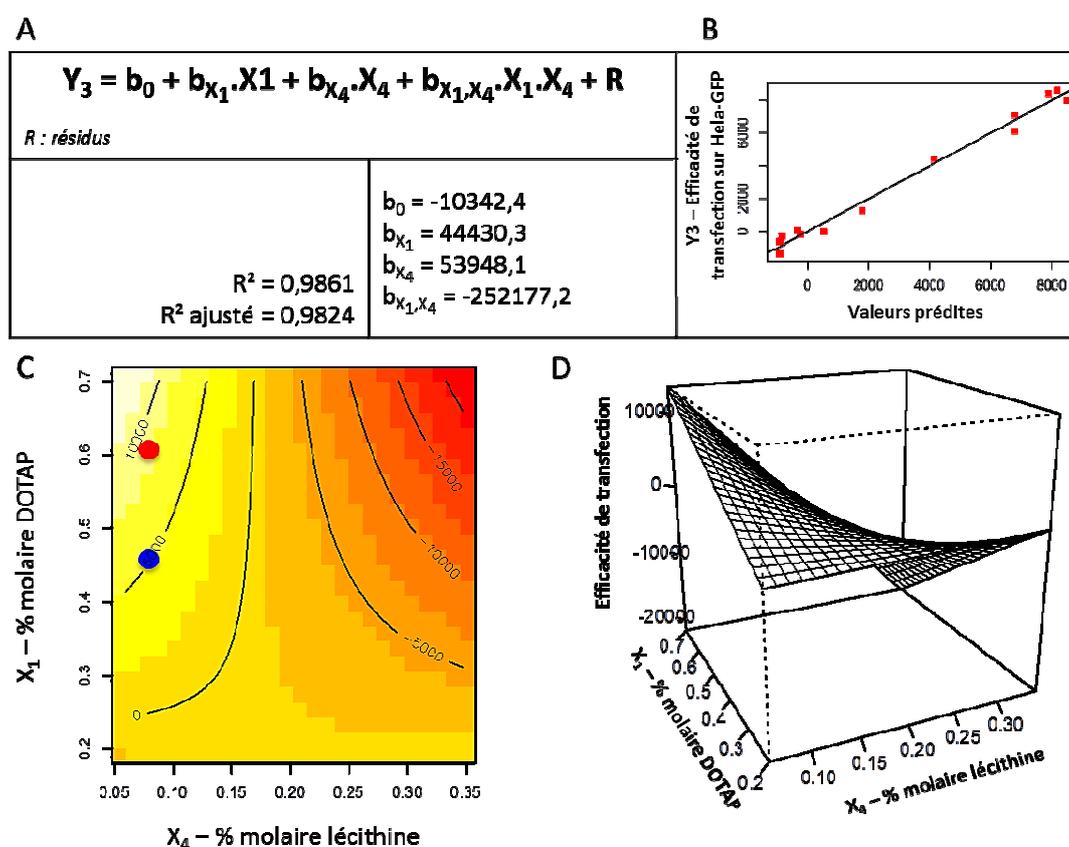


Figure III-14. Modèle de l'efficacité de transfection fonctionnelle sur les cellules Hela-GFP : l'efficacité de transfection fonctionnelle sur Hela-GFP dépend de deux facteurs prédominants : les pourcentages molaires de DOTAP et de lécithine dans la couronne de la particule. La fluorescence des cellules a été analysée après 72 heures de transfection de siGFP en utilisant les divers essais expérimentaux issus du plan d'expérience comme vecteur. Le tableau (A) présente l'équation du modèle tandis que la courbe (B) représente les efficacités de transfection expérimentales en fonction des prédictions mathématiques. Les graphiques montrent la représentation tridimensionnelle de l'efficacité de transfection expérimentale en fonction des deux paramètres influents (D) et la même représentation en deux dimensions (C). Pour cette dernière, un code couleur matérialise les efficacités de transfection fonctionnelle des plus basses (rouge-orange) vers les plus hautes (jaune-blanc). Les points rouge et bleu représentent respectivement les formulations cLNPa et cLNpB. Analyse de l'inhibition fonctionnelle par cytométrie en flux (FACS BS LSRII).

Comme pour les tests préliminaires, un rapport molaire N/P égal à 4/1 a été choisi afin de transporter des siGFP et d'étudier l'inhibition de l'expression de la protéine GFP. Pour la première réponse cellulaire Y_3 , l'intensité de fluorescence des cellules Hela-GFP a été analysée 72 heures après transfection de siGFP avec les différentes formulations de nanoparticules issues du plan d'expérience (Figure III-14). L'équation du modèle pour cette expérience a été définie figure III-14. Concernant le modèle sur la lignée cellulaire Hela-GFP, le diagramme entre les données expérimentales et prédictives (B) démontre une corrélation élevée assurant la robustesse du modèle ($R^2 = 0.99$) (Figure III-14). Dans ce modèle, deux paramètres sont définis comme prédominant pour l'efficacité d'inhibition fonctionnelle : les pourcentages molaires en DOTAP (X_1) et en lécithine (X_4) dans la couronne de la particule. Ainsi, il peut être mis en évidence que l'efficacité d'inhibition fonctionnelle sur cette lignée est d'autant plus élevée que le pourcentage de DOTAP dans la couronne est fort (transition visible entre les zones orange claire et blanche, pour un pourcentage en lécithine le plus faible). Surtout, le pourcentage molaire en lécithine dans la couronne nécessite d'être le plus faible possible pour assurer une inhibition fonctionnelle élevée (transition visible entre les zones rouge foncée et blanche, pour un pourcentage en DOTAP le plus élevé). Ainsi, pour se situer dans la zone d'efficacité optimale, il est nécessaire d'avoir les critères suivants :

- Pourcentage molaire en DOTAP dans la couronne $> 40\%$;
- Pourcentage molaire en lécithine dans la couronne $< 10\%$.

Afin de conforter ce modèle mathématique sur l'inhibition fonctionnelle, une autre lignée cellulaire, avec les cellules PC3-GFP, a été analysée pour la même expérience (Figure III-15). Pour ce cas particulier, il apparaît qu'en plus des deux paramètres précédemment établis comme prédominant pour l'efficacité d'inhibition fonctionnelle (X_1 et X_4), le pourcentage molaire en polymère PEG (X_3) joue également un rôle (Figure III-15). Ce modèle présente également une robustesse élevée assurée par un coefficient de corrélation supérieur à 0,9 ($R^2 = 0,93$). Mathématiquement, il peut être défini qu'une efficacité de transfection fonctionnelle élevée sur cette lignée nécessite :

- Un pourcentage molaire en DOTAP dans la couronne élevée ($40 < X_1 < 60$) ;
- Un pourcentage molaire en lécithine dans la couronne faible ($6 < X_4 < 15$) ;
- Un pourcentage molaire en PEG dans la couronne faible ($20 < X_3 < 50$).

En effet, ce sont les ordres de grandeur permettant, en fonction des trois variables d'entrée, d'obtenir des particules dans la zone verte en forme de cœur (Figure III-15) représentant les plus hautes efficacités de transfection fonctionnelle.

De manière générale, par rapport au modèle avec les cellules Hela-GFP, les mêmes conclusions sont apportées pour les deux premiers paramètres. L'issue révélée en plus, concernant le pourcentage molaire en PEG dans la couronne des particules, était attendue au regard des expériences préliminaires décrites précédemment.

$Y_4 = b_0 + b_{X_1} \cdot X_1 + b_{X_3} \cdot X_3 + b_{X_4} \cdot X_4 + b_{X_1^2} \cdot X_1^2 + b_{X_1 X_3} \cdot X_1 X_3 + b_{X_1^2 X_3} \cdot X_1^2 X_3 + b_{X_1 X_4} \cdot X_1 X_4 + R$		
<i>R</i> : résidus		
$R^2 = 0,9275$ $R^2 \text{ ajusté} = 0,8550$	$b_0 = -25265$ $b_{X_1} = 148040$ $b_{X_3} = 46313$ $b_{X_4} = 15974$	$b_{X_1^2} = -149591$ $b_{X_1 X_3} = 272777$ $b_{X_1^2 X_3} = 305397$ $b_{X_1 X_4} = -63811$

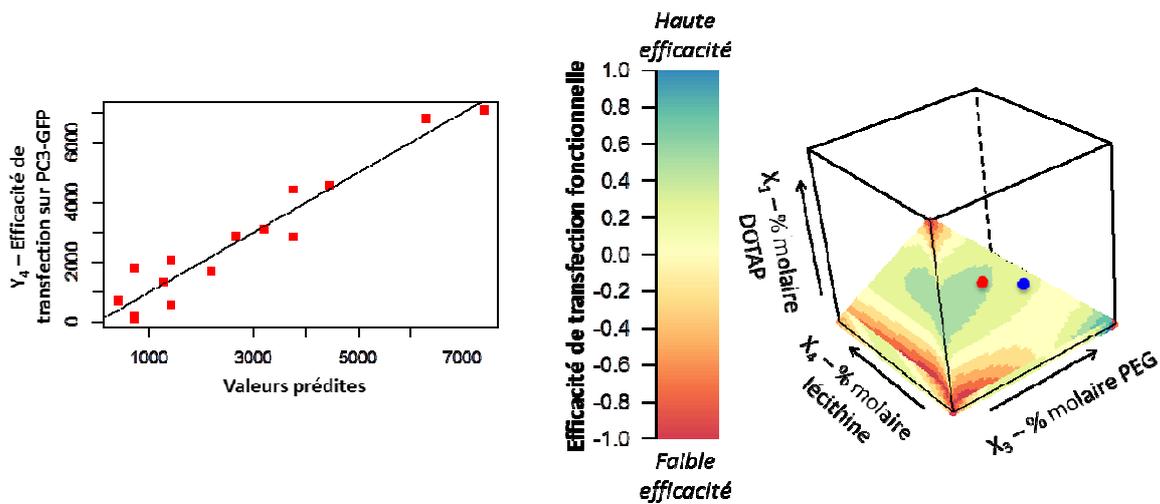


Figure III-15. Modèle de l'efficacité de transfection fonctionnelle sur les cellules PC3-GFP : l'efficacité de transfection fonctionnelle sur PC3-GFP dépend de trois facteurs prédominants : les pourcentages molaires de DOTAP, de lécithine et de polymère PEG dans la couronne des particules. La fluorescence des cellules a été analysée après 72 heures de transfection de siGFP en utilisant les divers essais expérimentaux issus du plan d'expérience comme vecteur. Le tableau présente l'équation du modèle. La courbe en bas à gauche représente les efficacités de transfection expérimentales en fonction des prédictions mathématiques. Le graphique en bas à droite montre la représentation tridimensionnelle de l'efficacité de transfection en fonction des trois paramètres influents. Un code couleur matérialise les efficacités de transfection fonctionnelle des plus basses (rouge) vers les plus hautes (bleu-vert). Les points rouge et bleu représentent respectivement les formulations cLNPa et cLNpb. Analyse de l'inhibition fonctionnelle par cytométrie en flux (FACS BS LSRII).

2.3.4.4. Bilan du plan d'expérience

Lors de l'utilisation de cette approche mathématique, l'objectif défini était d'optimiser des formulations nanoparticulaires à partir des LNP pour la transfection de siARN, en réduisant le nombre d'expérience à effectuer. Par une démarche empirique, une telle étude avec cinq variables d'entrée, et une répétition des échantillons en trois fois pour assurer la robustesse, aurait exigé $3^5 = 243$ formulations. En comparaison, par la rationalisation des résultats obtenus, la démarche mathématique n'a nécessité que 36 formulations pour définir une composition optimisée, avec des bornes restreintes pour les différents composants. De plus, l'interaction entre les différents facteurs a été prise en compte apportant une conclusion plus aboutie et raisonnée. Ainsi, alors que le pourcentage molaire dans la couronne de DOTAP nécessite d'être élevé (> 40%), les pourcentages molaires dans la couronne de lécithine et de polymère PEG doivent être réduits en conséquence.

En effet, la composition en polymère PEG semble être prépondérante dans l'établissement de la stabilité colloïdale des particules. Ainsi, une balance doit être trouvée pour obtenir une concentration suffisante afin de permettre une stabilité élevée, mais une concentration relativement faible pour éviter les risques d'encombrement stérique néfastes à la complexation. Par ailleurs, le diamètre hydrodynamique post-formulation est également impliqué dans les réponses concernant la stabilité des particules : des formulations possédant une taille comprise entre 40 et 100 nm semblent offrir une stabilité plus élevée. Dès lors, des particules avec une taille d'origine de 30 à 50 nm représentent une meilleure base de travail pour cette application, la réduction de la quantité de polymère augmentant la taille des particules *in fine*. Les autres composants de la particule démontrent une importance plus élevée pour l'efficacité de transfection de siARN fonctionnels. Une inhibition importante de l'expression du gène ciblé exige un pourcentage molaire de la couronne supérieur à 40% pour le lipide cationique de type DOTAP. Cette augmentation du taux de DOTAP se fait au dépend de polymère PEG, mais surtout de la lécithine dont les faibles proportions semblent favoriser l'efficacité de transfection fonctionnelle. Cette étude permet également de conclure mathématiquement que le lipide fusogène, le DOPE, ne démontre pas un impact significatif pour l'amélioration de la transfection fonctionnelle. Dès lors, si la présence de DOPE ne semble pas intervenir pour cette réponse, il semble raisonnable d'émettre l'hypothèse que l'échappement endosomal est favorisé par l'utilisation du DOTAP.

En complément de ces différentes conclusions, l'approche mathématique a permis d'isoler différentes formulations de particule répondant aux critères exigés dans les différents modèles. Ainsi, nous avons choisi la composition particulière présentant la désirabilité la plus élevée (= 0,91), cLNPa, afin de poursuivre notre étude (tableau III-4). Une fois intégrée aux conclusions sur les variables de sortie Y_3 et Y_4 , cLNPa (point rouge sur les figures III-14 et III-15) se situe dans les zones

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

les plus propices à une efficacité optimale. En perspective de nouvelles modifications de surface des particules par greffage de divers ligands, nous avons pris le parti de conserver une autre formulation utilisée lors des essais expérimentaux, cLNPa. En effet, au regard des compétences acquises dans nos laboratoires, le greffage sur des particules, dont le diamètre hydrodynamique est supérieur ou égal à 80 nm, est facilitée. cLNPa ayant démontré des résultats satisfaisants à travers les différents modèles (point bleu dans les figures III-14 et III-15), cette particule peut représenter une alternative intéressante selon les applications souhaitées.

Nom	% molaire DOTAP	% molaire DOPE	% molaire PEG	% molaire Lécithine	Taille de base
cLNPa	60,6 %	06,9 %	26,5 %	06,0 %	30 nm
cLNPa	47,4 %	00,0 %	46,6 %	06,0 %	50 nm

Tableau III-4. Résultat de l'optimisation par de la formulation de nanoparticules lipidiques cationiques pour la transfection : Ces pourcentages molaires représentent la quantité de matière de chaque composant par rapport à la quantité de matière totale dans la couronne (le cœur n'est pas pris en considération). Alors que cLNPa est issue de la conclusion mathématique du plan d'expérience, cLNPa représente une particule testée durant les essais expérimentaux.

En complément de la sélection de ces deux formulations de nanoparticule sujettes à un dépôt de brevet [44], nous avons souhaité savoir si le plan d'expérience pouvait permettre de déterminer mathématiquement une composition de particules possédant un diamètre hydrodynamique semblable à celui de cLNPa. En effet, lors de cette approche, les formulations de particules isolées, avec un fort indice de désirabilité (> 0.9), étaient uniquement issues de modifications sur des particules ayant un diamètre hydrodynamique de base de 30 nm, offrant une taille post-formulation inférieure à 50 nm. Cependant, les modèles définis permettent une approche plus précise, avec une proposition des compositions théoriques répondant spécifiquement aux caractéristiques finales souhaitées (Figure III-16). Ainsi, deux nouvelles formulations ont été proposées, permettant mathématiquement une composition en adéquation avec les zones les plus susceptibles d'autoriser une efficacité d'inhibition fonctionnelle dans les modèles Hela-GFP (Y_3) et PC3-GFP (Y_4).

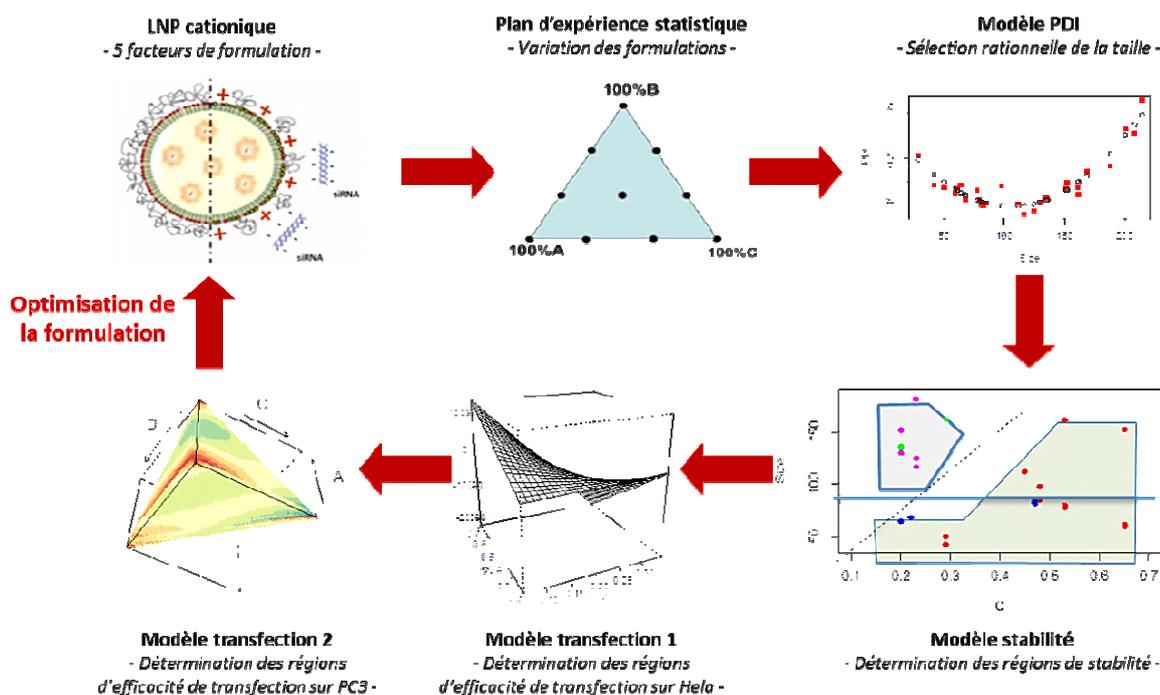


Figure III-16. Principe de l'optimisation mathématique des formulations : Chaque paramètre de sortie permet d'affiner la recherche de la formulation idéale et de proposer une composition en adéquation avec les critères proposés et les réponses obtenues.

Cependant, ces deux formulations optimisées proposées n'ont pas permis une amélioration des réponses dans les modèles Y_3 et Y_4 par rapport à cLNPs, les essais expérimentaux n'ayant pas été en corrélation avec la prédiction mathématique. Cette information tend à prouver que notre plan d'expérience est perfectible, notamment en augmentant le nombre d'essais expérimentaux pour optimiser la limite des zones d'efficacité les plus élevées. En effet, en supprimant un certain nombre de formulation après chaque modèle, les réponses Y_3 et Y_4 n'ont été suivies que pour 14 formulations. En dépit d'un coefficient de corrélation suffisamment fort pour émettre des conclusions, notamment pour les particules issues d'une taille de base de 30 nm représentant la majorité des essais restants, une augmentation du nombre de formulation à tester pourrait accroître la robustesse de cette démarche.

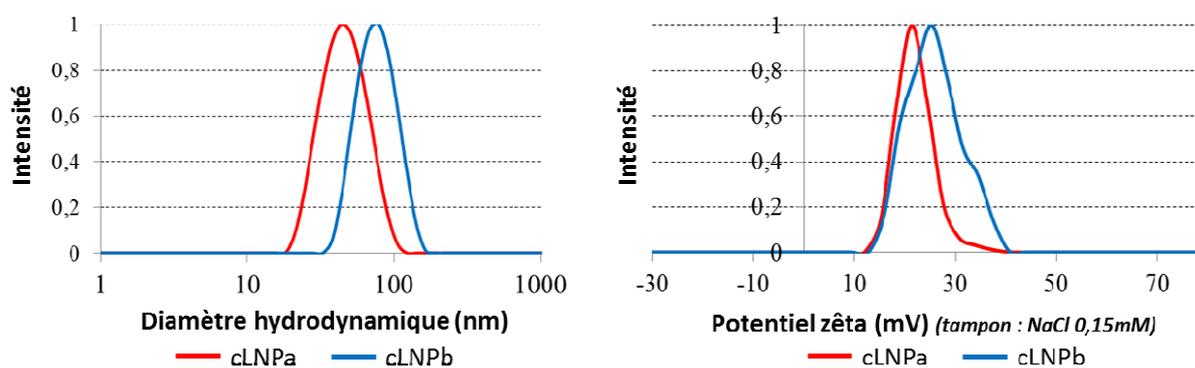
3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules issues du plan d'expérience

3.1. Caractéristiques des nanoparticules cationiques cLNPa et cLN Pb

Comme le plan d'expérience a pu le décrire, les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules formulées peuvent avoir un impact sur les différentes étapes permettant la transfection de siARN, notamment pour assurer une stabilité colloïdale élevée du vecteur. Pour rappel, il a été défini précédemment que les cLNP devaient préférentiellement être caractérisées par un diamètre hydrodynamique entre 40 et 100 nm pour favoriser une stabilité de quelques heures dans un milieu de culture supplémenté par du sérum de veau fœtal. En outre, une description des populations particulières monodisperses exige un diamètre hydrodynamique préférentiellement établi dans cette même gamme de taille.

Les deux formulations choisies, cLNPa (rouge) et cLN Pb (bleu), répondent parfaitement à ce critère (Figure III-17). En effet, cLNPa est décrite par un diamètre hydrodynamique égal à 43 nm et est associée à un PDI de 0,16. Comme prédit par le plan d'expérience, cette formulation particulière se présente sous forme monodisperse, en atteste la distribution gaussienne étroite de cette formulation en termes de taille (rouge). De la même façon, cLN Pb présente un diamètre hydrodynamique d'environ 73 nm. De plus, la distribution en taille de cette formulation est associée à un PDI inférieur à 0,2, et ainsi à une description monodisperse.

Par ailleurs, pour permettre une complexation rapide, les formulations de nanoparticule nécessitent d'exprimer une charge globale cationique. En effet, afin de favoriser l'établissement de liaisons électrostatiques avec les siARN chargés négativement, la présence de charges positives est exigée à la surface des particules. L'incorporation de DOTAP dans les formulations cLNPa et cLN Pb a d'ailleurs permis un potentiel de surface élevé dans un tampon contenant peu de sel (NaCl 0,15 mM). En effet, cLNPa et cLN Pb présente respectivement un potentiel zêta de +23 et +27 mV, attestant d'une charge globale positive de ces particules.



	Diamètre hydrodynamique (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV) (tampon : NaCl 0,15 mM)	Conductivité (mS/cm) (tampon : NaCl 0,15 mM)
cLNPa	42,71 ± 2,09	0,16 ± 0,01	+ 23,10 ± 2,07	0,178 ± 0,028
cLNPa	72,94 ± 0,53	0,16 ± 0,02	+ 27,27 ± 0,21	0,179 ± 0,024

Figure III-17. Caractérisation des nanoparticules lipidiques : Chaque paramètre de sortie permet d'affiner la recherche de la formulation idéale et de proposer une composition en adéquation avec les critères proposés et les réponses obtenues (n=6). Analyse par DLS (Malvern).

Les particules cLNPa sont basées sur une formulation de 30 nm de diamètre hydrodynamique ayant subi des modifications majeures de surface, exigées par l'optimisation mathématique, notamment par l'incorporation de DOTAP et la réduction des concentrations en polymère PEG et en lécithine. La diminution de la quantité de polymère PEG, exerçant une action tensio-active, provoque ainsi une augmentation de la taille de la particule (de 30 à 43 nm). Par ailleurs, cette diminution de la chevelure polymérique diminue les probabilités d'encombrement stérique à la surface des particules et favorise la reconnaissance des charges positives, apportées par le DOTAP, lors de la mesure du potentiel zêta. Sur le même principe, les particules cLNPa, basées sur une formulation de 50 nm, démontrent un diamètre hydrodynamique de 73 nm avec un potentiel de zêta positif par rapport aux particules neutres, ou faiblement négatives, d'origine.

3.2. Compréhension des particules cLNPa et cLNPa à travers leur composition

La composition des nanoparticules peut fournir des informations intéressantes à travers divers calculs et comparaisons avec les particules neutres de base. Ainsi, cLNPa, issue du plan d'expérience, présente des caractéristiques similaires aux particules F30 de base (F30 pour

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

« Formulation de 30 nm »), notamment pour la répartition de la composition entre le cœur et la couronne (Tableau III-5). En effet, dans ces deux cas, le pourcentage molaire de la particule composant le cœur représente 30% laissant une proportion majoritaire dans la couronne. Par rapport à la particule neutre F30, le pourcentage molaire de lécithine est six fois plus faible lors de la formulation de cLNPa. Dans le même sens, le pourcentage molaire en polymère PEG est deux fois plus faible pour les particules cLNPa, permettant ainsi l'obtention d'un pourcentage molaire en DOTAP proche de 38%.

Toutefois, pour les particules cLNPa, issues d'une formulation de particule de 50 nm modifiée, la comparaison de la répartition des composants démontre une structure plus proche des particules F80 (Tableau III-5). En effet, alors que pour une formulation F50, le pourcentage molaire composant le cœur représente 65% de la particule, les particules cLNPa et F80 possèdent un cœur représentant environ 74% de la particule totale ; cette formulation cationique semble donc changer de « catégorie » de particule. Comparées aux F80, les particules cLNPa démontrent une diminution majeure du pourcentage de lécithine et de polymère PEG dans la particule, avec respectivement 3,6 et 1,4 fois moins de composant, permettant d'obtenir une composition de particule comprenant 11,7% de DOTAP.

Particules	% molaire du cœur (Huile + Cire)	% molaire lécithine	% molaire PEG	% molaire DOTAP	% molaire DOPE
F30	28,14	38,42	33,44	0,00	0,00
F50	65,85	11,46	22,69	0,00	0,00
F80	73,56	8,16	18,28	0,00	0,00
cLNPa	33,85	6,16	16,99	38,37	4,63
cLNPa	74,02	2,24	12,04	11,70	0,00

Tableau III-5. Comparaison des fractions molaires entre les différentes particules : les particules les plus petites possèdent une surface qui représente la majeure partie de la particule.

Ainsi, ces deux formulations cationiques démontrent les stratégies exigées par le plan d'expérience, à savoir une augmentation du taux de lipide cationique corrélée à une diminution du taux de lécithine et de polymère PEG dans la formulation.

Dans le cadre de notre étude, la surface disponible peut être considérée comme l'élément clé pour l'interaction avec les siARN à complexer. Nous avons mis en évidence une plus importante quantité de matière à ce niveau pour les particules les plus petites : alors que cLNPa possède une composition de la couronne représentant 26% de la particule, le pourcentage molaire des composants de la surface de cLNPa constitue environ 72% de la particule.

Cette information peut être renforcée par le calcul de la surface spécifique des formulations de nanoparticules lipidiques cationiques, c'est-à-dire de la superficie réelle de la surface. Pour une masse totale et un volume final équivalent, la surface d'une seule particule, issue de la formulation cLNPa, est de 17203 nm³, soit 2,8 fois plus élevée que pour une particule issue de la formulation cLNPa (Tableau III-6). En revanche, en raison d'un nombre de particule supérieur pour cLNPa, la surface spécifique disponible avec cette formulation est 14,03 m², soit 2,46 m² plus élevé que pour la formulation cLNPa (Tableau III-6).

	cLNPa	cLNPa
Masse totale (mg)	2000	2000
Volume totale (mL)	2	2
Ratio surfactants/cœur (m/m)	3,11	0,67
Ratio lipides/surfactant hydrophile PEG (m/m)	0,98	0,40
Surface d'une particule (nm ³)	6082	17203
Nombre de particules/mL	1,15.10 ¹⁵	3,36.10 ¹⁴
Surface spécifique (m ²)	14,03	11,57

Tableau III-6. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules cationiques sélectionnées : la surface spécifique développée par les cLNPa est très importante allant jusqu'à une dizaine de m².

3.3. Étude de la stabilité colloïdale des cLNPa

Le développement d'un vecteur implique certaines contraintes pour faciliter son emploi, voire même pour s'orienter vers une potentielle industrialisation. Il est logiquement plus confortable d'avoir un outil dont l'utilisation est possible sur plusieurs mois, sans altération, qu'un outil utilisable

sur un temps limité post-formulation. Contrairement à de nombreux types de vecteur limités à ce niveau, la structure particulière des NLC favorise cet aspect, comme nous l'avons vu dans le chapitre II. Il reste néanmoins nécessaire de valider nos particules cationiques à ce niveau, d'autant plus avec l'importante diminution de tensio-actif polymérique induite lors de la formulation.

La stabilité colloïdale pour une meilleure conservation n'est pas le seul point à vérifier. En effet, l'un des avantages désirés, notamment vis-à-vis des liposomes, est de garder la structure de la particule intacte pour (1) permettre un contrôle important de chaque étape de la transfection et (2) favoriser une potentielle multifonctionnalité. C'est pourquoi le maintien de l'intégrité de la particule dans les conditions d'utilisation est un facteur important.

Les formulations de cLNP précédemment décrites ont été suivies pendant près de 6 mois afin d'évaluer leur stabilité physique sur le long terme. Pour cela, les particules ont été fabriquées, purifiées par dialyse puis stockées sous forme de dispersion aqueuse (concentration = 3% m/m) à l'abri de la lumière (voir protocole page 134). Le stockage s'effectue dans le tampon utilisé lors de la formulation, à savoir le NaCl 154 mM pour notre cas. Habituellement, les particules sont stockées à 4°C mais pour cette validation, une conservation à 40°C a été effectuée afin d'accélérer le vieillissement, selon les recommandations du développement pharmaceutique [34]. Ce type d'expérience de stabilité accélérée est commun dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques pour évaluer l'intégrité physique et chimique de formulations dans diverses conditions environnementales [45]. La stabilité physique des formulations particulières est ainsi évaluée par observation visuelle de l'aspect de la dispersion (absence de dépôt/crémage) et par mesure de leur diamètre hydrodynamique, de leur polydispersité et de leur charge de surface (Figure III-18).

Aucune variation significative n'a pu être mise en évidence pendant la période de 23 semaines de l'étude. Les instances pharmaceutiques considèrent que l'étude de vieillissement accéléré de particules sur 6 mois est représentative d'une étude de stabilité à température ambiante sur 24 mois. Ainsi, ces tests mettent en évidence une grande stabilité colloïdale des cLNP sur une période longue d'au moins deux ans.

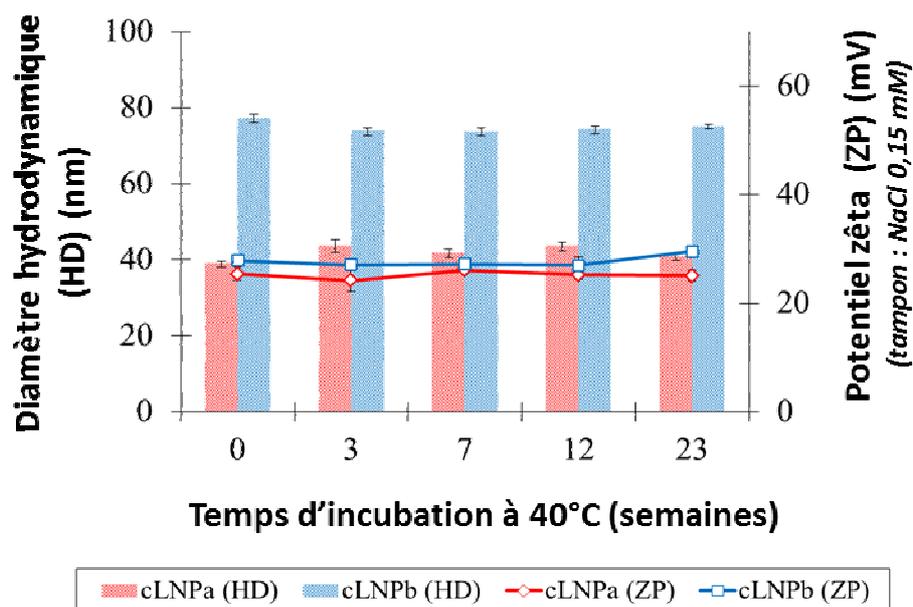


Figure III-18. Stabilité colloïdale des particules cationiques : cLNPa (rouge) et cLNpb (bleu) restent stables dans le temps en termes de diamètre hydrodynamique (histogrammes) et de potentiel zêta (courbes). ($n=3$, $p<0.001\%$). Analyse par DLS (Malvern).

Les caractéristiques des particules cLNP, concernant la conservation en termes de taille et de charge, offrent une possibilité d'être utilisés sur le long terme sans altération en stabilité colloïdale. La conservation du potentiel zêta au cours du temps est d'autant plus importante que la stratégie que nous souhaitons employer, reposant sur l'établissement de liaisons électrostatiques avec les siARN, exige une charge positive de la particule. Ainsi, la possibilité de complexation avec les siARN reste théoriquement réalisable, même après 24 mois de conservation à température ambiante. Cependant, des études complémentaires semblent nécessaires pour assurer le maintien de l'intégrité des nanoparticules, notamment concernant les possibilités de fuite des composants (DOTAP, PEG, ...). En ce sens, des protocoles sont en cours de mise au point, permettant la mesure post-formulation du relargage de lipides cationiques par des mesures analytiques par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Par ailleurs, la formulation de nanoparticules en solution, caractérisées pour une stabilité colloïdale élevée sur le long terme, permet de s'émanciper d'une alternative de conservation par lyophilisation. Cet avantage présente un intérêt considérable de par les difficultés de mise en place de ce type de processus sur de telles nanoparticules lipidiques. En effet, la première étape de lyophilisation nécessite une congélation des formulations de particule. Or, une diminution de

température trop importante peut provoquer des phénomènes de cristallisation au niveau du cœur de la particule, et ainsi impacter directement ses propriétés physico-chimiques.

4. Discussion

Les particules formulées lors de ce chapitre, suite à une optimisation rationnelle par un plan d'expérience, peuvent être comparées aux particules de composition proche développées au niveau de l'état de l'art pour la transfection de séquences d'acides nucléiques.

Lors de l'interprétation des modèles du plan expérimental, nous avons observé l'importance du diamètre hydrodynamique post-formulation sur le niveau de polydispersité des formulations. Les nanoparticules de type SLN développées par del Pozo-Rodríguez *et al.*, pour la transfection de séquences plasmidiques, présentent des tailles considérables, comprises entre 350 et 400 nm, corrélées à un indice de polydispersité variable de 0,2 à 0,4 [29]. Le caractère polydisperse de telles formulations peut engendrer une difficulté pour la compréhension et le contrôle de la transfection d'acides nucléiques basés sur ces vecteurs. Par ailleurs, et à notre connaissance, les particules de type SLN, décrites dans la littérature pour transporter les siARN, possèdent un diamètre hydrodynamique supérieur à 100 nm. Ainsi, Yu *et al.*, dont l'objectif est la délivrance simultanée de siARN et de paclitaxel, utilisent des particules cationiques de tailles comprises entre 140 et 150 nm [31]. Dans la volonté de complexer des siARN en surface, développer des particules possédant des tailles plus petites peut représenter une stratégie intéressante pour augmenter la surface spécifique disponible, pour une même quantité de matière. De cette manière, théoriquement, une surface spécifique plus importante favorise une superficie plus élevée disponible pour l'accessibilité des siARN. Ainsi, une quantité de matière moins importante peut être nécessaire pour complexer le même nombre de séquence d'acides nucléiques.

Le point essentiel dans notre stratégie consiste à apporter un certain nombre de charge cationique à la surface. En ce sens, nous avons développé des particules cationiques présentant un potentiel zêta entre +23 et +30 mV (dans un tampon NaCl 0,15 mM). Cependant, comme nous pouvons l'observer, cLNpb démontre un caractère plus cationique (+ 4 mV) malgré un pourcentage molaire en DOTAP dans la particule trois fois plus faible que les cLNPa. Ainsi, le diamètre hydrodynamique semble avoir une influence dans l'établissement de cette mesure : la surface spécifique totale d'une formulation est plus faible pour les particules de grande taille en raison d'un nombre de nanogoutte inférieur, pour une même masse totale en produit. Cependant, considéré individuellement, les particules de taille supérieure possèdent une surface plus grande (Tableau III-6)

permettant d'incorporer plus de lipide cationique et de présenter un potentiel zêta plus élevé. Ainsi, la comparaison à travers ce paramètre semble difficile en raison des différences de taille entre les vecteurs, la mesure du potentiel de surface des particules considérées individuellement n'étant pas forcément représentative de toute la surface disponible d'une formulation, pour une même masse totale en produit. Néanmoins, nous pouvons citer les travaux de del Pozo-Rodríguez *et al.* et Yu *et al.* qui, en utilisant la même stratégie, ont développé des particules possédant un potentiel zêta situé entre 43 et 50 mV (dans un tampon NaCl 0,1 mM [29] ou dans l'eau déionisée [31]). Les différences majeures de diamètre hydrodynamique avec nos vecteurs limitent cependant l'interprétation.

L'un des avantages majeurs des nanoparticules lipidiques que nous avons développé concerne leur très forte stabilité colloïdale sur le long terme. D'après Heydenreich *et al.*, l'un des facteurs essentiels contribuant à cette stabilité est la méthode choisie pour purifier les échantillons formulés [46]. En effet, une même formulation purifiée par ultrafiltration, ultracentrifugation, dialyse ou non-purifiée présente des différences majeures au niveau de ces caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, dans cette étude, la purification par ultracentrifugation ou par dialyse permet une stabilité colloïdale de 8 semaines à 4°C tandis que les autres préparations démontrent une augmentation majeure de la taille et du PDI après une semaine seulement [46]. Au-delà de la composition, le protocole employé pour nos formulations (voir protocole page 134) semble pouvoir contribuer au caractère stable de nos particules cLNP.

5. Conclusion sur la conception des cLNP

Lors de ce premier chapitre, notre objectif était de prouver la faisabilité de l'utilisation des particules de type LNP pour la transfection de siARN, suite à une complexation de surface avec ces séquences d'acides nucléiques. En outre, nous souhaitons décrire la formulation des particules LNP, développées dans nos laboratoires, afin de l'optimiser et de l'adapter à cette application.

L'intégration de lipides cationiques dans la membrane des nanoparticules a permis d'augmenter leur potentiel de surface pour assurer l'établissement de liaisons électrostatiques avec les acides nucléiques chargés négativement. Par ailleurs, la diminution de l'encombrement stérique, permise par un ajustement de la quantité de polymère PEG, s'est avérée être une condition importante pour permettre une transfection fonctionnelle de siARN. Une fois ces données établies, une approche mathématique nous a permis d'isoler des modèles afin d'améliorer la compréhension des critères exigés pour (1) une stabilité élevée et (2) une inhibition fonctionnelle efficace suite à la transfection de siARN. Pour répondre aux exigences imposées, nous avons établi mathématiquement

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transfecter des siARN

une balance subtile dans la composition des différents éléments de la couronne de la particule : la quantité de PEG est essentielle pour la stabilité de la particule, mais un taux trop élevé de ce polymère peut nuire à l'efficacité de transfection fonctionnelle. De même, les quantités de lécithine et de DOTAP doivent être ajustées pour permettre l'inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN. À travers ces modèles, une composition optimisée a pu être développée pour formuler les particules cationiques cLNPa et cLN Pb.

Au regard de l'état de l'art, ces deux formulations particulières présentent des caractéristiques avantageuses en termes de monodispersité, et surtout de stabilité colloïdale au cours du temps. De plus, leur charge de surface globalement cationique peut permettre d'envisager une complexation rapide avec les siARN anionique. Le prochain chapitre se concentrera sur l'analyse des interactions entre ces vecteurs cationiques et les siARN, notamment en ce qui concerne les étapes de complexation et de rétention permises par les particules cLNP.

Bibliographie

1. Delmas T, Fraichard A, Bayle P-A, Texier I, Bardet M, Baudry J, Bibette J, Couffin A-CC. Encapsulation and Release Behavior from Lipid Nanoparticles: Model Study with Nile Red Fluorophore. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012 Jun 1;1(1):16–25.
2. Fortin P-Y, Genevois C, Koenig A, Heinrich E, Texier I, Couillaud F. Detection of brain tumors using fluorescence diffuse optical tomography and nanoparticles as contrast agents. *Journal of biomedical optics*. 2012 Dec;17(12):126004.
3. Goutayer M, Dufort S, Josserand V, Royère A, Heinrich E, Vinet F, Bibette J, Coll J-L, Texier I. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2010 Jun;75(2):137–47.
4. Gravier J, Navarro FP, Delmas T, Mittler F, Couffin A-C, Vinet F, Texier I. Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics*. 2011 Sep;16(9):096013.
5. Navarro FP, Berger M, Guillermet S, Josserand V, Guyon L, Neumann E, Vinet F, Texier I. Lipid Nanoparticle Vectorization of IndoCyanine Green Improves Fluorescence Imaging for Tumor Diagnosis and Lymph Node Resection. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012 Oct 1;8(5):730–41.
6. Texier I, Goutayer M, Da Silva A, Guyon L, Djaker N, Josserand V, Neumann E, Bibette J, Vinet F. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics*. 2009;14(5):054005.
7. Delmas T, Piraux H, Couffin A-C, Texier I, Vinet F, Poulin P, Cates ME, Bibette J. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2011 Mar 1;27(5):1683–92.
8. Navarro FP, Mittler F, Berger M, Josserand V, Gravier J, Vinet F, Texier I. Cell Tolerability and Biodistribution in Mice of Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012 Aug 1;8(4):594–604.

9. Vauthier C, Couvreur P. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. Techniques de l'ingénieur E.T.I., Editor. 2008.
10. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941–53.
11. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles – production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;47(2-3):165-196.
12. Muller RH, Mader K, Gohla SH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50:161-177.
13. Garud A, Singh D, Garud N. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2012;1(11):384-393.
14. zur Mülhen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998;45:149-155.
15. Rossi J, Leroux JC. Principles in the development of intravenous lipid emulsions. In *Role of lipids excipients in modifying oral and parenteral drug delivery*. K.M.Wasan, Editor. 2007, John Wiley&Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA.
16. Mader K. Solid Lipid Nanoparticles as drug carriers, in *Nanoparticulates as drug carriers*. V.P.Torchilin, Editor. 2006. Imperial College Press: London, UK.p187-212.
17. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2006 Oct 18;18(41):R635–66.
18. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*. 2004 May 20;108-109:303–18.
19. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2006 Oct 18;18(41):R635–66.
20. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcíacelma M. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005 Oct;10(3-4):102–10.

Chapitre III. Conception de nanoparticules lipidiques cationiques en vue de transférer des siARN

21. Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Mühlen A, Weyhers H, Freitas C, Rühl D. Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995;41:62-69.
22. Mangenheim B, Lvy MY, Benita S. A new in vitro technique for evaluating of drug release profile from colloidal carriers – ultrafiltration technique at low pressure. *International Journal of Pharmaceutics.* 1993;94:115-123.
23. Saupe A, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC) – two different carrier systems. *Bio-Medical Materials and Engineering.* 2005;15:393-402.
24. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002;242:121–8.
25. Bunjes H, Westesen K, Koch MJH. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics.* 1996; 129:159-173.
26. Westesen K, Bunjes H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix?. *International Journal of Pharmaceutics.* 1995;115(1):129-131.
27. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2004 Mar 5;95(2):217–27.
28. Delmas T, Couffin A-C, Bayle PA, de Crécy F, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J, Texier I. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tunable viscosity. *Journal of colloid and interface science.* 2011 Aug 15;360(2):471–81.
29. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís M a, Gascón a R, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *International journal of pharmaceutics.* 2007 Jul 18;339(1-2):261–8.
30. Doktorovova S, Shegokar R, Rakovsky E, Gonzalez-Mira E, Lopes CM, Silva a M, Martins-Lopes P, Muller RH, Souto EB. Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): structure, stability and DNA

- binding capacity correlation studies. *International journal of pharmaceutics*. 2011 Nov 28;420(2):341–9.
31. Yu YH, Kim E, Park DE, Shim G, Lee S, Kim YB, Kim CW, Oh YK. Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012 Feb;80(2):268–73.
 32. Kong WH, Park K, Lee M-Y, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials*. 2013 Jan;34(2):542–51.
 33. Tabatt K, Sameti M, Olbrich C, Müller RH, Lehr C-M. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2004 Mar;57(2):155–62.
 34. Agency EM. European Medicines Agency. *Reproduction*. 2003;(August):1–20.
 35. Porter SC, Verseput RP, Cunningham CR. *Process Optimization Using Design of Experiments*. *Pharmaceutical Technology*. 1997;21(10) :60-70.
 36. Pernot M, Bastogne T, Barry NPE, Therrien B, Koellensperger G, Hann S, Reshetov V, Barberi-Heyob M. Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 2012 Dec 5;117:80–9.
 37. Bastogne T, Samson a, Vallois P, Wantz-Mézières S, Pinel S, Bechet D, Barberi-Heyob M. Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model. *Journal of theoretical biology*. 2010 Feb 7;262(3):544–52.
 38. David S, Marchais H, Hervé-Aubert K, Bedin D, Garin A-S, Hoinard C, Chourpa I. Use of experimental design methodology for the development of new magnetic siRNA nanovectors (MSN). *International journal of pharmaceutics*. 2013 Oct 1;454(2):660–7.
 39. Nguyen J, Szoka FC. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Accounts of chemical research*. 2012 Jul 17;45(7):1153–62.

40. Kabalnov A. Ostwald ripening and related phenomena. *Journal of dispersion science and technology*. 2001;22(1):1-12.
41. Delmas T. Caractérisation physicochimique et compréhension des propriétés de vectorisation des nanoparticules lipidiques pour les applications biomédicales. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie. 2011.
42. Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical and experimental design. Drugs and pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Decker, Inc. 1999; Volume 92.
43. Goupy J. *La méthodologie des plans d'expériences : optimization du choix des essais & de l'interprétation des résultats*. Paris : Dunod. 1988 ; Volume 303.
44. Bruniaux J, Navarro FP, Sulpice E, Texier I, Gidrol X. Formulation pour la délivrance de séquences nucléotidiques susceptibles de moduler des mécanismes endogènes d'ARN interférents. 2013;Patent n°WO2014032953 A1.
45. ICH, *Stability testing of new drug substances and products*. Q1 A (R2).
46. Heydenreich a. Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres—effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003 Mar 18;254(1):83–7.

CHAPITRE IV

Caractérisation des interactions nanoparticules/siARN

Chapitre IV. Caractérisation des interactions nanoparticules/siARN	197
1. Complexation : compréhension et optimisation	199
1.1. Caractérisation théorique de l'interaction cLNP/siARN.....	199
1.2. Optimisation du rapport N/P pour la complexation	201
2. Étude de rétention des siARN sur les particules cLNP.....	206
2.1. Rétention dans le tampon Hepes 5 mM	206
2.2. Rétention dans le milieu de culture utilisé pour la transfection.....	207
3. Stabilité colloïdale des particules dans les conditions de transfection	209
3.1. Principe de la technique de FRET.....	210
3.2. Résistance des particules cLNP à la dilution	212
3.3. Stabilité des cLNP dans le milieu de culture utilisé pour la transfection	215
4. Discussion	217
5. Conclusion	218

Les formulations de nanoparticules lipidiques cLNP ont été optimisées pour la transfection de séquences d'acides nucléiques telles que des siARN. Théoriquement, les vecteurs que nous avons décrits précédemment présentent toutes les caractéristiques nécessaires pour établir des liaisons électrostatiques avec les siARN, à savoir des charges positives et une surface disponible importante. Toutefois, une caractérisation plus avancée de l'interaction entre particules et siARN est nécessaire afin de prouver la faisabilité d'une complexation rapide, simple et post-formulation. En outre, au regard de l'état de l'art [1-5], une complexation efficace nécessite une optimisation des quantités de vecteur à utiliser pour transporter une quantité définie de siARN. Ainsi, ce chapitre permet de répondre à ces objectifs et de se positionner par rapport à un agent commercial pour ce type d'application.

1. Complexation : compréhension et optimisation

1.1. Caractérisation théorique de l'interaction cLNP/siARN

L'attraction électrostatique consiste en une combinaison constituée d'un cation et d'un anion se maintenant au voisinage l'un de l'autre, ceci par une attraction coulombienne des charges électriques opposées. Ainsi, pour permettre une uniformisation dans les concentrations utilisées, en cLNP et en siARN, la caractérisation des interactions entre ces molécules peut être effectuée en termes de « nombre de charge positive/nombre de charge négative ».

Nous définissons ici le rapport N/P comme le rapport molaire du « nombre de groupement ammonium N », présent sur les molécules de DOTAP incluses dans les particules, sur le « nombre de groupement phosphate P » présent sur les nucléosides des siARN. Ainsi, le rapport N/P molaire permet d'établir un rapport « nombre de charge positive » sur « nombre de charge négative » (Figure IV-1). Par ailleurs, pour la formulation cLNPa contenant une faible proportion de DOPE, nous avons choisi de prendre en compte la charge de cette molécule dans le calcul final du rapport N/P, en dépit d'un caractère globalement neutre de ce lipide (voir la structure page 200). Les faibles proportions de ce lipide fusogène ne modifie que très légèrement les calculs.

Ainsi, les rapports N/P pour les deux particules ont été calculés et associés aux concentrations finales en DOTAP (Tableau IV-1). Nous avons choisi de décrire les quantités en nanoparticules par rapport à la concentration en lipide cationique DOTAP, cette molécule étant directement responsable de l'association avec les siARN. Les données du tableau IV-1 ont été calculées en fonction des conditions de transfection (Volume final = 500 μ L ; [siARN]_f = 20 nM). Cependant, un ajustement de ces calculs est nécessaire en cas de modification de l'un de ces deux

paramètres. En effet, pour une même concentration en siARN, une modification du volume final provoque une variation du nombre de groupements PO^{4-} et N^+ . Dans le même temps, pour un volume final fixé, une modification de la concentration en siARN provoque une variation du nombre de groupements PO^{4-} , mais également un ajustement de la concentration en DOTAP (et en groupement N^+) pour maintenir le même rapport N/P.

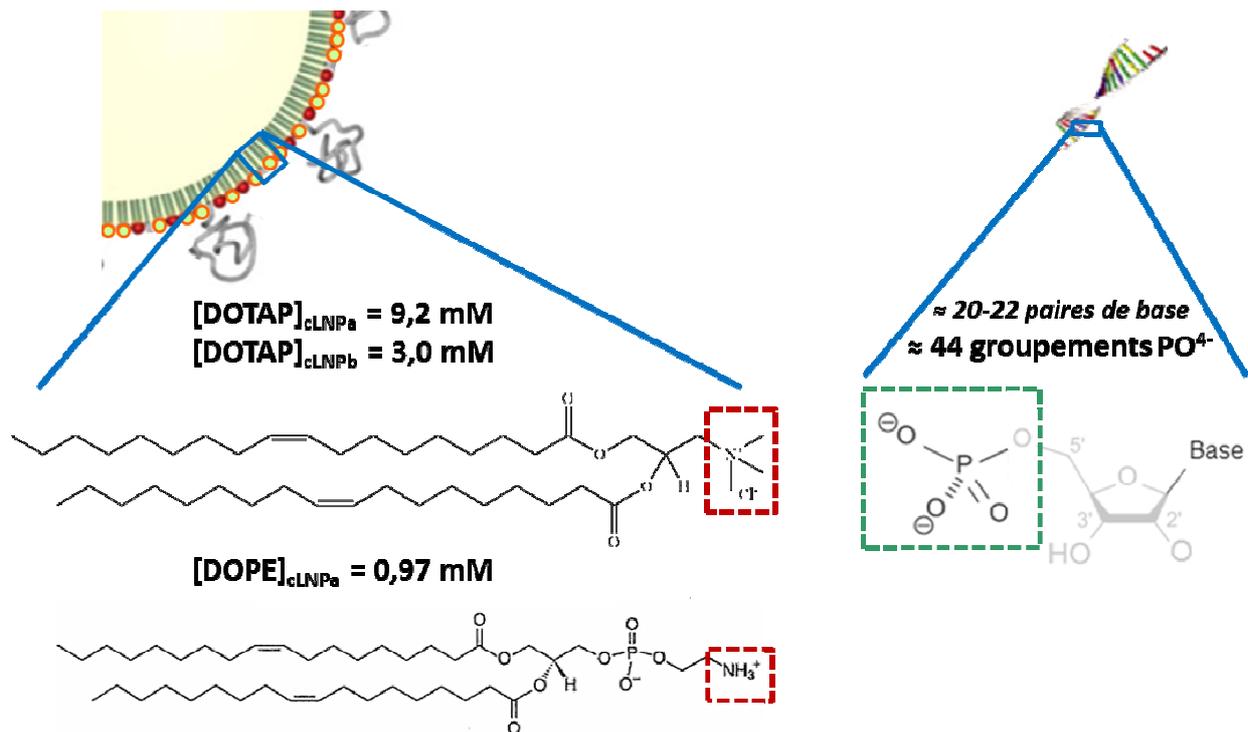


Figure IV-1. Définition du rapport N/P : le groupement ammonium de la molécule de DOTAP (rouge) apporte la charge cationique tandis que le groupement phosphate du nucléoside monophosphate associé à chaque base (vert) fourni la charge négative.

Dans le tableau IV-1, l'augmentation du rapport N/P, et ainsi du nombre de cLNP pour une même concentration en siARN, provoque une réduction du nombre de siARN par particule. Pour cLNPa, alors que le rapport 1/1 voit une distribution de 200 siARN par particule, l'augmentation de la quantité en nanovecteur, et ainsi de la quantité en groupement N^+ , permet de réduire le nombre de séquence d'acides nucléiques à 4 par particule. La surface disponible sur les particules cationiques augmentant, la distance théorique entre les siARN est logiquement plus élevée. Le même phénomène est observé avec les nanovecteurs cLNpb.

cLNPa										
N/P	1	2	3	4	6	8	12	16	24	36
n (moles) groupements PO ⁺	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
n (nmoles) groupements N ⁺	0,44	0,88	1,32	1,76	2,64	3,52	5,28	7,04	10,56	15,84
[DOTAP] (µg/mL)	0,53	1,06	1,59	2,11	3,17	4,23	6,34	8,51	12,68	19,02
siARN/LNP	147,12	72,94	48,63	36,47	24,31	18,24	12,16	9,18	6,12	4,09
Nombre de siARN/nm ²	2,93E-02	1,45E-02	9,67E-03	7,26E-03	4,84E-03	3,63E-03	2,42E-03	1,83E-03	1,22E-03	8,07E-04
Distance entre les siARN (nm ²)	34,17	68,91	103,37	137,83	206,74	275,65	416,48	547,63	821,45	1240,44

cLNPa										
N/P	1	2	3	4	6	8	12	16	24	36
n (moles) groupements PO ⁺	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
n (nmoles) groupements N ⁺	0,44	0,88	1,32	1,76	2,64	3,52	5,28	7,04	10,56	15,84
[DOTAP] (µg/mL)	0,58	1,17	1,75	2,33	3,50	4,67	7,00	9,33	14,00	21,00
siARN/LNP	199,77	99,89	66,59	49,94	33,36	24,97	16,65	12,49	8,32	5,55
Nombre de siARN/nm ²	1,30E-02	6,50E-03	4,33E-03	3,25E-03	2,17E-03	1,62E-03	1,08E-03	8,12E-04	5,41E-04	3,61E-04
Distance entre les siARN (nm ²)	77,06	154,12	231,18	308,24	461,51	616,48	924,72	1232,96	1849,44	2774,16

Pour $V_f = 500 \mu\text{L}$
 $[\text{siARN}]_f = 20 \text{ nM}$

Tableau IV-1. Données sur l'interaction entre les nanoparticules et les siARN : chiffrage des concentrations en DOTAP et du nombre de siARN par LNP en fonction du rapport N/P. Pour ces calculs, les données V_f et $[\text{siARN}]_f$ ont été fixées d'après les pratiques de laboratoire. En orange, les rapports N/P à éviter, définis d'après les caractéristiques de la particule établies chapitre IV.

1.2. Optimisation du rapport N/P pour la complexation

Cette étape, précédant la transfection, doit être parfaitement maîtrisée pour obtenir un vecteur autorisant une délivrance contrôlée, limitant ainsi les risques décrits dans le chapitre I. En effet, la concentration en nanoparticule doit être suffisante pour permettre une complexation totale, sans perte de siARN. Afin d'isoler le rapport N/P optimal pour une complexation efficace, différentes concentrations en nanoparticule ont été associées avec une quantité constante en siARN (voir protocole page 140). Une fois déposé dans les puits d'un gel d'agarose pour une étape d'électrophorèse, les siARN sous forme libre migrent en raison d'un faible poids moléculaire (13 kDa) et d'une charge négative. Dans le cas d'une complexation efficace, de par leur poids moléculaire élevé ($> 10^4$ kDa) et leur charge globale positive, les nanoparticules empêchent la migration des siARN qui reste à leur surface (Figure IV-2). Lors de cette expérience, une détection et une quantification des particules et des siARN est permise par fluorescence : de par leurs propriétés, les particules ont pu être formulées en encapsulant un fluorophore dérivé de la cyanine 5, le DiD (voir protocole page 134), tandis que des siARN marqués avec l'alexa-488 sont utilisés pour la complexation.

L'étude de la complexation de siARN avec les particules cLNPa a permis de mettre en évidence une diminution de la quantité de siARN libre corrélée à l'augmentation du rapport N/P

utilisé, et ainsi de la concentration en particule. En effet, par rapport au contrôle sans vecteur, l'augmentation de la quantité de cLNPa, jusqu'à un rapport molaire N/P égal à 3/1, induit une diminution de la quantité de siARN libre de 87%. Mieux encore, les quantités de particule utilisées, à partir du rapport molaire N/P égal à 4/1, démontrent une absence totale de siARN libre, resté complexé aux nanoparticules cLNPa (Figure IV-2).

De la même façon, l'utilisation des particules cLNPa, à un rapport molaire de 3/1, provoque une diminution de la quantité de siARN sous forme libre de 47%. En outre, à partir du même rapport molaire N/P que celui observé avec les particules cLNPa, c'est-à-dire le rapport 4/1, aucun siARN ne reste sous forme libre, témoignant d'une complexation totale (Figure IV-2).

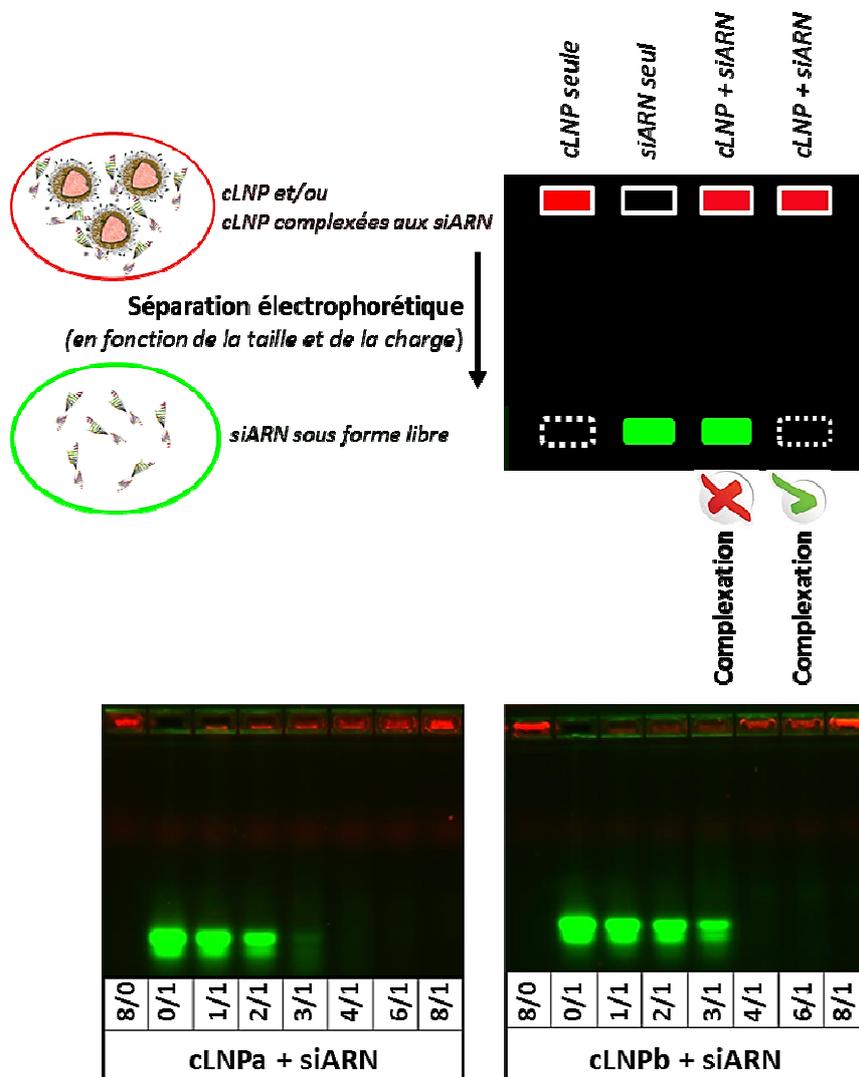


Figure IV-2. Optimisation du rapport molaire N/P : les siARN sont complexés aux nanoparticules lipidiques cLNPa et cLNPa suivant différents rapports molaires N/P, puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose 4%. Une étape d'électrophorèse permet de séparer les siARN-Alexa488 (vert) des cLNP-DiD (rouge) (n=6) ([siARN = 1,5 μ M – Tampon utilisé : Hepes 5 mM).

Ainsi, le rapport molaire N/P de 4/1 représente le seuil à partir duquel la quantité de nanoparticule cLNP permet une complexation totale des siARN. Au regard de ces résultats, et afin d'assurer une concentration optimale de nanoparticule cationique utilisé, nous avons choisi de continuer l'étude avec un rapport molaire N/P établi à 12/1, soit une concentration trois fois plus élevée que le seuil défini précédemment.

Une comparaison est possible avec l'efficacité de complexation observée en utilisant des particules lipidiques cationiques commercialisées, la Lipofectamine RNAimax (Figure IV-3). En suivant les recommandations d'utilisation du fournisseur, la complexation avec ce vecteur laisse 30% de siARN sous forme libre, démontrant ainsi une incapacité de ce lipoplexe à retenir toutes les séquences d'acides nucléiques (Figure IV-3). En outre, cette expérience étant réalisée dans un tampon Hepes 5 mM, des conditions plus difficiles (milieu de culture supplémenté par du sérum de veau foetal) pourraient provoquer un pourcentage de siARN libre plus élevé.

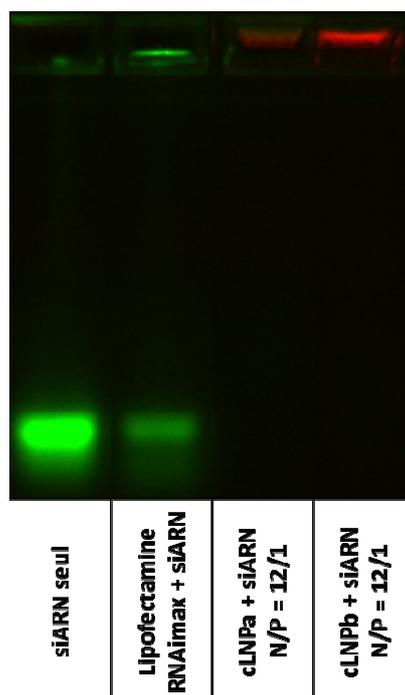


Figure IV-3. Comparaison de la complexation avec un agent commercial : les siARN sont complexés avec la Lipofectamine RNAimax, aux nanoparticules lipidiques cLNPa et cLNPb puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose 4%. Une étape d'électrophorèse permet de séparer les siARN-Alexa488 (vert) des cLNP-DiD (rouge) (n=6) ([siARN = 1,5 μ M – Tampon utilisé : Hepes 5 mM – N/P = 12/1 – Lipofectamine RNAimax utilisée dans les quantités proposées par le fournisseur).

Dans les mêmes conditions, et comme observé précédemment, l'utilisation des vecteurs de type cLNP pour la complexation permet une rétention de la totalité des siARN sur les particules (Figure IV-3). En outre, une mesure de l'impact de cette complexation sur les cLNP a été réalisée par une observation de l'évolution du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta par mesure DLS, avec ou sans siARN. Néanmoins, en dépit d'une complexation efficace prouvée, aucune modification significative de la taille des particules n'a été observée (données non montrées). Pour expliquer cette absence de variation, le calcul du nombre de siARN par particule a été réalisé (Tableau IV-1), admettant les conditions de transfection (Volume final = 500 μL ; $[\text{siARN}]_f = 20 \text{ nM}$). Le calcul effectué pour la complexation avec les particules cLNPa est décrit figure IV-4.

$$\begin{aligned} \text{Nombre de siARN} &= \text{Nombre d'Avogadro} \times \text{Quantité totale de siARN (mole)} \\ &= 6,022 \cdot 10^{23} \times 0,01 \cdot 10^{-9} \\ &= 6,022 \cdot 10^{12} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume d'une cLNP (nm}^3\text{)} &= \frac{4}{3} \times \pi \times \text{rayon}^3 \\ &= \frac{4}{3} \times \pi \times 22^3 = 44\,602 \\ \text{Volume total de lipide (nm}^3\text{)} &= \frac{\text{Masse totale de la phase dispersée (g)}}{\text{Densité totale des lipides (g/cm}^3\text{)}} \times 10^{21} \\ &= \frac{0,108}{1,05} \times 10^{21} = 1,03 \cdot 10^{20} \\ \text{Nombre total de cLNP} &= \frac{\text{Volume total de lipide (nm}^3\text{)}}{\text{Volume d'une particule (nm}^3\text{)}} \\ &= \frac{1,03 \cdot 10^{20}}{44602} = 2,31 \cdot 10^{15} \\ \text{Nombre de cLNP/mL} &= \frac{\text{Nombre total de particule}}{\text{Volume (mL)}} \\ &= \frac{2,31 \cdot 10^{15}}{2} = 1,15 \cdot 10^{15} \\ \text{Nombre de cLNP/puits} &= \text{Nombre de cLNP/mL} \times \text{volume cLNP (mL)} \\ &= 1,15 \cdot 10^{15} \times 0,43 \cdot 10^{-3} = 4,95 \cdot 10^{11} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Nombre de siARN/cLNP} &= \frac{\text{Nombre de siARN}}{\text{Nombre de cLNP}} \\ &= \frac{6,022 \cdot 10^{12}}{4,95 \cdot 10^{11}} = 12,16 \end{aligned}$$

Figure IV-4. Calcul du nombre de siARN par particule : les calculs sont effectués pour un rapport molaire N/P de 12/1 avec des nanoparticules lipidiques cLNPa, dans des conditions de transfection ($V_f = 500 \mu\text{L}$ / $[\text{siARN}]_f = 20 \text{ nM}$).

Ainsi, pour un rapport molaire N/P de 12/1, chaque nanoparticule cLNPa et cLNPa est respectivement associée à environ 12 et 17 siARN en moyenne. Ce nombre très faible pourrait expliquer l'absence de variation du diamètre hydrodynamique suite au protocole de complexation. En effet, les particules cLNPa et cLNPa ont un poids moléculaire approximativement égal à $2,82 \cdot 10^4$ et $1,34 \cdot 10^5$ KDa, soit 2170 et 10310 fois plus élevé que celui des siARN. Considérant cette différence importante, les quelques siARN présents sur la surface des LNP peuvent paraître insignifiant.

Après avoir défini une efficacité de complexation élevée avec des siARN, les particules cLNPa ont été testées afin d'évaluer la possibilité de créer des liaisons électrostatiques avec d'autres types de séquences d'acides nucléiques (Figure IV-5). Ainsi, des tests de complexation ont été effectués avec un mélange de siARN et de séquences d'ADN de 100 paires de base. Suivant le protocole défini précédemment, pour une concentration constante en séquences d'acides nucléiques, la concentration en cLNPa a été augmentée afin d'évaluer le rapport $N/P_1/P_2$ (« charge positive du DOTAP »/ « charge négative du siARN »/ « charge négative de l'ADN ») permettant une complexation de 100%. Comme pour les siARN seuls, à partir du rapport molaire $N/P_1/P_2$ égal à 4/1/1, aucune séquence d'acides nucléiques n'est observée sous forme libre, démontrant une complexation totalement efficace.

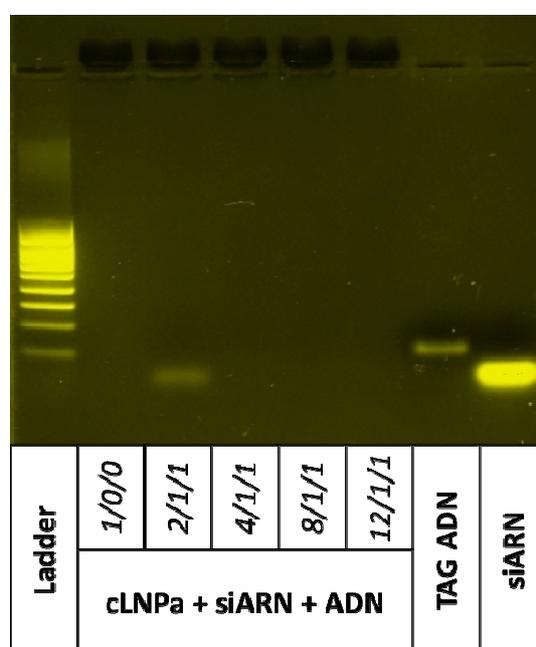


Figure IV-5. Complexation avec plusieurs séquences d'acides nucléiques : la complexation simultanée des nanoparticules cLNPa avec des siARN et des séquences d'ADN est testée. Différentes concentrations en particule sont utilisées avec une quantité constante de siARN et d'ADN pour établir des ratios molaires $N/P_1/P_2$ (N provenant de la particule, P_1 du siARN et P_2 de la séquence d'ADN).

En conclusion, les particules de type cLNP démontrent, non seulement une forte complexation avec des siARN, mais également une possibilité de créer une association robuste avec d'autres types de séquences d'acides nucléiques plus longues, telles que des séquences d'ADN. Ce résultat offre ainsi l'opportunité d'envisager la vectorisation de différentes molécules anioniques.

2. Étude de rétention des siARN sur les particules cLNP

Pour obtenir une transfection d'ARN interférents fonctionnels, les siARN nécessitent une rétention élevée sur le vecteur, jusqu'à l'internalisation dans la cellule, ainsi qu'un relargage dans le compartiment cytoplasmique. En effet, les siARN seuls accèdent difficilement aux compartiments intracellulaires en raison de leurs propriétés physicochimiques et requiert l'emploi d'un vecteur [6] (voir le chapitre I). Pour ces raisons, la rétention des siARN sur les particules doit être caractérisée. En outre, lors de certaines applications telles que le criblage haut-débit, des centaines de siARN différents peuvent être étudiés. Dans ce cadre, le protocole utilisé entre le premier et le dernier siARN complexé pouvant nécessiter des temps de préparation et/ou d'incubation pré-transfection longs, jusqu'à plusieurs heures, une rétention élevée peut être importante pour maintenir les mêmes conditions entre tous les échantillons testés.

2.1. Rétention dans le tampon Hepes 5 mM

Avant d'étudier ce paramètre dans le milieu de culture utilisé pour la transfection, nous avons analysé les risques de relargage dans un tampon de type Hepes 5 mM (Figure IV-6). L'expérience s'effectue sur le même principe que l'électrophorèse décrite précédemment (voir le protocole page 140), à la seule différence que les complexes « particule/siARN » sont incubés durant différentes périodes à température ambiante avant le dépôt sur le gel.

Après 30 minutes d'incubation, le complexe Lipofectamine RNAimax/siARN démontre un relargage de 30% de siARN. Par ailleurs, ce pourcentage de siARN sous forme libre augmente avec des temps d'incubation plus longs : respectivement 48% et 67% de siARN sont retrouvés sous forme libre après 3 heures et 6 heures d'incubation (Figure IV-6). Ainsi, cet agent commercial démontre une complexation, mais surtout une rétention du siARN très limitée au cours du temps, le rendant notamment inapproprié au protocole de criblage à haut-débit.

En revanche, l'utilisation de cLNPa et cLNPb pour complexer les siARN, dans les mêmes conditions, permet d'obtenir 100% de rétention des siARN sur les particules. En effet, aucun siARN sous forme libre n'est observé, même après 6 heures d'incubation.

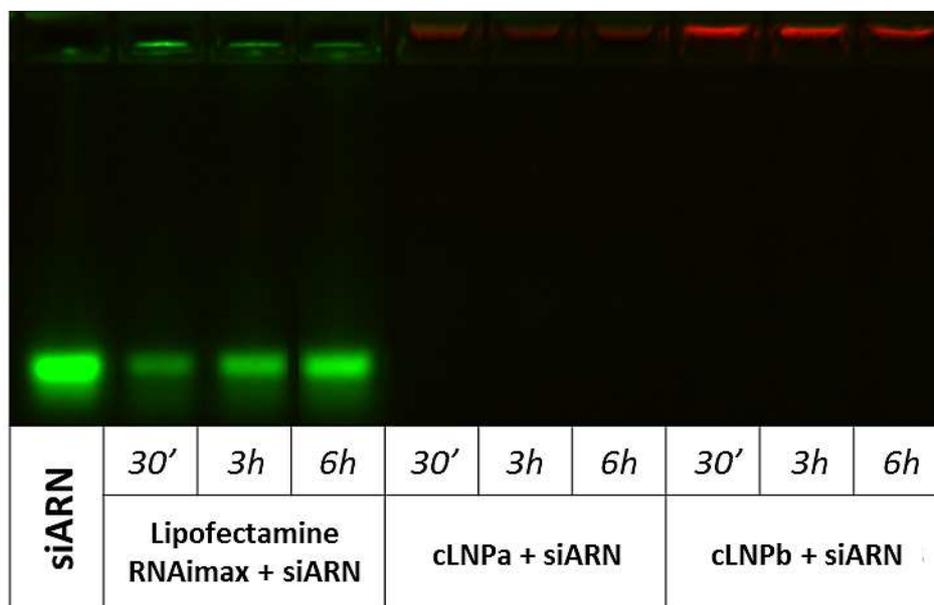


Figure IV-6. Rétention dans un tampon : la cinétique de relargage du siARN au cours du temps a été étudiée avec trois différents agents : la Lipofectamine RNAiMax, cLNPa et cLNPb. Tampon utilisé : Heps 5 mM (n=3).

Les particules de type cLNP représente ainsi des vecteurs très efficaces pour la complexation et la rétention des siARN à leur surface. L'intérêt de telles caractéristiques peut être multiple. D'abord, une faible rétention peut induire une variabilité entre expériences compliquant l'interprétation des résultats. Ensuite, la rétention très forte des siARN, offerte par l'utilisation des nanovecteurs cLNP, peut permettre une préparation des complexes indépendante du temps. Ainsi, lors d'une application telle que le criblage haut-débit, le maintien des conditions identiques entre les échantillons est possible avec les nanoparticules cLNP contrairement à la Lipofectamine RNAiMax.

2.2. Rétention dans le milieu de culture utilisé pour la transfection

Après avoir établi les caractéristiques de différents vecteurs pour la rétention de siARN durant la préparation des complexes, une étude similaire dans le milieu de culture utilisé pour la transfection est nécessaire. Ainsi, suivant les étapes classiques précédents une transfection (voir

protocole page 139), les complexes ont été préparés dans un milieu OptiMEM dépourvu de sérum, puis un milieu de culture RPMI supplémenté par 6,8% de sérum de veau fœtal a été ajouté. Les solutions obtenues ont alors été incubées pendant différents temps à 37°C, dans un environnement optimal pour la culture cellulaire, avant d'être déposées dans les puits d'un gel d'agarose pour une étape d'électrophorèse (Figure IV-7). Dans la littérature, il est décrit qu'une incubation dans un milieu de culture contenant des protéines sériques entraîne une déstabilisation des complexes et provoque un relargage des siARN, probablement en raison des charges négatives des protéines interagissant avec le complexe [7].

Comme précédemment, la complexation de siARN avec la Lipofectamine RNAimax ne permet pas une rétention de 100%. Par ailleurs, le relargage de siARN observé après les différents temps d'incubation dans le milieu de culture complet est plus important que celui décrit dans le tampon Hepes 5 mM. En effet, après 30 minutes d'incubation, 74% des siARN sont retrouvés sous forme libre. De plus, ce relargage important de siARN dans le milieu de culture complet augmente au cours du temps, avec respectivement 79% et 94% de siARN retrouvés sous forme libre après 3 heures et 6 heures.

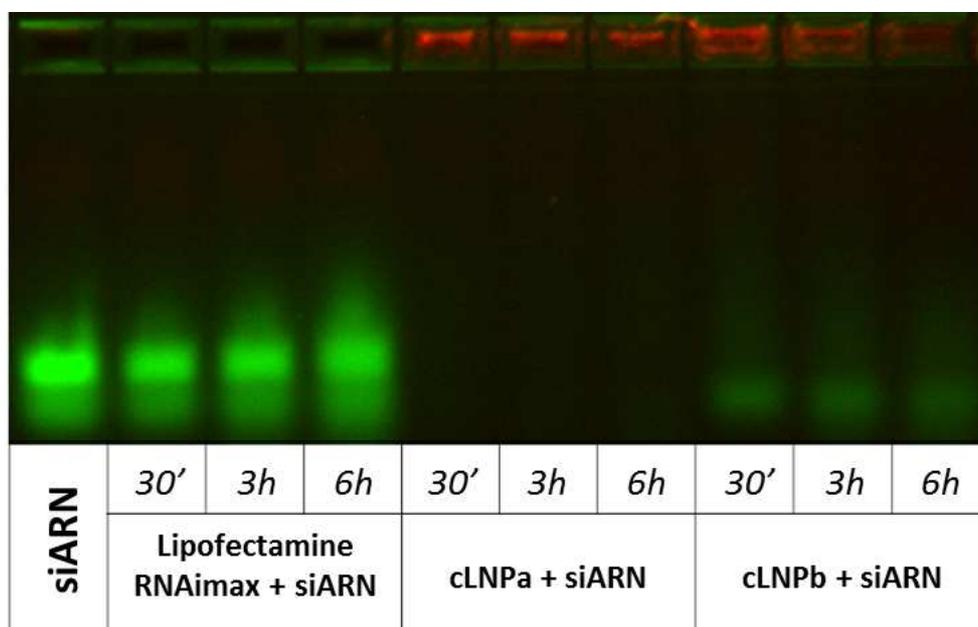


Figure IV-7. Rétention dans un milieu de culture : la cinétique de relargage du siARN au cours du temps a été étudiée avec trois différents agents : la Lipofectamine RNAimax, cLNPa et cLNPa. Milieu utilisé : RPMI 6,8% + OptiMEM (le milieu utilisé pour les expériences de transfection).

En revanche, la rétention des siARN permise par la complexation avec les particules cLNP est très forte. En effet, en utilisant cLNPa en tant que vecteur, aucun siARN n'est retrouvé sous forme libre, quel que soit le temps d'incubation dans le milieu de culture complet. Toutefois, cLNPb démontre une efficacité de rétention légèrement inférieure à cLNPa. Après 30 minutes d'incubation dans le milieu de culture, la complexation avec cLNPb autorise un relargage de siARN de 11%. Après 3 heures d'incubation, le pourcentage de siARN sous forme libre reste sensiblement similaire ($\approx 12\%$), mais augmente jusqu'à 17% après 6 heures d'incubation dans le milieu de culture complet.

En conclusion, la rétention élevée sur les particules de type cLNP permet d'assurer les conditions nécessaires à une délivrance de 100% des siARN complexés au niveau de la cellule. En outre, la stabilité de la complexation avec ces particules favorise théoriquement l'utilisation de concentrations en siARN plus faibles, limitant ainsi des possibilités d'effets secondaires (voir chapitre I). D'autre part, la forte rétention dans le milieu de culture complet utilisé pour la transfection peut permettre une préparation des complexes directement dans les conditions finales.

3. Stabilité colloïdale des particules dans les conditions de transfection

L'une des théories, concernant le faible taux de complexation, lors des tests effectués avec de faibles rapports molaires N/P, concerne la stabilité colloïdale des particules cLNP. En effet, la dilution importante subie par les formulations nanoparticulaires lors de la préparation des complexes peut affecter la stabilité de ces vecteurs lipidiques. La perte d'intégrité des vecteurs pourraient alors expliquer une complexation limitée. En outre, pour compléter l'étude concernant la rétention des siARN sur les nanoparticules, en particulier afin de répondre au relargage de 10 à 20% avec les cLNPb, la stabilité de ces particules dans les milieux de culture complétés doit être étudiée.

Une étude DLS, c'est-à-dire par le suivi de l'évolution du diamètre hydrodynamique (voir protocole page 136), nécessite une concentration particulaire minimale pour permettre les mesures. Ainsi, l'étude de l'impact de fortes dilutions sur la stabilité des particules peut se trouver limitée par l'utilisation de cette technique. De même, les mesures par DLS sont optimales lors de l'incubation des échantillons dans un tampon qui diffuse peu. En effet, les paramètres du milieu dans lequel se trouvent les particules influent sur les mesures, notamment à travers la diffusion et la viscosité du milieu (voir protocole page 136). Dès lors, une étude plus précise de la stabilité dans un milieu de

culture nécessite une autre méthodologie qui permette de s'émanciper de ces contraintes techniques. Dans ce cas, l'une des caractéristiques des LNP peut être utilisée : l'encapsulation de différents fluorophores permet d'étudier l'intégrité des nanoparticules en s'appuyant sur la technique de transfert d'énergie par résonance de type Förster (*Förster resonance energy transfer* ou FRET).

3.1. Principe de la technique de FRET

Le transfert d'énergie par résonance Förster est un phénomène permettant le passage d'énergie entre une molécule donneuse fluorescente à l'état excité et une molécule acceptrice dans son état fondamental. Pour que le FRET puisse avoir lieu, il est nécessaire que la différence d'énergie entre les derniers niveaux excités et le niveau fondamental de la molécule donneuse soit approximativement égale à la différence d'énergie existant entre le niveau fondamental et les niveaux excités de la molécule acceptrice. Ainsi, un recouvrement est nécessaire entre le spectre de fluorescence du donneur et le spectre d'absorbance de l'accepteur (Figure IV-8). Plus ce recouvrement est important, plus le transfert énergétique est efficace sur de longues distances. La distance pour laquelle l'efficacité est de 50% de transfert est appelée rayon de Förster ; cette distance dépend en partie des longueurs d'ondes impliquées dans le recouvrement et augmente avec la longueur d'onde. Le transfert FRET est possible dès l'apparition d'un recouvrement spectral [8-10].

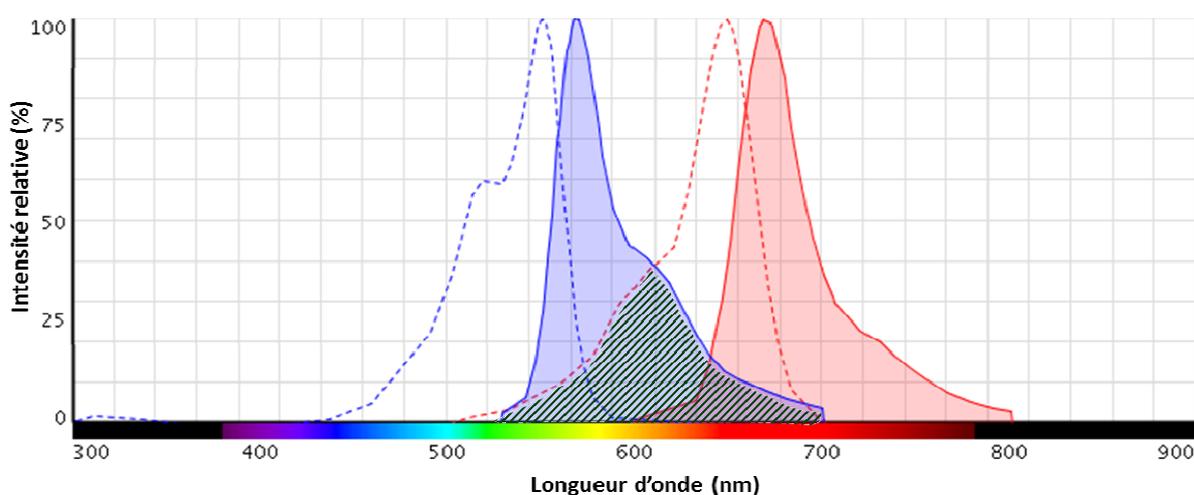


Figure IV-8. Spectre de fluorescence des fluorophores Dil et DiD : le spectre d'excitation du Dil (violet plein) recouvre en partie le spectre d'absorption du DiD (pointillés rouge) dans la zone hachurée.

Cette technique est largement utilisée pour la recherche de phénomènes biologiques tels que le changement de conformation de protéines, l'interaction des protéines et l'étude de l'activité enzymatique [11]. Le signal FRET dépendant de la distance entre deux fluorophores, cette méthodologie est également appropriée pour surveiller l'intégrité des nanoparticules à travers l'encapsulation de deux molécules pouvant être les acteurs d'un transfert d'énergie [9, 12]. Tant que la particule est intacte, le transfert est possible : l'énergie de l'état excité de la molécule fluorescente donneuse (dont les longueurs d'absorption et d'émission sont les plus courtes) est transférée vers la molécule, fluorescente ou non, acceptrice (dont l'absorbance recouvre l'émission du donneur) (Figure IV-9).

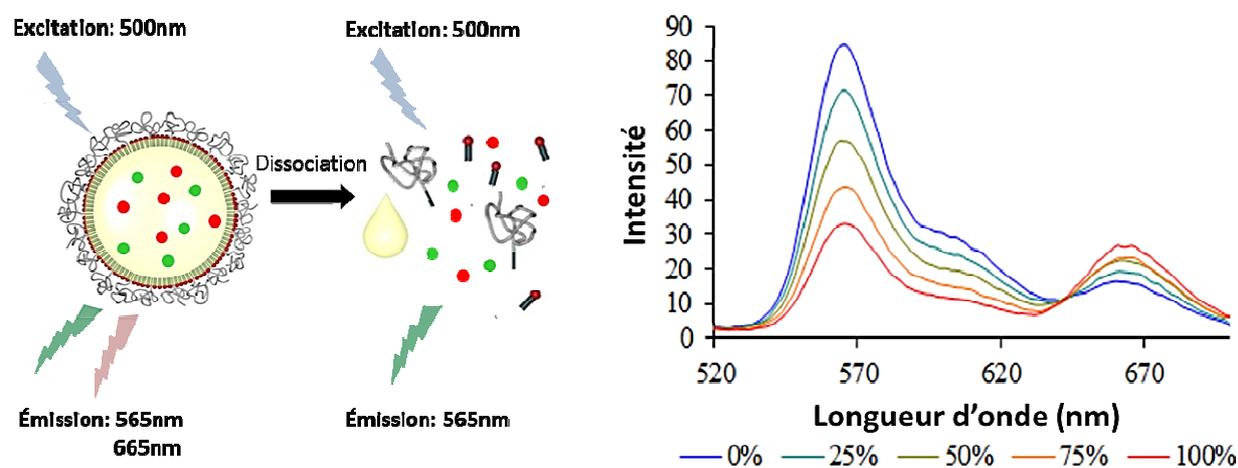


Figure IV-9. Principe du FRET : la perte d'intégrité de la particule diminue le pourcentage de FRET entre les fluorophores et restaure le niveau d'excitation maximal du donneur.

L'efficacité de FRET dépend ainsi de la distance qui sépare un donneur excité d'un accepteur (donc de l'intégrité de la particule), et de la concentration locale en accepteur. Contrairement à ce qui peut être imaginé de façon intuitive, l'efficacité sera indépendante de la concentration en donneur et de la taille de la nanoparticule : seule une partie des donneurs sont à l'état excité à chaque instant, une augmentation de leur concentration ne permet d'améliorer que le signal de fluorescence et non le pourcentage de FRET. De même, la taille de la particule n'influe pas car la concentration finale des nanoparticules est exactement la même que la concentration de la phase organique de départ. Ainsi, des formulations particulières plus petites présentent un plus grand nombre de nanogouttes, une plus grande répartition de fluorophore mais leur concentration finale est identique.

Ce transfert peut se produire entre n'importe quelle combinaison de molécules répondant aux critères précédemment cités. Toutefois, pour obtenir un FRET intra-particulaire, les deux fluorophores nécessitent une hydrophobie suffisamment élevée pour être encapsulés de façon stable. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi des fluorophores de type Dil, étant le donneur d'énergie, et le DiD en tant qu'accepteur (Figure IV-8).

Ainsi, trois formulations ont été réalisées comportant soit du DiD uniquement, du Dil uniquement, ou un mélange Dil/DiD, siège d'un phénomène de FRET (Figure IV-10). Pour établir un étalonnage, différents pourcentages de particules FRET ont été mélangés avec des particules non-FRET, permettant *a posteriori* de définir un pourcentage FRET en fonction du rapport des intensités d'émission de fluorescence DiD/Dil (voir protocole page 138).

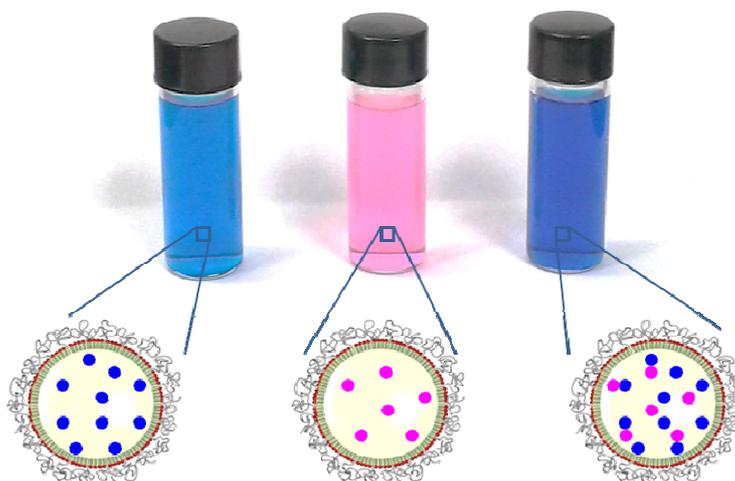


Figure IV-10. Formulation des particules pour des applications de type FRET : trois formulations ont été créées pour permettre l'étude de stabilité à partir du phénomène FRET.

3.2. Résistance des particules cLNP à la dilution

L'étude de complexation a mis en évidence un relargage partiel, voire total, des siARN associés aux particules cLNP suivant les rapports molaires N/P inférieurs à 4/1. Il est possible que la quantité de charge cationique soit insuffisante pour permettre une complexation suffisamment forte. Cependant, une autre théorie possible concerne la dilution trop élevée pouvant nuire à la stabilité de la particule qui, perdant son intégrité, entraîne le relargage des siARN.

Dans cette étude, les formulations particulières utilisées présentent des concentrations de l'ordre de 20 à 40 mg/mL (m/v), après les étapes de dialyse. Pour les applications de transfection, d'importantes dilutions ont lieu lors des étapes de complexation et de mise au contact avec les cellules. En effet, les concentrations finales en LNP peuvent être diminuées jusqu'à 10 µg/mL (m/v), soit une dilution approximativement au 2500°. Dès lors, des tests préliminaires ont été réalisés sur cLNPa avec diverses dilutions dans un tampon salin (Figure IV-11). La dilution a été effectuée au maximum jusqu'au 45000° pour ne pas descendre en dessous des limites de détection de fluorescence.

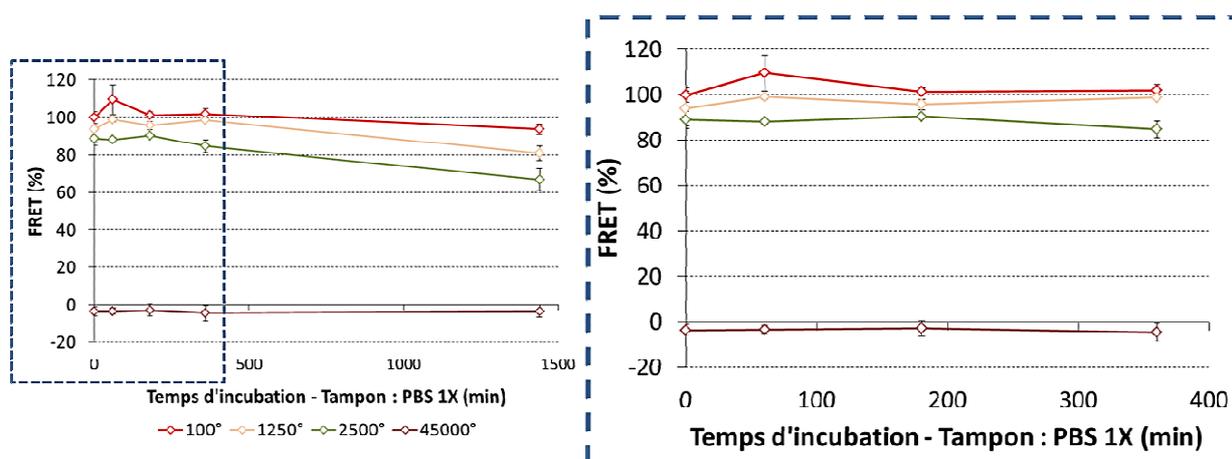


Figure IV-11. Stabilité à la dilution des particules cLNPa : le pourcentage de FRET a été établi par le calcul DiD/Dil après étalonnage pour chaque dilution dans un tampon PBS 1X. Quatre dilutions ont été testées sur 24 heures – au 100° (rouge), 1250° (orange), 2500° (vert) et 45000° (marron) ($n=3$).

L'augmentation de la dilution dans le tampon PBS 1X (du 100° au 45000°) diminue le pourcentage de FRET dès l'incubation des particules (T_0). En effet, alors que le pourcentage FRET est de 100% après dilution au 100° (rouge), il diminue progressivement à 93% après dilution au 1250° (orange), puis à 90% après dilution au 2500° (vert). Ce phénomène devient plus important pour les fortes dilutions, en atteste l'absence totale de FRET après dilution des particules au 45000°. Ainsi, la dilution semble affectée la stabilité des particules cationiques cLNPa. Néanmoins, pour des temps courts, jusqu'à 6 heures, le pourcentage FRET ne diminue pas prouvant un certain maintien de l'intégrité de ces particules. En revanche, pour des temps d'incubation plus longs (24 heures), une perte de stabilité colloïdale des particules cLNPa semble se produire avec une diminution du pourcentage FRET de respectivement 10%, 15% et 20% pour des dilutions au 100°, au 1250° ou au 2500°.

En conclusion, jusqu'à une dilution au 2500° et sur des périodes allant jusqu'à 6 heures, les particules gardent une remarquable stabilité colloïdale en dépit des conditions (FRET (T6h ; 2500°) = 84,6%). La même expérience a été réitérée afin de confirmer la forte stabilité colloïdale de cLNPa, mais également pour comparer ces résultats avec cLNPa (Figure IV-12). Ainsi, en maintenant la dilution au 2500° comme précédemment, il apparaît que ces deux formulations particulières sont extrêmement stables dans le tampon PBS 1X (FRET (T6h ; 2500°) > 90%).

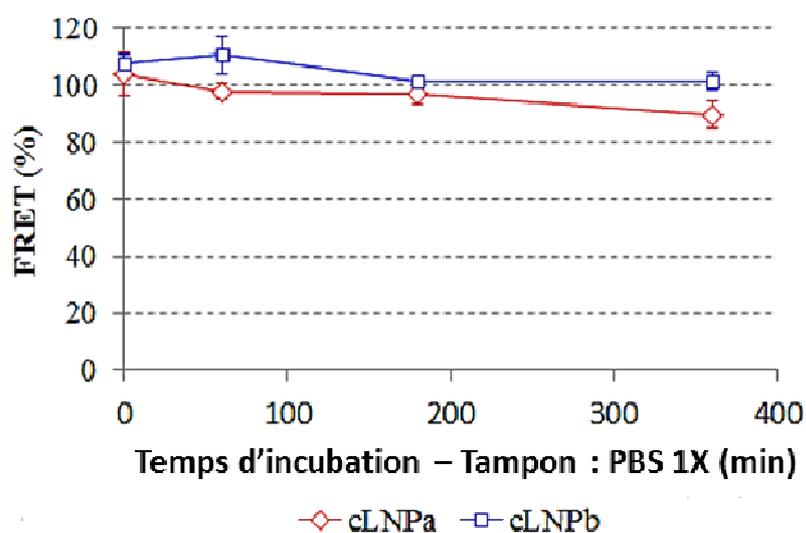


Figure IV-12. Stabilité à la dilution des particules cLNPa et cLNPa : les nanoparticules cationiques cLNPa (rouge) et cLNPa (bleu) maintiennent une très forte stabilité, au moins sur 6 heures, après dilution au 1/2500 (n=3).

Admettant les conditions décrites précédemment pour la transfection ($V_f = 500 \mu\text{L}$ / $[\text{siARN}]_f = 20 \text{ nM}$), ces dilutions peuvent être rapportées aux différents rapports molaires N/P (Tableau IV-2). Pour une même dilution, cLNPa et cLNPa ne permettent pas d'accéder aux mêmes rapports N/P. En effet, comme décrit dans le chapitre III, la quantité de DOTAP contenue dans la couronne est plus élevée dans les particules cLNPa que dans les particules cLNPa. Ainsi, il est nécessaire d'ajouter un volume de cLNPa plus élevé pour obtenir le même rapport N/P.

Pour cLNPa, au rapport molaire 2/1, aucune complexation n'était observée, matérialisée par un relargage totale de siARN (Figure IV-2). Pourtant, à ce rapport molaire, la dilution appliquée sur les nanoparticules cLNPa ($\approx 2500^\circ$) démontre une intégrité totale des particules (Figure IV-12). Ainsi, la faible efficacité de complexation observée aux rapports molaires inférieurs à 4/1 n'est probablement pas due à une perte d'intégrité des nanoparticules.

		Rapport molaire N/P				
		1/1	2/1	4/1	8/1	12/1
cLNPa	Dilution [DOTAP] ($\mu\text{g/mL}$)	13944° 0,53	6972° 1,06	3486° 2,11	1743° 4,23	1162° 6,34
cLNpb	Dilution [DOTAP] ($\mu\text{g/mL}$)	5566° 0,58	2783° 1,17	1392° 2,33	696° 4,67	464° 7,00

Tableau IV-2. Dilutions imposées aux particules cLNP au regard des rapports N/P : dans les gammes de travail appliquées, des niveaux de dilution très élevés sont nécessaires.

En conclusion, le défaut de complexation observé dans les faibles rapports N/P n'est pas dû à une instabilité des nanovecteurs N/P lors de la dilution. En outre, au rapport molaire N/P choisi, le rapport 12/1, la dilution imposée autorise une intégrité totale des particules, autorisant l'encapsulation de molécules dans le cadre de multi-délivrance, sans risque de relargage.

3.3. Stabilité des cLNP dans le milieu de culture utilisé pour la transfection

Une autre question soulevée lors de ce chapitre concerne la stabilité des particules dans les milieux de culture supplémentés par du sérum. En effet, la rétention des siARN à la surface des particules cLNPa a été autorisée jusqu'à 6 heures. Cependant, l'utilisation de cLNpb a entraîné un relargage d'environ 10 à 20% de siARN au cours de cette même période.

La littérature décrit une stabilité des nanoémulsions sensibles à la présence de protéines sériques [13]. En effet, les protéines sériques étant chargées négativement, elles peuvent interagir avec les nanoparticules cationiques dont le recouvrement PEG a été diminué. En plus du potentiel établissement d'une liaison électrostatique, les protéines sériques peuvent fusionner avec la couche lipidique de la couronne. Ainsi, l'incubation dans ce type de milieu peut nuire à la complexation avec les siARN, par compétition, mais également induire une déstabilisation des nanoémulsions. En ce sens, l'évolution du signal FRET, après incubation des particules dans un milieu complétement, peut permettre de mesurer la stabilité colloïdale de ces vecteurs dans de telles conditions (Figure IV-13).

Les particules cLNPa, diluées au 2500°, démontrent une légère sensibilité aux protéines sériques avec une diminution de 20% du signal FRET, après 6 heures d'incubation dans le milieu de culture utilisé pour la transfection (RPMI 6,8% SVF + OptiMEM). Ainsi, ces particules offrent une

résistance élevée avec un maintien de l'intégrité du signal FRET, et donc de leur stabilité colloïdale, supérieur à 80% (Figure IV-13). Dans les mêmes conditions, le signal FRET autorisé par les particules cLNPa est diminué de 60%, démontrant une sensibilité accrue aux protéines sériques (Figure IV-13). Cependant, durant la première heure d'incubation, les deux formulations maintiennent une intégrité totale. Dès lors, malgré une concentration en DOTAP plus importante pour les cLNPa, l'incubation dans un milieu complet semble affecter les particules cLNPa de façon plus importante, probablement en raison d'un diamètre hydrodynamique supérieur et d'un pourcentage molaire en PEG plus faible par rapport à la particule (voir Tableau III-5 page 185).

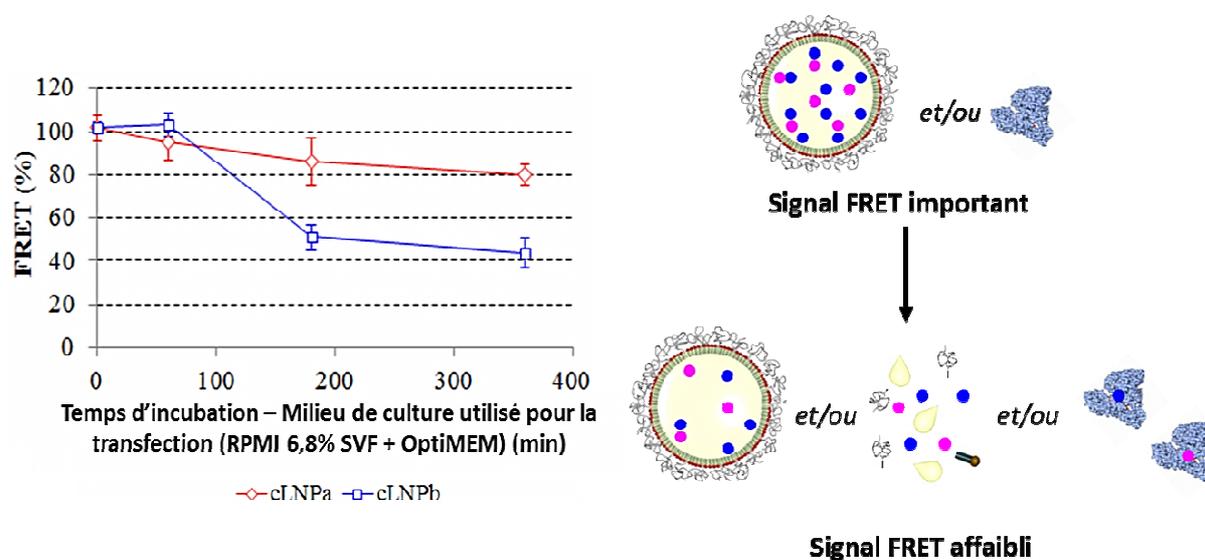


Figure IV-13. Stabilité dans un milieu de culture complet des particules cLNPa et cLNPa : après dilution au 2500°, les nanoparticules cationiques cLNPa (rouge) et cLNPa (bleu) démontrent une sensibilité à la présence de protéines sériques dans le milieu (RPMI 6,8% SVF + OptiMEM) (n=3).

Toutefois, cette expérience a été réalisée à une dilution au 2500° pour les deux particules. Or, au rapport molaire 12/1, cLNPa et cLNPa sont respectivement utilisées à une dilution au 1162° et 464°, soit une dilution moins élevée. Des tests complémentaires semblent ainsi nécessaires pour les dilutions utilisées dans les conditions de transfection afin de vérifier l'intégrité de cLNPa sur des temps d'incubation plus long (> 60 minutes). Néanmoins, cette sensibilité accrue des particules possédant un diamètre hydrodynamique plus élevé pourrait être une explication au relargage mineur des siARN observé en présence de protéines sériques.

4. Discussion

L'utilisation des nanoparticules lipidiques de type cLNP permet une complexation et une rétention efficace de siARN. Alors que cLNPa et cLNpb permettent une complexation de 100% des siARN à partir d'un rapport molaire de 4/1, les vecteurs polymériques PEI 25k nécessitent un rapport allant jusqu'à 20/1 [14], donc un apport de charge 20 fois plus important pour le même résultat. Dans les mêmes conditions, les liposomes développés par Kim *et al.* [15], contenant DOTAP, DOPE, Cholestérol et PEG à différents ratios, exigent un rapport molaire de 30/1 pour permettre une complexation totale des siARN. D'ailleurs, les lipoplexes utilisés en tant que contrôle de ce chapitre démontrent un relargage important de siARN, ceci dans les conditions d'utilisation proposées par le fournisseur. Ces résultats induisent qu'une grande concentration en vecteur est nécessaire pour une complexation totale des siARN, réduisant la limite des gammes de concentration forte en raison des risques de toxicité. Nous avons d'ailleurs décrit au cours du chapitre II les risques de toxicité induits par les vecteurs polymériques cationiques naturels et les lipoplexes instables. Enfin, l'étude de Yu *et al.*, s'appuyant sur des structures proches des cLNP développées dans cette étude, offre une complexation efficace à partir du rapport molaire N/P égal à 8/1 [2], soit un rapport deux fois plus élevé que les nanovecteurs cLNPa et cLNpb. Par ailleurs, les particules développées par cette équipe présentent des diamètres hydrodynamiques entre 150 et 180 nm. Or, nous avons émis l'hypothèse au cours de ce chapitre que des particules de taille plus importante sont plus sensibles à la présence de protéines sériques, réduisant alors la stabilité du complexe dans un milieu de culture complet. Dès lors, les particules cLNPa et cLNpb semblent présenter un avantage supérieur en termes de complexation et de rétention dans les milieux utilisés pour les expériences de transfection. En outre, une quantité de charge positive moins élevée nécessaire pour la complexation avec les siARN peut être avantageuse pour les critères de toxicité.

À notre connaissance, peu d'étude ont décrit l'impact de la dilution sur l'intégrité d'une nanoémulsion. Néanmoins, les résultats rapportés dans ce chapitre peuvent être discuté au regard de la littérature. La dilution des nanoparticules cLNP provoque une diminution de l'intégrité des particules. Ainsi, en maintenant le rapport molaire N/P, l'utilisation d'une concentration plus faible en siARN (< 20 nM) provoque une diminution de la concentration en cLNP et une dilution plus élevée de la solution nanoparticulaire. D'après les résultats concernant la stabilité des particules, la diminution de la concentration en nanoparticule est limitée par le risque d'instabilité induit sur la particule. Cependant, une étude avec une concentration de siARN à 20 nM peut s'avérer suffisante : pour le même type de particule, Kim *et al.*, ainsi que Yu *et al.*, effectuent des transfections *in vitro* à une concentration en siARN entre 20 nM et 75 nM [2, 4]. En outre, la concentration en cLNP peut

être maintenue malgré la diminution de la quantité de siARN, augmentant ainsi le rapport molaire N/P en conséquence.

5. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de prouver la faisabilité d'une complexation rapide, simple et post-formulation entre des séquences d'acides nucléiques et des nanoparticules lipidiques de type cLNP. De plus, des caractéristiques permettant une rétention élevée étaient désirées, tant pour autoriser un protocole adapté à des applications de type criblage haut-débit, que pour éviter un relargage des siARN avant l'internalisation du complexe.

La complexation des siARN par les nanoparticules développées dans cette étude, ainsi que la rétention à leur surface, ont été optimisées afin d'éviter le relargage de séquences d'acides nucléiques. En effet, pour un rapport molaire N/P de 12/1, l'ensemble des siARN sont retrouvés sur les particules, avec en moyenne une distribution d'environ 12 et 17 siARN par cLNPa et cLNPb. Une complexation suivant un protocole de mixage de 30 minutes post-formulation (voir protocole page 139) répond aux contraintes imposées pour cette étude. En outre, le maintien de l'intégrité des particules, dans les conditions autorisant la transfection de siARN à 20 nM, autorise l'encapsulation de molécules hydrophobes ou lipophiles dans le cadre de délivrance multiple. Ainsi, la molécule choisie pour intégrer le cœur (fluorophores, médicaments, ...) peut être intégrée pendant la formulation, tandis que le siARN est complexé sur la surface cationique après les étapes de purification.

Pour une étude complète de la délivrance de siARN, la rétention et le relargage nécessitent d'être caractérisés. Au cours de ce chapitre, nous n'avons développé que la première partie en rapportant une rétention forte. Néanmoins, des tests complémentaires sont possibles, notamment en étudiant le relargage des siARN suivant le pH imposé à la solution. En effet, selon la littérature, ce type de particule est caractérisé par une internalisation essentiellement par des voies d'endocytose. Il semble alors légitime d'étudier l'impact de la diminution du pH, lors de la différenciation de l'endosome en lysosome, sur les liaisons électrostatiques entre les siARN et les nanovecteurs cationiques, voire même sur l'intégrité de ces derniers [14, 16]. Après la formulation des nanoparticules lipidiques cationiques, ainsi que la caractérisation de la complexation et de la rétention avec les siARN, des expériences *in vitro* nécessitent d'être réalisées pour étudier l'interaction des complexes avec les cellules. En outre, les études de transfection de siARN fonctionnels sont rapportées lors du chapitre V.

Bibliographie

1. Kong WH, Park K, Lee M-Y, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials*. 2013 Jan;34(2):542–51.
2. Yu YH, Kim E, Park DE, Shim G, Lee S, Kim YB, Kim CW, Oh YK. Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012 Feb;80(2):268–73.
3. Del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Pedraz JL, Echevarría E, Rodríguez JM, Gascon AR. Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: in vivo protein expression after intravenous administration. *International journal of pharmaceutics*. 2010 Jan 29;385(1-2):157–62.
4. Kim HR, Kim IK, Bae KH, Lee SH, Lee Y, Park TG. articles Cationic Solid Lipid Nanoparticles Reconstituted from Low Density Lipoprotein Components for Delivery of siRNA. 2008;5(4):622–31.
5. Montana G, Bondi ML, Carrotta R, Picone P, Craparo EF, San Biagio PL, Giammona G, Di Carlo M. Employment of cationic solid-lipid nanoparticles as RNA carriers. *Bioconjugate chemistry*. 2007;18(2):302–8.
6. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annual review of medicine*. 2005 Jan;56:401–23.
7. Kapoor M, Burgess DJ. Physicochemical characterization of anionic lipid-based ternary siRNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. 2012;1818(7):1603-1612.
8. Jares-Erijman E a, Jovin TM. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Current opinion in chemical biology*. 2006 Oct;10(5):409–16.
9. Lainé A-L, Gravier J, Henry M, Sancey L, Béjaud J, Pancani E, Wiber M, Texier I, Coll JL, Benoit JP, Passirani C. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014 May 28;188C:1–8.

10. Chen H, Kim S, Li L, Wang S, Park K, Cheng J-xin. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. *PNAS*. 2008;105(18).
11. Lu J, Owen SC, Shoichet MS. Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. *Water*. 2011;;6002–8.
12. Jares-Erijman E a, Jovin TM. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Current opinion in chemical biology*. 2006 Oct;10(5):409–16.
13. Mignet N, Cadet M, Bessodes M, Scherman D. Incorporation of poly(ethylene glycol) lipid into lipoplexes : on-line incorporation assessment and pharmacokinetics advantages. *Liposome Technology, third edition, volume II*. 2006. Chapter 16.
14. Rui M, Tang H, Li Y, Wei X, Xu Y. Recombinant high density lipoprotein nanoparticles for target-specific delivery of siRNA. *Pharmaceutical research*. 2013 May;30(5):1203–14.
15. Kim H-K, Davaa E, Myung C-S, Park J-S. Enhanced siRNA delivery using cationic liposomes with new polyarginine-conjugated PEG-lipid. *International journal of pharmaceutics*. 2010 Jun 15;392(1-2):141–7.
16. Jin H, Lovell JF, Chen J, Lin Q, Ding L, Ng KK, Pandey RK, Manoharan M, Zhang Z, Zheng G. Mechanistic insights into LDL nanoparticle-mediated siRNA delivery. *Bioconjugate chemistry*. 2012 Jan 18;23(1):33–41.

CHAPITRE V

**Les nanoparticules cLNP pour la
transfection de siARN**

Chapitre V. Les nanoparticules cLNP pour la transfection de siARN	221
1. Transfection : internalisation des siARN	223
1.1. Internalisation des nanoparticules cLNP.....	223
1.2. Transfection des siARN	228
1.3. Les mécanismes d’internalisation des complexes cLNP/siARN.....	231
2. Transfection de siARN fonctionnels	237
2.1. Cinétique de l’inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN	238
2.2. Optimisation des concentrations en siARN et en cLNP	240
2.2.1. Optimisation des concentrations nanoparticulaires	241
2.2.2. Optimisation de la concentration en siARN	243
2.2.3. Importance de la quantité en nanoparticule pour la transfection.....	245
2.3. Comparaison des efficacités d’inhibition fonctionnelle par rapport aux agents de transfection commerciaux.....	247
2.4. Les avantages apportés par les nanoparticules cLNP	252
2.4.1. Étude de la cytotoxicité induite lors de la transfection	252
2.4.1.1. Cytotoxicité des nanoparticules cLNP seules	252
2.4.1.2. Cytotoxicité des complexes cLNPa/siARN	257
2.4.2. Suivi de la transfection par fluorescence	259
3. Vers une utilisation générique des nanoparticules cLNP	263
3.1. Inhibition fonctionnelle sur un autre modèle cellulaire	263
3.2. Transfection de différentes séquences d’acides nucléiques	264
3.3. Vers des applications de type criblage à haut-débit	267
4. Discussion	269
5. Conclusion	273

Les nanoparticules lipidiques cationiques développées au cours de ce travail de thèse ont démontré une efficacité de complexation et de rétention élevée avec de courtes séquences d'acides nucléiques telles que des siARN. Afin de favoriser l'induction du mécanisme d'ARNi de façon exogène, les siARN complexés aux nanoparticules cLNP nécessitent de traverser la membrane plasmique et d'accéder au compartiment cytoplasmique (voir chapitre I). Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de démontrer l'internalisation des particules cLNP complexées aux siARN, ainsi que l'efficacité d'inhibition fonctionnelle permise par le relargage de ces courts fragments d'ARN interférent au niveau du cytoplasme. En outre, des études détaillant les avantages de ces vecteurs sont abordées, notamment en termes de suivi de distribution et d'innocuité. Un positionnement de ces vecteurs par rapport à l'état de l'art est également proposé par une comparaison des différentes caractéristiques avec des agents commerciaux ou issus de la littérature.

1. Transfection : internalisation des siARN

1.1. Internalisation des nanoparticules cLNP

Dans le chapitre précédent, nous avons mentionné que la complexation avec les siARN n'entraîne aucune évolution du diamètre hydrodynamique ou du potentiel zêta des vecteurs cLNP. Ainsi, l'internalisation des nanoparticules cLNP a été étudiée afin de vérifier leur capacité à traverser la membrane plasmique et, par conséquent, à transporter de courtes séquences d'acides nucléiques telles que les siARN.

Il est tout à fait vraisemblable que les charges positives des cLNP favorisent l'interaction de ces particules avec les cellules dont la membrane plasmique est chargée négativement. Les caractéristiques du cœur de ces nanoparticules permettent une encapsulation de fluorophores lipophiles, comme pour les expériences de stabilité par principe de FRET effectuées précédemment. Ces propriétés avantageuses permettent alors le suivi de la distribution des nanoparticules (Figure V-1).

Ainsi, une détermination qualitative de l'internalisation des cLNP est visualisée par l'observation microscopique de la fluorescence du DiD contenu dans les particules : après 6 heures d'incubation à une concentration permettant un rapport N/P de 12/1 (pour [siARN] = 20 nM), les nanoparticules cLNPa (rouge) sont observées dans les cellules PC3 dont le noyau est marqué par du DAPI, un marqueur nucléaire fluorescent (bleu) se liant fortement aux bases adénines et thymines de l'ADN (Figure V-1). Le signal de fluorescence DiD observé est principalement ponctué dans les zones périnucléaires des cellules traitées. Ainsi, la fluorescence DiD contenu dans les particules (rouge)

semble confinée à l'intérieur de vésicules au niveau du compartiment cytoplasmique des cellules PC3 (Figure V-1). Ces vésicules localisées dans les zones périnucléaires sont vraisemblablement des endosomes, attestant de l'entrée des particules dans les cellules. Certaines cellules présentent également une fluorescence rouge périnucléaire diffuse, révélant probablement un échappement des vésicules précédemment décrite, et une libération dans le cytoplasme des cellules (Figure V-1). De plus, la distribution des particules, visualisée en rouge, apparaît homogène entre les différentes cellules.

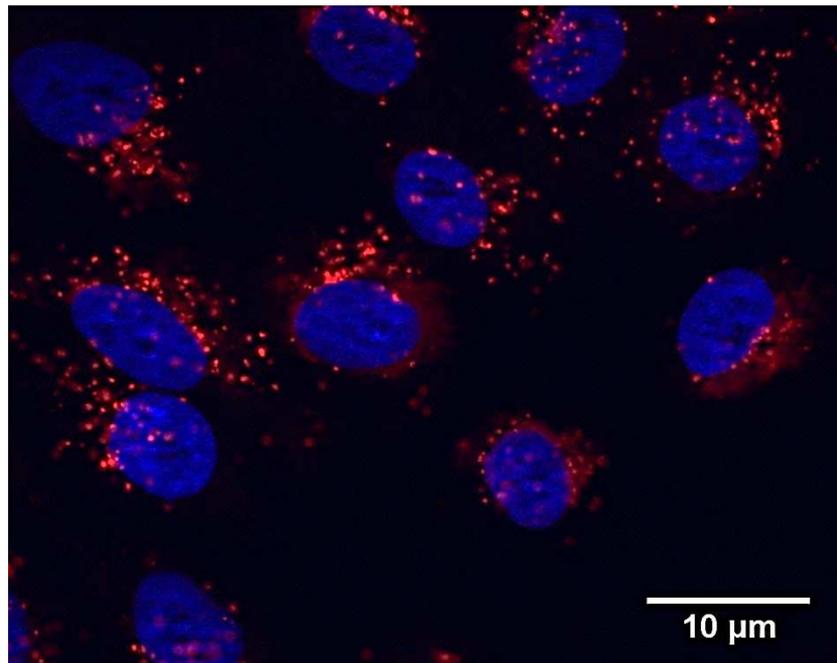


Figure V-1. Imagerie de l'internalisation des cLNPa dans les cellules PC3 : les cellules PC3 sont incubées 6 heures avec des nanoparticules cLNPa-DiD ([DOTAP] = 6,12 µg/mL). Les noyaux cellulaires sont marqués en DAPI. Analyse par microscope Zeiss doté d'un module Apotome.

Une étude complémentaire est effectuée à travers l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale (Figure V-2). L'imagerie hyperspectrale est une technique permettant l'analyse de données sur des dimensions spatiales et spectrales [1] (voir annexe 4). Par ce procédé, une image est capturée tous les deux nanomètres pour les plages spectrales visible et proche infrarouge (400 à 1000 nm). Les 300 images monochromatiques résultantes sont alors compilées pour produire le spectre de chaque pixel. Ainsi, après avoir défini les spectres des cellules n'ayant pas subi de traitement, l'analyse des variations spectrales permet de mesurer l'impact de l'incubation de différents composés [2, 3]. Dans le cadre de notre étude, la présence des nanoparticules incubées avec les vecteurs peut être

déterminée par une identité spectrale différente de celle des cellules non-incubées [2, 3]. Toutefois, la composition des nanoparticules étant proche des composants naturels des cellules, la discrimination des vecteurs apparaît difficile : en effet, la dissociation de deux spectres ayant une même origine est complexe. En outre, cette difficulté peut être accrue par le faible diamètre hydrodynamique des particules, c'est pourquoi nous rapportons dans ce chapitre uniquement les résultats obtenus sur cLNPb dont la taille est plus importante. Afin d'analyser les données obtenues, nous nous sommes appuyés sur l'expertise de Cytoviva®. Les nanovecteurs cLNPb ont été incubés 30 minutes et 2 heures en présence des cellules PC3, puis les données spectrales de chaque pixel ont été recueillies.

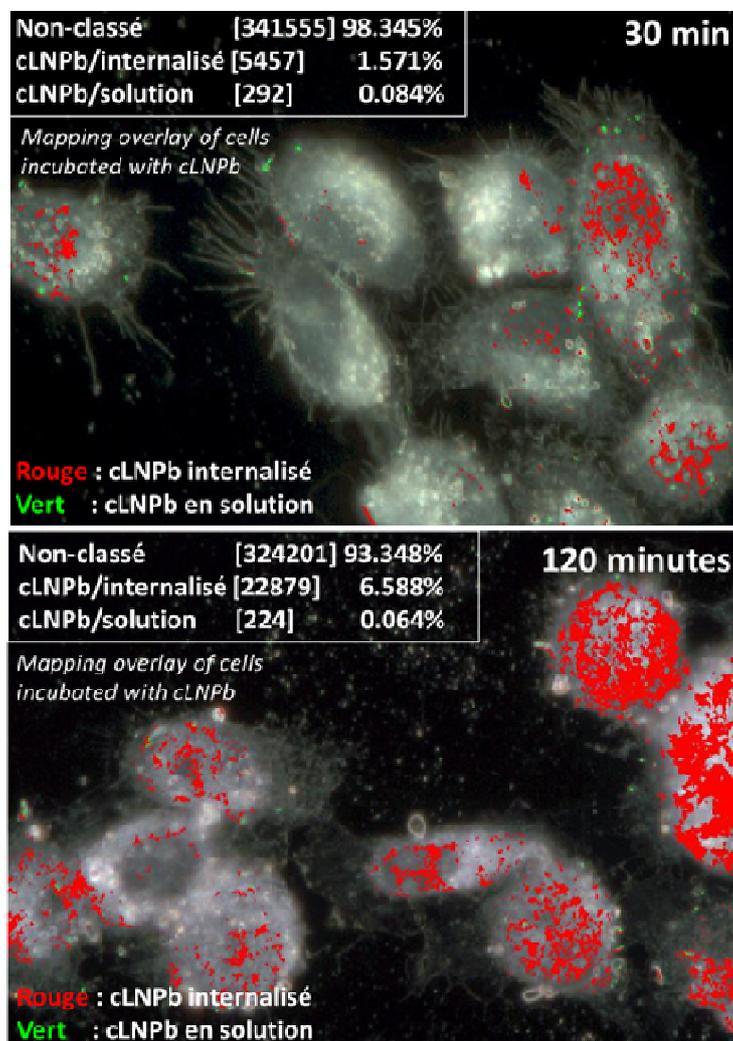


Figure V-2. Étude de l'internalisation de cLNPb par imagerie hyperspectrale : les cellules PC3 ont été incubées pendant 30 minutes ou 2 heures en présence de cLNPb. Les zones représentées en rouge indiquent la présence de nanoparticules à l'intérieur de la cellule tandis que les zones vertes montrent les particules en solution, non internalisées. Analyse par imagerie hyperspectrale.

L'analyse des images démontrent une internalisation des particules visualisée après seulement 30 minutes d'incubation. En effet, le nombre de pixel associé à l'identité spectral des nanoparticules en solution (vert) est 18,7 fois plus faible que le nombre de pixel associé aux particules internalisées dans les cellules (rouge). Après 2 heures d'incubation, cette différence devient plus importante avec 102,9 fois plus de pixels associés aux spectres de nanoparticules internalisées (Figure V-2). La quantité de pixels associés aux nanoparticules dans les cellules 4,2 fois plus élevée permet de rapporter une augmentation importante de l'internalisation des novecteurs cLNPa au cours du temps. Les photographies analysées semblent cependant démontrer une hétérogénéité de la distribution des nanoparticules entre les cellules PC3. Alors que certaines cellules en sont dépourvues, d'autres comptent un nombre élevé de pixel associé aux particules cLNPa. Néanmoins, les observations microscopiques précédentes ont démontré une certaine homogénéité de la distribution des nanoparticules. Au regard du faible nombre de cellules analysées et des limites de cette technique, il apparaît difficile de valider une interprétation concernant l'évaluation de la distribution des particules lipidiques.

Afin de quantifier cette internalisation sur un nombre important de cellules (10^4), nous sommes appuyés sur des expériences de cytométrie en flux (voir protocole page 144). Ainsi, les cellules PC3 ont été incubées avec une concentration en nanoparticules cLNPa et cLNPa permettant un rapport molaire N/P égal à 12/1 (pour [siARN] = 20 nM), et contenant une même concentration en fluorophore DiD ([DiD] = 0,3 μ M), durant différentes périodes de 30 minutes à 6 heures (voir protocole page 144). En outre, l'interaction des nanoparticules lipidiques cationiques cLNP avec les cellules a été comparée à celle des nanoparticules lipidiques neutres LNP de diamètre hydrodynamique équivalent, respectivement 50 nm pour cLNPa et 80 nm pour cLNPa.

Les deux types de nanoparticules cationiques, cLNPa et cLNPa, présentent un profil d'interaction avec les cellules PC3 similaire : l'intensité de fluorescence DiD augmente rapidement jusqu'à 3 heures d'incubation puis présente un plateau démontrant une interaction maximale jusqu'à 6 heures (Figure V-3). Au contraire, l'intensité de fluorescence associée aux particules neutres LNP ne varie que légèrement jusqu'à 3 heures (> 95% plus faible par rapport à cLNP), puis augmente fortement jusqu'à 6 heures d'incubation. Néanmoins, après 6 heures d'incubation, l'intensité apportée par les nanoparticules neutres LNP F50 et F80 contenant du DiD reste respectivement 1,3 fois et 1,7 fois inférieure à l'intensité de fluorescence après incubation des particules cLNPa et cLNPa (Figure V-3). Ainsi, les nanoparticules cationiques démontrent une interaction plus élevée avec les cellules pour les temps courts et les temps longs d'incubation.

Malgré un profil similaire, l'interaction des nanoparticules cLNPa avec les cellules PC3 apparaît plus rapide qu'avec les particules cLNPb de taille supérieure : ainsi, l'intensité de fluorescence après 1h30 d'incubation avec cLNPb est 25% plus faible qu'après incubation de cLNPa dans les mêmes conditions. Cet écart se réduit néanmoins au cours du temps, de par le plateau atteint par les particules cLNPa, avec une différence d'intensité de fluorescence de 16% après 6 heures d'incubation (Figure V-3).

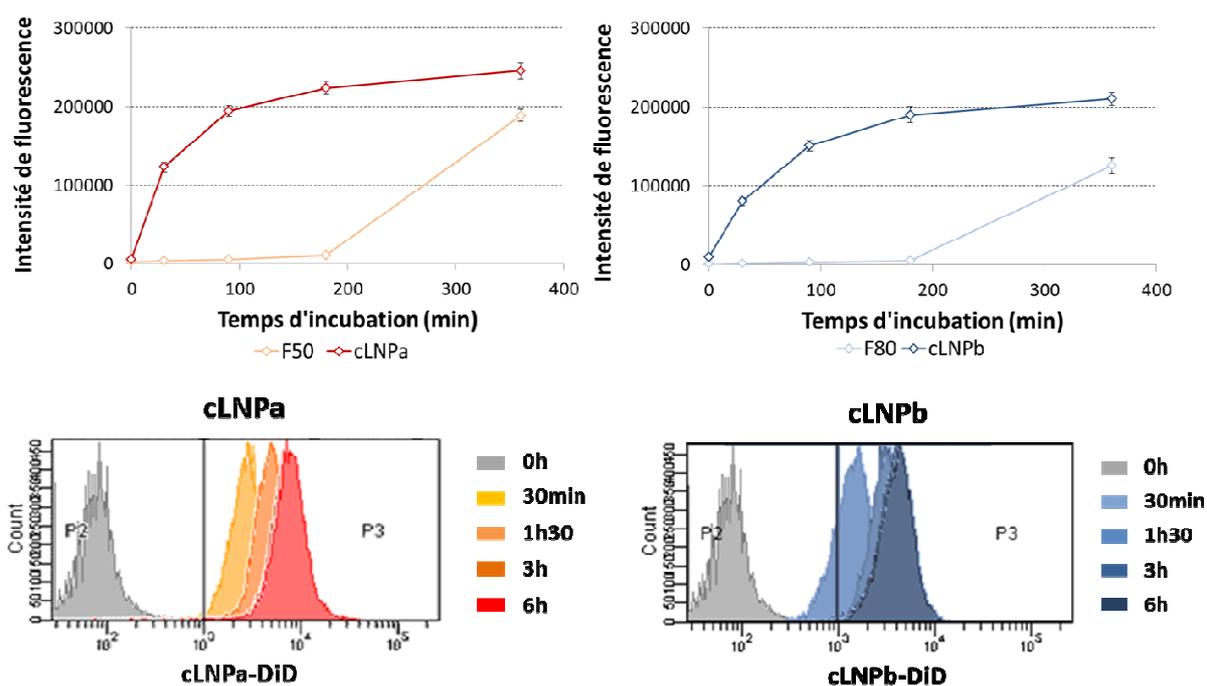


Figure V-3. Internalisation des cLNP dans les cellules PC3 : les cellules PC3 sont incubées pendant plusieurs heures avec des nanoparticules cLNPa, cLNPb, F50 et F80. L'interaction de cLNPa (rouge foncé) avec les cellules est comparée avec F50 (orange clair) (en haut à gauche). L'interaction de cLNPb (bleu foncé) avec les cellules est comparée avec F80 (bleu clair) (en haut à droite). L'évolution de l'intensité de fluorescence émise par le DiD contenu dans les cellules PC3 après incubation avec cLNPa (en bas à gauche) et cLNPb (en bas à droite) est rapportée ([DOTAP] = 6,13 µg/mL – [DiD] = 0,3 µmol/L) (n=3). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ cellules (FACS BD LSRII).

En outre, après 30 minutes d'incubation en présence de cLNPa, la majorité des cellules présente une intensité de fluorescence positive pour le DiD ($\approx 97\%$). Ainsi, les particules cLNPa démontrent une interaction avec l'ensemble des 10⁴ cellules analysées. L'analyse de l'intensité de fluorescence émise par le DiD contenu dans les cellules PC3, après incubation avec les particules

cLNPa, révèle une distribution homogène caractérisée par un pic de distribution étroit (Figure V-3). L'interaction des cLNPb avec les cellules PC3 est visualisée plus lente sur des temps d'incubation court : seulement 78% des cellules PC3 sont positives pour le DiD après 30 minutes d'incubation. Néanmoins, après 1h30 d'incubation, la majorité des 10^4 évènements analysés est positive attestant une forte interaction avec cLNPb (> 95%). Ainsi, en plus de la charge, la taille des particules semble également être un critère important étant donné l'interaction plus rapide avec les cellules de cLNPa par rapport à cLNPb.

Au regard des observations microscopiques, il est tout à fait vraisemblable que cette capture soit associée à une internalisation par les cellules (Figures V-1 et V-2). Par ailleurs, l'analyse des données tend à prouver une distribution homogène entre les cellules traitées : la cytométrie en flux étant beaucoup plus sensible que l'analyse par imagerie hyperspectrale, déjà limitée par la composition lipidique des nanovecteurs cLNP, la distribution homogène est attestée par un pic de distribution de la fluorescence DiD étroit (Figure V-3). Au regard des caractéristiques de complexation avec les siARN et de ces études sur la capture des cLNP par les cellules, l'internalisation des siARN dans les cellules apparaît probable. Néanmoins, des expériences complémentaires ont été effectuées afin de vérifier ce paramètre, notamment par l'étude de l'internalisation de siARN marqués par une molécule fluorescente.

1.2. Transfection des siARN

L'induction de l'ARNi, induit par la transfection de siARN, nécessite le passage de la membrane plasmique des cellules et le relargage de ces séquences d'acides nucléiques dans le cytoplasme. Afin de prouver la première étape, avec l'internalisation des siARN, les cellules PC3 ont été incubées durant différentes périodes en présence de complexes cLNP/siARN à un rapport molaire N/P égal à 12/1 (voir protocole page 144). Tandis que les cLNP utilisées encapsulent un fluorophore lipophile, les siARN sont marqués par l'Alexa488 afin de permettre une analyse en cytométrie en flux en suivant les deux paramètres de fluorescence (Figure V-4). En outre, une incubation des cellules traitées avec du bleu trypan autorise une inhibition de la majorité de la fluorescence extracellulaire, pour une analyse spécifique de l'internalisation des siARN. En effet, ce colorant a la particularité de ne pas être internalisé par les cellules vivantes, l'intégrité de la membrane constituant un obstacle pour ce type de molécule (4, 5). Ainsi, avec un spectre d'absorption recouvrant le spectre d'émission de fluorescence de l'Alexa488, une inhibition de la fluorescence des siARN marqués est possible, par

un phénomène de FRET, sur une distance allant jusqu'à 4,2 nm autorisant une efficacité du transfert d'énergie d'au moins 50% (6). Le bleu trypan étant limité au milieu extracellulaire, l'inhibition par un phénomène de FRET ne peut être exercée dans la cellule, assurant une étude de l'internalisation des molécules couplés à l'Alexa 488 (7, 8).

Alors que l'incubation de siARN-Alexa488 non-complexés n'induit aucune évolution de l'intensité de fluorescence dans les cellules, le signal d'intensité de fluorescence des siARN dans les cellules PC3 augmente considérablement au cours du temps (vert) (Figure V-4), démontrant la nécessité d'un vecteur pour le transport de ces séquences d'acides nucléiques. Après 30 minutes d'incubation en présence de complexes cLNPa-DiD/siARN-Alexa488, la plupart des cellules sont positives pour la fluorescence émise par le siARN marqué (98,1%) démontrant une internalisation massive et rapide des siARN. L'internalisation des siARN-Alexa488 apparaît moins efficace après complexation avec les nanoparticules cLNPb, avec seulement 45,1% des cellules PC3 positives pour la fluorescence émise par la siARN-Alexa488 dans les mêmes conditions. Néanmoins, après 1h30 d'incubation, plus de 96% des cellules sont positives pour une internalisation de ces séquences d'acides nucléiques (Figure V-4).

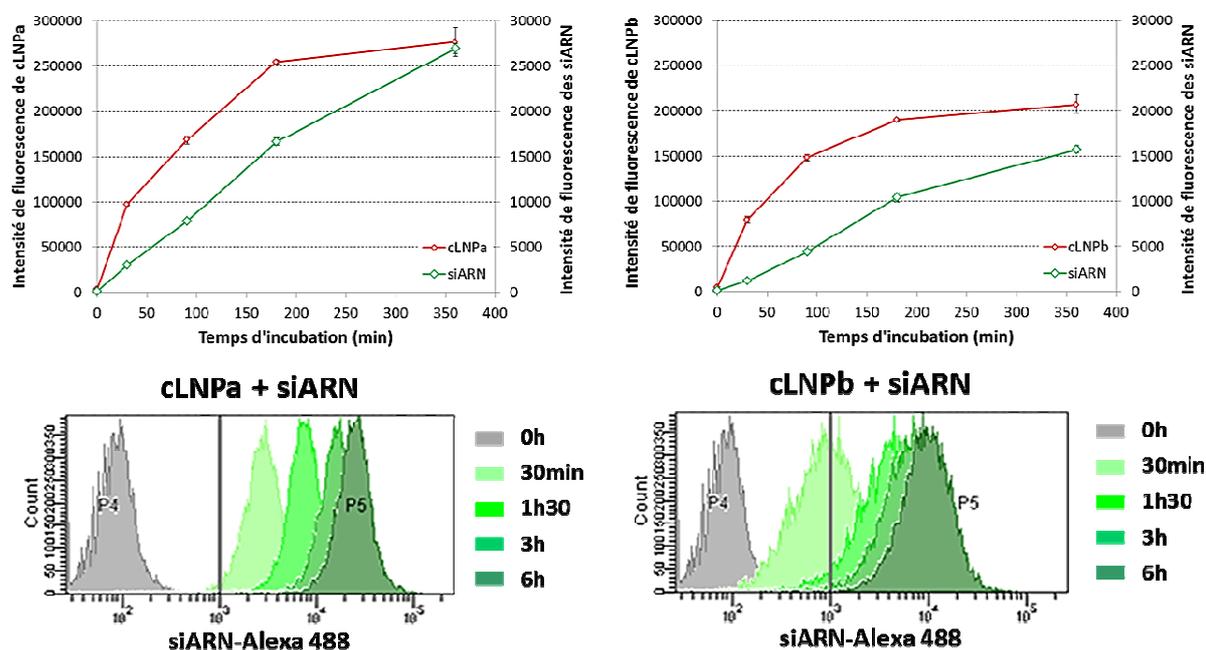


Figure V-4. Internalisation des siARN dans les cellules : les cellules PC3 sont incubées pendant différentes heures avec les complexes cLNP/siARN-Alexa488. Les siARN-Alexa488 sont représentés en vert tandis que l'internalisation des particules est rappelée en rouge. L'incubation avec 1% de bleu trypan avant l'analyse autorise l'inhibition de la fluorescence extracellulaire des siARN-Alexa488 ($[siARN-Alexa488] = 20 \text{ nM} - N/P = 12/1$) ($n=6$). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII).

Après 6 heures d'incubation, l'internalisation des siARN vraisemblablement associées aux nanoparticules cLNPb apparaît 1,6 fois inférieure à l'internalisation avec les particules cLNPa, pour la même concentration en DOTAP (Figure V-4). Cette différence peut être expliquée par une interaction plus faible des cLNPb avec les cellules PC3, par rapport à celle observée avec les nanoparticules cLNPa (Tableau V-1). En effet, admettant un rapport molaire N/P de 12/1 et une internalisation totale des siARN complexés avec cLNPa, il apparaît que la concentration en DiD théoriquement internalisée dans les cellules avec cLNPb doit être environ 1,57 fois plus faible par rapport à cLNPa (Tableau V-1). Or, nous avons effectivement observé précédemment que le signal de fluorescence DiD lors de l'incubation des particules est plus faible avec cLNPb par rapport à cLNPa, dans les mêmes conditions (Figures V-3 et V-4).

	cLNPa	cLNPb
Quantité cLNP <i>(pour N/P = 12/1 - [siARN] = 20 nM)</i>	$4,9 \cdot 10^{11}$	$3,6 \cdot 10^{11}$
DiD/particule <i>(pour [DiD] = 0.3 μM)</i>	$6,12 \cdot 10^{-13}$ μ mole	$8,3 \cdot 10^{-13}$ μ mole
Quantité siARN totale	$6 \cdot 10^{12}$ <i>(12 siARN/cLNPa)</i>	$6 \cdot 10^{12}$ <i>(17 siARN/cLNPb)</i>
Quantité siARN internalisés <i>(admettant 100% avec cLNPa)</i>	$6 \cdot 10^{12}$	$3,75 \cdot 10^{12}$ <i>($6 \cdot 10^{12} / 1,6$)</i>
Quantité cLNP internalisées <i>(admettant 100% avec cLNPa)</i>	$4,9 \cdot 10^{11}$	$2,24 \cdot 10^{11}$
Concentration DiD internalisé <i>(admettant 100% avec cLNPa)</i>	0,3 μ M	0,19 μ M

Tableau V-1. Calcul des quantités de produit internalisé : Les calculs ont été effectués à partir des données théoriques définies dans le chapitre IV, en admettant une internalisation 1,6 fois plus faible de siARN.

Comme précédemment, la distribution des siARN entre les différentes cellules semble homogène au regard de la distribution du signal d'intensité de fluorescence de l'Alexa488 entre les 10^4 cellules analysées (Figure V-4). Néanmoins, les pics représentant la distribution des siARN dans les cellules paraissent plus élargis après transfection avec les nanoparticules cLNPb par rapport à cLNPa (Figure V-4). Pour expliquer cette différence, notre hypothèse concerne la quantité de siARN internalisée dans les cellules PC3. En effet, d'après les calculs effectués dans le tableau V-1, $6 \cdot 10^{12}$

siARN sont internalisés après 6 heures de transfection avec cLNPa alors que cette quantité n'est que de $3,75 \cdot 10^{12}$ avec cLNPb. En outre, la quantité de cLNPa théoriquement internalisée est également 2,2 fois plus élevée que pour cLNPb. Ainsi, dans les mêmes conditions, un plus grand nombre de particule et de siARN provoque une répartition plus homogène entre les différentes cellules, expliquant alors les pics plus étroits avec les siARN transportés par les cLNPa.

Dans leur étude, Kong *et al.* quantifient l'internalisation des siARN transfectés avec un vecteur de type NLC et un agent commercial, la Lipofectamine 2000 [9]. Après optimisation de la quantité de nanoparticules nécessaire par augmentation du rapport N/P, cette équipe mesure une internalisation des siARN dans 87,7% des cellules HepG2 traitées, après 2 heures d'incubation avec le complexe NLC/siARN développé dans leur laboratoire [9]. En comparaison, ils estiment une internalisation des siARN dans seulement 47,8% des cellules traitées avec le complexe Lipofectamine 2000/siARN [9]. Dans notre étude, après 1h30 d'incubation en présence des complexes cLNP/siARN, plus de 95% des cellules PC3 traitées démontrent une internalisation des séquences d'acides nucléiques (Figure V-4). Mieux encore, les cLNPa autorisent l'internalisation des siARN dans 98% des cellules PC3 traitées après seulement 30 minutes d'incubation (Figure V-4). Au regard de ces éléments, il apparaît que les cLNP que nous avons développé dans ce travail de thèse permettent une transfection très efficace des siARN dans les cellules PC3. Toutefois, pour provoquer le déclenchement de l'ARNi, les séquences d'ARN interférents nécessitent d'être libérées au niveau du compartiment cytoplasmique. Dès lors, la question se pose concernant les mécanismes d'internalisation : une entrée dans la cellule par un mécanisme d'endocytose peut exiger une stratégie adéquate pour favoriser l'échappement endosomal et l'induction du mécanisme d'ARNi. La compréhension de l'interaction des complexes cLNP/siARN avec les cellules est alors nécessaire.

1.3. Les mécanismes d'internalisation des complexes cLNP/siARN

La délivrance de molécules par des vecteurs de type LNP peut être soumise à des limitations au cours de l'internalisation (voir chapitre I). En effet, le passage de la membrane plasmique par des mécanismes d'endocytose peut limiter la délivrance intra-cytoplasmique de siARN, notamment en raison des difficultés d'échappement des vésicules d'endosome avant la dégradation lysosomale [10]. Afin de connaître les potentiels limites de l'utilisation des cLNP comme vecteur de séquences d'acides nucléiques, une étude des voies d'internalisation est nécessaire

(Figures V-5 et V-6). Ces études lourdes se sont focalisées sur les nanoparticules cLNPa démontrant des caractéristiques d'internalisation plus fortes.

Nous avons réalisé une étude des voies d'internalisation des complexes cLNP/siARN après 2 heures d'incubation en utilisant des inhibiteurs reconnus tels que (voir protocole page 144) :

- Nocodazole : cet agent biologique antimitotique entraîne la dépolymérisation des microtubules en se fixant sur une arginine de la β -tubuline. Les microtubules sont importants *in vitro* pour maintenir la distribution périnucléaire du compartiment tardif des vésicules d'endocytose. Ils facilitent également la fusion des vésicules dérivées des endosomes précoces vers les endosomes tardifs [11, 12] ;
- Cytochalasine A : ces métabolites fongiques ont la capacité de se lier aux filaments d'actine et de bloquer leur polymérisation et leur allongement. Les filaments d'actine sont importants lors de l'invagination de la membrane plasmique se déroulant pendant les différents mécanismes d'endocytose [13] ;
- Génistéine : ce polyphénol est un inhibiteur des protéines kinases spécifiques de la tyrosine associée aux récepteurs. Il entraîne une perturbation locale du réseau d'actine au site d'endocytose. De plus, il inhibe le recrutement de la dynamine II indispensable à l'absorption médiée par les cavéolines [14, 15] ;
- Chlorpromazine : cette molécule permet l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante par une translocation réversible de la clathrine vers les vésicules intracellulaires [16].

La cinétique rapide de capture des cLNP et des siARN sur les cellules PC3 permet d'utiliser ces inhibiteurs dont une incubation trop longue sur les cellules induit une mortalité élevée.

Dans un premier temps, l'incubation des nanoparticules cLNPa-DiD a été analysée suite à ces divers traitements (Figure V-5). Après une incubation de deux heures de ces particules à 4°C, l'intensité de fluorescence DiD mesurée dans les cellules est diminuée de 61%, indiquant bien que les mécanismes d'internalisation des nanoparticules sont des phénomènes actifs nécessitant de l'énergie. En effet, lors d'incubations à faible température, les mécanismes cellulaires sont fortement ralentis conduisant à une très forte inhibition de l'internalisation des particules cLNPa-DiD, quelles que soient les voies d'entrée utilisées. En revanche, le traitement avec les molécules de Nocodazole et Génistéine d'induit aucune variation significative par rapport à l'incubation des particules dans les cellules PC3 non-traitées. Ces données indiquent que l'internalisation des nanoparticules cLNPa n'est pas médiée par des voies d'endocytose dépendante des cavéolines. Au contraire, le traitement avec les molécules de Cytochalasine A et de Chlorpromazine provoque une forte diminution de l'intensité

de fluorescence DiD mesurée dans les cellules : ces traitements induisent une inhibition de respectivement 73% et 80% concernant l'internalisation des nanoparticules cLNPa-DiD.

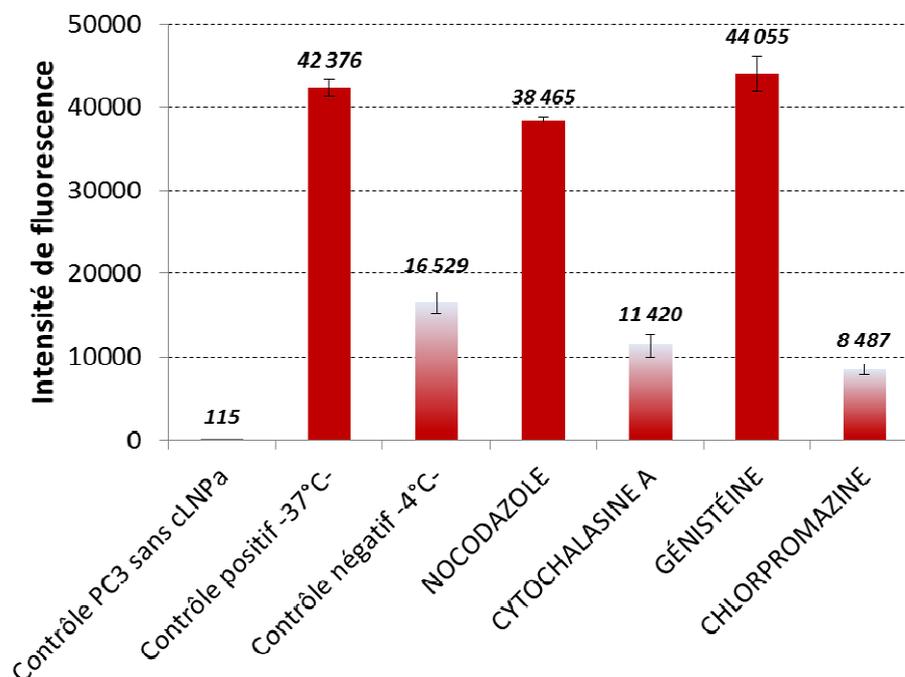


Figure V-5. Inhibition des voies d'internalisation dans les cellules PC3 : les cellules PC3 ont été incubées pendant 2 heures en présence de cLNPa-DiD après traitement avec divers inhibiteurs des voies d'internalisation pendant 30 minutes ($[DOTAP] = 6,13 \mu\text{g/mL}$ – $[DiD] = 0,3 \mu\text{mol/L}$) ($n=3$). Analyse de l'intensité de fluorescence par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – Canal DiD).

Ainsi, l'internalisation des nanoparticules cLNPa-DiD dans les cellules PC3 semble principalement médiée par des voies d'internalisation dépendante des clathrine. En outre, les filaments d'actine semblent indispensables pour l'entrée de ces particules dans les cellules, notamment pour leur action lors de l'invagination créant les vésicules endosomales. Les études de Sahay et *al.* ont décrit l'internalisation de nanoparticules liposomales de 70 à 80 nm, à 50 nM, par les voies de macropinocytose essentiellement. Les macropinosomes fusionnent ensuite avec les vésicules d'endosome tardif [17]. Sachant que ces mécanismes d'internalisation sont fortement dépendants de la taille des particules, mais aussi de la concentration d'utilisation, il peut être intéressant d'effectuer une étude plus approfondie sur les différentes voies d'entrée des siARN, notamment par une inhibition des voies de macropinocytose et des études de co-localisation lors de la distribution intra-cellulaire. Néanmoins, il paraît très probable que les cLNPa soient internalisées

par des mécanismes les piégeant dans des vésicules dans le compartiment périnucléaire, comme les observations microscopiques pouvaient l'induire (Figure V-1).

Au regard des résultats préalablement obtenus sur la rétention des siARN au niveau de la couronne des nanoparticules cLNPa, y compris dans les milieux biologiques, il est tout à fait vraisemblable que les siARN complexés empruntent les mêmes voies d'internalisation. Néanmoins, l'internalisation des siARN-Alexa488 complexés aux nanoparticules cLNPa a été étudiée (Figure V-6).

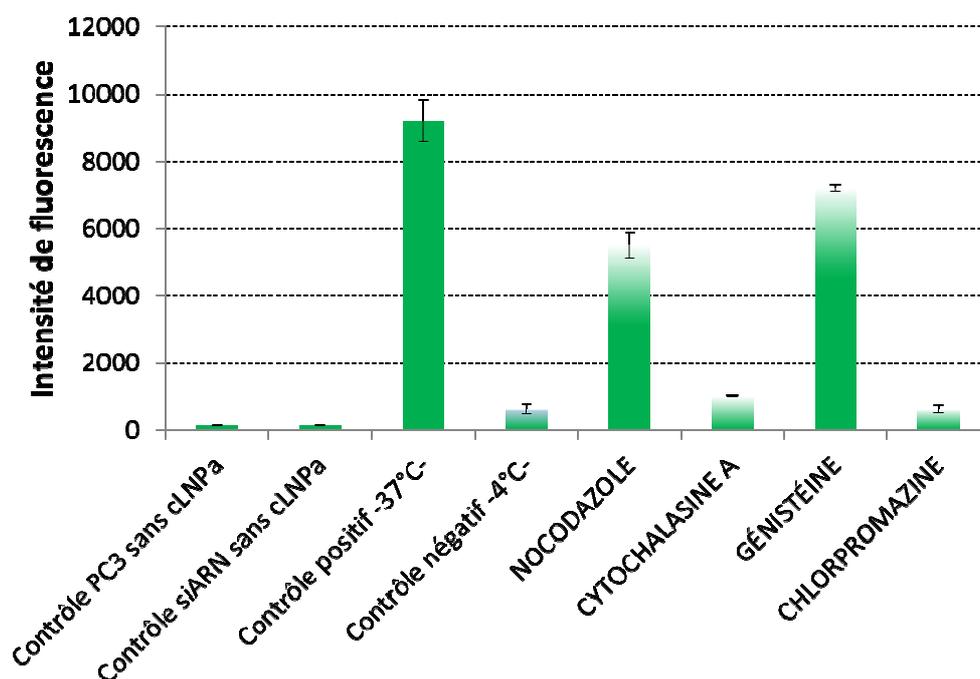


Figure V-6. Voies d'entrée des siARN médiés par les cLNPa : les cellules PC3 ont été incubées pendant 2 heures en présence de complexes siARN/cLNPa après traitement avec divers inhibiteurs des voies d'internalisation pendant 30 minutes ([siARN] = 20 nM – N/P = 12/1) (n=3). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

L'incubation des cellules PC3 non traitées avec des séquences de siARN-Alexa488, non complexées à un vecteur, n'engendre aucune augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure V-6). La diffusion des siARN au travers des membranes plasmiques est très limitée *in vitro*, bien que l'utilisation de siARN sous forme libre ait déjà été rapportée avec succès pour des applications *in vivo* [18] (voir chapitre I). Les contraintes importantes appliquées sur les cellules cultivées *in vitro* exigent l'utilisation d'un vecteur pour la transfection de siARN.

L'utilisation des nanoparticules cLNPa autorise ainsi une forte internalisation des séquences d'acides nucléiques marquées par l'Alexa488 (Figure V-6). Comme pour l'étude de l'internalisation des vecteurs seuls, l'incubation des complexes à 4°C, ou après traitement par des molécules de Cytochalasine A et Chlorpromazine, provoque une forte diminution du signal de fluorescence indiquant une forte inhibition de l'entrée des siARN dans les cellules PC3 (> 89%). Ainsi, l'internalisation des siARN complexés aux cLNPa est fortement associée à la polymérisation de l'actine et aux mécanismes d'endocytose dépendants de la clathrine ; une grande proportion des siARN emprunte les mêmes voies que les vecteurs auxquels ils sont associés, comme nous l'avions présumé.

Cependant, contrairement aux observations effectuées avec l'étude de l'internalisation des nanoparticules cLNPa seules, l'inhibition d'autres voies d'entrée par les molécules de Nocodazole et de Génistéine influent également sur le signal d'intensité de fluorescence des cellules due aux siARN, avec une réduction de respectivement 40,9% et 21,7%. Ainsi, l'entrée des siARN dans les cellules PC3 semble légèrement dépendante de la polymérisation des microtubules et, à degré moindre, de l'endocytose dépendante des cavéolines.

À partir de cette donnée, il est légitime de se poser la question d'une internalisation des siARN indépendante de la complexation aux vecteurs cLNPa. Cependant, les siARN sous forme libres ne peuvent pas diffuser à travers la membrane plasmique dans des conditions *in vitro* [18] (Figure V-6). En outre, les tests de rétention préalablement effectués ont démontré une absence de relargage des siARN sous forme libre, même après 6 heures d'incubation à 37°C dans un milieu de culture complet.

Une seconde hypothèse pourrait concerner une désorption de certaines composantes de la couronne des particules, notamment du DOTAP auquel le siARN est complexé, pouvant induire l'internalisation par des voies indépendantes des particules cLNPa. Pour vérifier ce phénomène, nous avons souhaité utiliser des molécules de DOTAP fluorescentes à intégrer dans les formulations de particules. Cependant, le fluorophore s'intégrant sur l'une des deux chaînes carbonées de ce lipide, des variations trop importantes par rapport au DOTAP non-fluorescent pourraient être provoquées au moment de la formulation. Alors, nous avons décidé de comparer une transfection avec du DOTAP libre complexé aux siARN par rapport à une transfection avec cLNPa, suivant le même temps d'incubation et au même rapport molaire N/P (Figure V-7). Ainsi, selon l'utilisation de DOTAP seul ou de cLNPa pour transférer des siARN-Alexa488, un signal d'intensité de fluorescence différent due à l'internalisation des siARN est mesuré : l'intensité de fluorescence est 2,7 fois plus élevée après 2 heures de transfection des siARN avec le DOTAP par rapport aux particules cLNPa. Selon l'hypothèse

proposée, une désorption totale du DOTAP de la surface des particules coïncide avec la condition « transfection avec du DOTAP seul » testée. Ainsi, si l’internalisation des siARN est uniquement due au DOTAP sous forme libre, le signal de fluorescence montre une désorption maximale de ce lipide cationique d’environ 36,4%. Cette hypothèse semble cependant peu probable étant donné que la majorité des siARN emprunte les mêmes voies d’internalisation que les particules cLNPa.

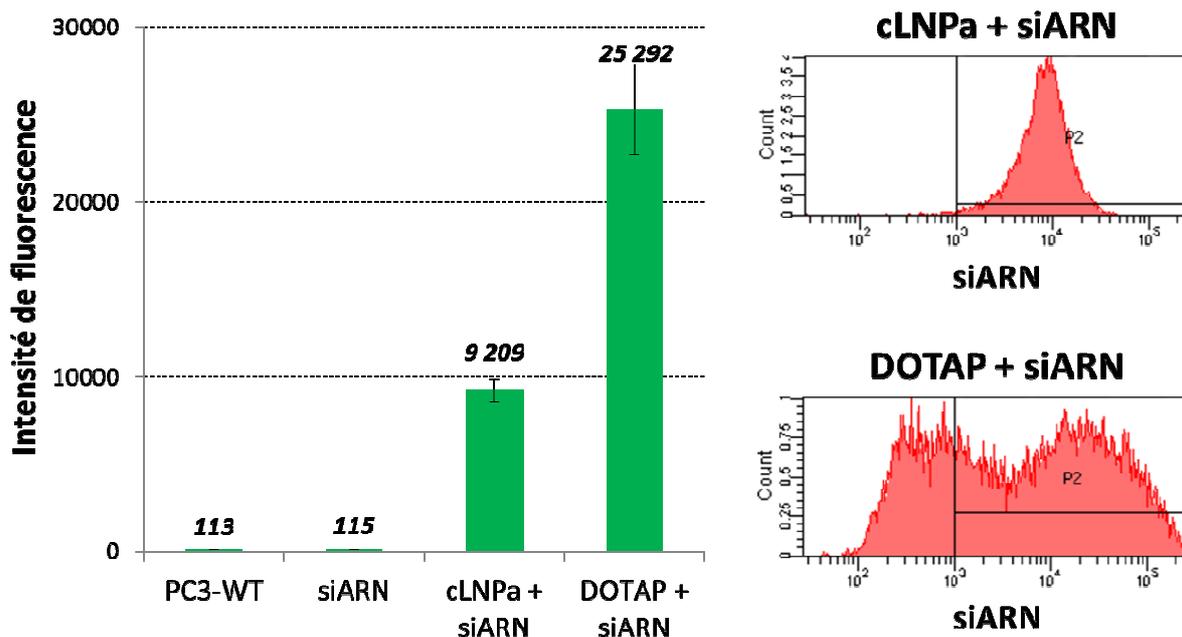


Figure V-7. Profil d’internalisation des siARN transportés par différents vecteurs : les cellules PC3 sont incubées 2 heures avec des siARN-Alexa488 complexés à des particules cLNPa ou à du DOTAP libre ([siARN] = 20 nM – N/P = 12/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

En outre, la distribution des siARN dans les cellules apparaît totalement différente en fonction de l’utilisation de DOTAP seul ou inclu dans les nanoparticules cLNP (Figure V-7). Avec le DOTAP seul, la distribution des siARN-Alexa488 dans les cellules PC3 est totalement hétérogène, avec des cellules n’indiquant aucune fluorescence tandis que d’autres présentent une intensité très élevée. À l’inverse, les particules cLNPa induisent une homogénéité de la distribution des siARN-Alexa488 entre les cellules. En effet, toutes les cellules présentent une intensité de fluorescence proche, permettant d’établir un unique pic étroit de fluorescence (Figure V-8). Ces différences dans le profil d’internalisation des siARN démontrent que l’entrée des siARN dans les cellules n’est probablement pas due à une désorption des molécules de DOTAP, mais à la particule intacte.

Néanmoins, des tests complémentaires sur les risques de désorption de DOTAP peuvent être effectués par des méthodes analytiques, permettant notamment une quantification par HPLC.

Ainsi, l'internalisation des siARN semble fortement dépendante de celle des particules cLNPa. Les faibles proportions de siARN internalisées par des voies d'endocytose dépendantes des cavéolines sont probablement dues à une entrée mineure médiée par les nanoparticules, dont la complexation modifie légèrement le comportement par rapport aux cellules.

Cette étude sur les mécanismes d'internalisation a été effectuée sur les nanoparticules cLNPa, présentant les caractéristiques les plus fortes pour une transfection efficace de siARN fonctionnels. Néanmoins, des études similaires nécessitent d'être effectuées pour les vecteurs cLNPb. En effet, en raison de propriétés différentes, en termes de composition et de diamètre hydrodynamique notamment, aucune conclusion ne peut être effectuée sur cette formulation de particule.

Les objectifs de ce chapitre étaient de valider l'internalisation des siARN et leur relargage dans le compartiment cytoplasmique afin d'induire le mécanisme d'ARNi. L'internalisation est permise, après complexation aux cLNP, à travers des voies d'endocytose. Cependant, l'entrée dans les cellules par de telles voies exige une stratégie favorisant l'échappement des endosomes pour permettre l'accès au cytoplasme et éviter une dégradation lysosomale (voir chapitre I). En outre, un relargage des siARN dans le compartiment cytoplasmique est nécessaire pour déclencher le mécanisme d'ARNi. Des expériences complémentaires peuvent d'ailleurs être réalisées, notamment en mesurant l'impact de la diminution du pH sur le relargage des siARN. La prochaine étape consiste à prouver la délivrance des siARN fonctionnels afin de provoquer le déclenchement de l'ARNi.

2. Transfection de siARN fonctionnels

Afin de prouver l'efficacité de transfection de siARN fonctionnels, des modèles cellulaires sur-exprimant la protéine GFP ont été développées (voir protocole page 140). Ainsi, pour permettre une inhibition fonctionnelle de cette protéine, un relargage de siARN reconnaissant spécifiquement l'ARNm de cette protéine est exigé dans le compartiment cytoplasmique des cellules transfectées (voir chapitre I). L'utilisation de ce modèle permet d'obtenir une information rapide, par simple visualisation, et quantitative par une analyse de l'évolution de l'intensité de fluorescence des cellules transfectées en cytométrie en flux.

De cette façon, l'inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN peut être caractérisée en termes d'efficacité. En outre, le protocole peut être optimisé concernant les temps d'incubation des siARN et les rapports molaires N/P. Enfin, une étude comparative avec des agents de transfection commerciaux est réalisée afin de confronter l'efficacité de transfection de siARN fonctionnels induite par les nanoparticules cationiques cLNP.

2.1. Cinétique de l'inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN

Le complexe cLNP/siARN doit traverser différentes étapes avant de permettre une inhibition fonctionnelle : internalisation et échappement endosomal pour atteindre le site d'action de l'ARNi. Ces étapes ne durent que quelques heures, en revanche, l'observation d'une extinction de la protéine ciblée nécessite plus de temps [20]. Une fois à l'intérieur de la cellule, le siARN active le complexe RISC chargé de dégrader spécifiquement les ARNm dont la séquence est ciblée par le siARN. Le processus de dégradation des ARNm prend un certain temps, mais c'est la $\frac{1}{2}$ vie des protéines qui permet de déterminer leur cinétique d'extinction. En effet, les protéines traduites avant la dégradation de l'ARNm ont une durée de vie plus ou moins longue qui détermine le moment où leur diminution est visualisable. Généralement, l'extinction d'une protéine est évaluée à partir de 48 heures après transfection, c'est notamment le cas pour la protéine GFP. Toutefois, l'efficacité d'extinction d'une protéine peut être analysée jusqu'à 96 heures ou plus dans certains cas où la protéine est très stable et possède une demi-vie longue.

Afin d'optimiser les protocoles pour l'étude de l'efficacité de transfection fonctionnelle, la transfection des siGFP a été testée à différents temps d'incubation, après complexation avec les nanovecteurs cLNPa et cLNPb, suivant un rapport molaire N/P établi à 12/1 (Figure V-8). Ce rapport molaire a été choisi en accord avec les expériences précédemment effectuées sur la complexation et la rétention des siARN sur les particules cLNP. Par ailleurs, les efficacités d'inhibition fonctionnelle ont été normalisées par rapport aux cellules transfectées avec un siARN contrôle, le siARN Allstar, n'induisant théoriquement aucun effet sur les cellules de mammifère.

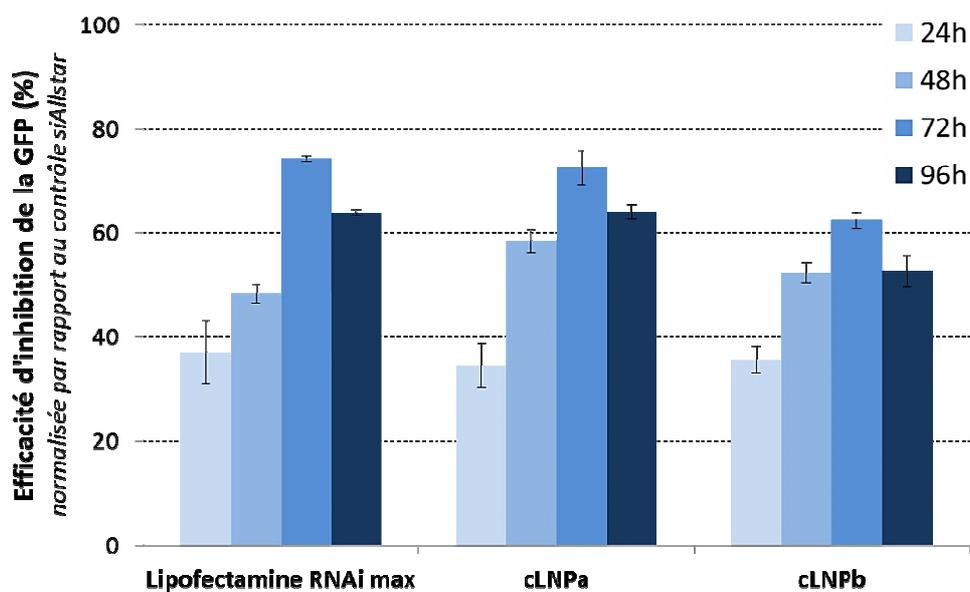


Figure V-8. Cinétique d'inhibition de l'expression de la protéine GFP : les cellules PC3 sur-exprimant la protéine GFP ont été transfectées par des siGFP à l'aide de trois différents vecteurs. Quatre temps d'incubation post-transfection ont été testés allant de 24 à 96 heures ($n=6$) ([siARN] = 20 nM – N/P = 12/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

L'efficacité d'inhibition fonctionnelle de la protéine GFP est déduite à partir de la diminution de l'intensité de fluorescence verte, par cytométrie en flux (voir protocole page 145). Après une cinétique de transfection effectuée sur 96 heures, les trois vecteurs utilisés pour la délivrance intracellulaire de siGFP démontrent un profil similaire d'extinction : une inhibition de l'intensité de fluorescence inférieure à 40% est mesurée après 24 heures de transfection. Cette efficacité augmente avec les temps de transfection appliqué jusqu'à un maximum pour 72 heures. Après 72 heures d'incubation des complexes vecteurs/siGFP, l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence diminue.

La cinétique d'inhibition fonctionnelle a été comparée à celle obtenue après délivrance de siGFP en utilisant l'un des meilleurs agents de transfection commerciaux, la Lipofectamine RNAimax. Par rapport à ce vecteur, les résultats d'inhibition fonctionnelle induits avec cLNPa sont comparables après 72 heures d'incubation, avec une diminution de l'intensité de fluorescence de 73% par rapport à des cellules transfectées avec un siARN ne reconnaissant théoriquement aucun ARNm chez les cellules de mammifères (siARN Allstar). Ensuite l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence diminue jusqu'à 64% après 96 heures d'incubation des complexes LipofectamineRNAimax/siGFP et cLNPa/siGFP (Figure V-8). La différence majeure dans l'efficacité d'inhibition provoquée par ces deux vecteurs concerne les résultats obtenus après 48 heures d'incubation : alors que l'inhibition de

l'intensité de fluorescence induite par la transfection de siGFP avec des cLNP est d'environ 58%, l'utilisation de la Lipofectamine RNAimax démontre une efficacité 10% moins élevée (Figure V-8). Afin d'expliquer cette différence, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une internalisation et/ou d'un échappement endosomal plus rapide des siARN médiés par les vecteurs cLNPa. En effet, Kong *et al.* ont démontré une internalisation d'une quantité moins élevée de siARN avec des lipoplexes sur un temps court [9] ; les cLNP permettant une internalisation massive et rapide des siARN peuvent induire plus rapidement le mécanisme d'ARN interférence de façon significative.

En revanche, l'utilisation de cLNPb comme vecteur de siARN permet une inhibition de l'intensité de fluorescence plus faible de 8% par rapport à celle obtenue après transfection avec la Lipofectamine RNAimax et cLNPa, après 72 heures d'incubation des complexes. Ce résultat peut être expliqué par l'efficacité d'internalisation observée précédemment, qui apparaît moins élevée après transfection de siARN avec cLNPb par rapport à la transfection avec cLNPa (Figure V-4). En outre, d'autres facteurs peuvent être pris en considération au regard des différences de structures entre cLNPa et cLNPb : une différence d'interaction avec les membranes plasmiques, une différence d'échappement endosomal ou encore un relargage des siARN dans le cytoplasme variant entre les deux vecteurs.

Néanmoins, quel que soit le vecteur utilisé, l'efficacité d'inhibition maximale de l'intensité de fluorescence est permis par une incubation de 72 heures des complexes vecteurs/siGFP avec les cellules PC3-GFP. C'est pourquoi ce temps d'incubation est celui choisi pour les prochaines expériences sur la transfection de siARN fonctionnels.

2.2. Optimisation des concentrations en siARN et en cLNP

Dans le rapport molaire N/P établi précédemment, deux facteurs entre en considération : la quantité de groupement ammonium N apportée par le lipide cationique du vecteur et la quantité de groupement phosphate P contenue dans les séquences d'acides nucléiques. Ainsi, les concentrations en siARN et en nanoparticules cLNP peuvent également être ajustées afin d'améliorer l'efficacité de transfection de siARN fonctionnels. En outre, une délivrance efficace de siARN autorise une diminution des concentrations utilisées, limitant ainsi les risques d'effets secondaires mentionnés dans le chapitre I, à savoir l'induction de réponses immunitaires potentielles, les effets aspécifiques ou encore la saturation des voies endogènes.

2.2.1. Optimisation des concentrations nanoparticulaires

Les validations sur l'interaction des siARN avec les nanoparticules cLNP ont permis d'identifier qu'une complexation totale des courtes séquences d'acides nucléiques était permise à partir d'un rapport molaire N/P de 4/1, sans relargage de siARN (chapitre IV). Ainsi, pour une même concentration en siARN de 20 nM, différents rapports molaires N/P ont été étudiés afin d'optimiser la concentration en nanoparticule cLNP pour une inhibition fonctionnelle élevée (Figure V-9).

Les efficacités d'inhibition en fonction des rapports N/P imposés démontrent un profil similaire avec les nanovecteurs cLNPa et cLNPb. En effet, alors que l'inhibition de l'intensité de fluorescence mesurée est inférieure à 30% après transfection de siGFP, à des rapports molaires inférieurs ou égaux à 4/1, l'augmentation du rapport molaire N/P est corrélée à une augmentation de l'efficacité d'inhibition. Ainsi, une inhibition maximale de l'intensité de fluorescence est atteinte avec un plateau à partir du rapport molaire N/P égal à 12/1 en utilisant cLNPa ou cLNPb (Figure V-9).

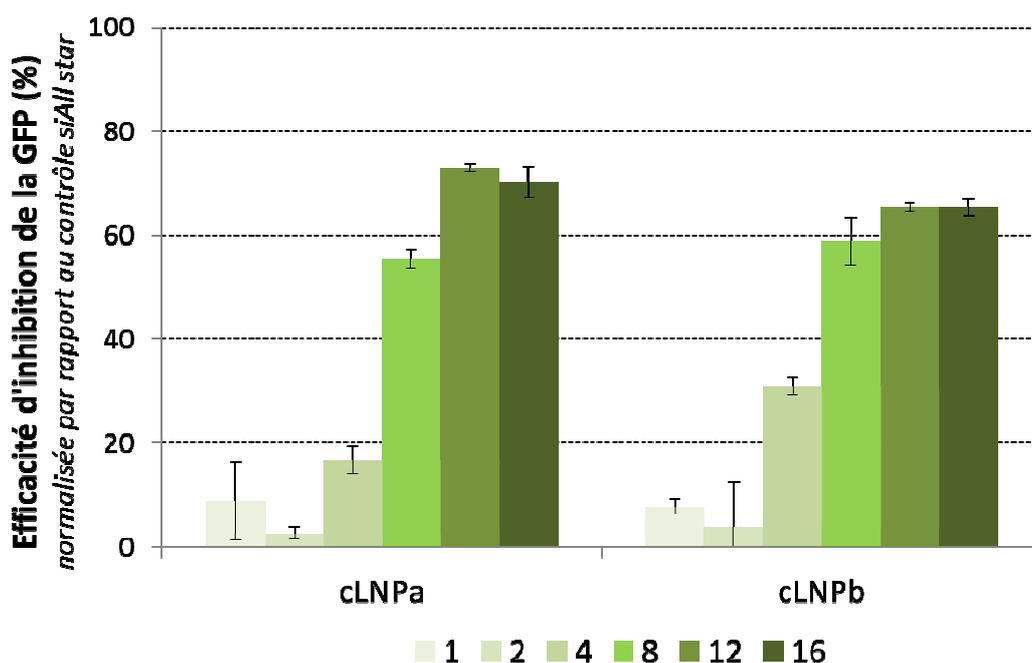


Figure V-9. Efficacité de transfection fonctionnelle à différents ratios N/P : les cellules PC3-GFP ont été transfectées par des siGFP complexés à cLNPa ou cLNPb. Différents ratios N/P sont analysés de 1/1 à 16/1 pour une même concentration en siARN ($n=3$) ($[siARN] = 20 \text{ nM}$ – temps d'incubation = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

Comme attendu au regard des résultats de transfection en ayant recours à des siARN-Alexa488, les cLNPa complexés aux siGFP permettent une inhibition fonctionnelle plus élevée que les cLNPa complexés (≈ 8%). Néanmoins, pour les rapports molaires N/P inférieurs à 12/1, cLNPa permet une inhibition fonctionnelle supérieure ou égale à cLNPa, notamment pour les rapports 4/1 et 8/1. Ainsi, les vitesses d'internalisation et/ou d'échappement endosomale ne semble pas expliquer ces différences d'efficacité entre les deux nanovecteurs. Ces différences peuvent éventuellement être dues à la stabilité des particules suite à des dilutions élevées. En effet, au cours du chapitre IV, nous avons rapporté que pour obtenir un même rapport molaire N/P, les dilutions subies par cLNPa étaient plus fortes que celles subies par cLNPa. Ainsi, pour des rapports molaires N/P plus faibles, les particules cLNPa sont moins affectées par ce paramètre, induisant une intégrité plus élevée et une internalisation potentiellement plus forte. Ces données pourraient alors être responsables d'une inhibition fonctionnelle plus élevée pour les transfections avec cLNPa par rapport à cLNPa, pour les faibles rapports molaires N/P.

Malgré une efficacité de complexation totale dès un rapport molaire N/P de 4/1, l'augmentation des concentrations en nanoparticules cLNP jusqu'à un rapport molaire N/P de 12/1 est nécessaire pour obtenir une efficacité d'inhibition fonctionnelle maximale. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons proposé deux hypothèses liées aux mécanismes d'internalisation et d'échappement endosomal des complexes.

Premièrement, une augmentation de la concentration en cLNP est corrélée à une augmentation de la concentration en DOTAP et en lipides neutres. Ces lipides cationiques peuvent potentiellement apporter un pouvoir endosomolytique plus élevé dû à un nombre de groupement ammonium plus important dans les vésicules d'endosome. Des expériences complémentaires nécessitent d'être effectuées afin d'établir si ces molécules peuvent engendrer un phénomène de tamponnage autorisant la rupture des membranes endosomales (voir chapitre I), notamment par des études de distribution et de co-localisation des nanoparticules dans les vésicules de type endosome et lysosome. Une concentration plus élevée en lipides cationiques peut également favoriser la fusion de la couronne des particules avec les membranes endosomales, permettant une déstabilisation des vésicules et un passage vers le compartiment cytoplasmique [21]. Pour rappel, les nanoparticules cLNPa contiennent des lipides fusogènes DOPE contrairement aux particules cLNPa.

Pour la seconde hypothèse, une concentration plus élevée en nanoparticule pourrait théoriquement favoriser une internalisation par un mécanisme de macropinocytose [22]. De cette façon, un plus grand nombre de complexes nanoparticules/siARN est séquestré dans une vésicule plus large (un diamètre supérieur à 200 nm alors que les vésicules d'endosome présentent un diamètre inférieur à 200 nm [23]). Ainsi, une plus grande quantité de particules confinée dans une

seule vésicule peut accroître leur faculté à rejoindre le compartiment cytoplasmique par les stratégies décrites précédemment. Avec cette dernière hypothèse, il est possible d’imaginer une internalisation d’un nombre de particule cLNPa plus élevé que le nombre de particule cLNPb dans une même vésicule, de par leur diamètre hydrodynamique plus petit. D’après les calculs effectués tableau V-2, le nombre de groupement ammonium est de 6482 par particules cLNPa et 8807 par particules cLNPb. En estimant un macropinosome d’un diamètre de 500 nm (volume hypothétique = $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \text{rayon}^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 250^3 = 65,4 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$), cette vésicule peut théoriquement séquestrer 1467 nanoparticules cLNPa de 43 nm (volume = $44,6 \cdot 10^3 \text{ nm}^3$) et 308 nanoparticules cLNPb de 73 nm (volume = $212,2 \cdot 10^3 \text{ nm}^3$). Ainsi, le nombre de groupement ammonium peut être estimé 3,5 fois moins élevé dans le cas d’une transfection avec cLNPb ($= \frac{1467 \times 6482}{308 \times 8807}$). L’inhibition fonctionnelle plus faible observée avec cLNPb peut venir d’une faculté plus faible pour l’échappement endosomal.

Nanoparticules	cLNPa	cLNPb
Nombre de N+/puits	3,190.10 ¹⁵	3,190.10 ¹⁵
Nombre de particules/puits	4,924.10 ¹¹	3,624.10 ¹¹
Nombre de N+/particule	6482	8807

Tableau V-2. Nombre de groupement ammonium par particule : pour un même rapport molaire N/P, le nombre de nanoparticules cLNPa est supérieur au nombre de nanoparticules cLNPb, induisant une quantité de groupement ammonium plus élevée sur les nanovecteurs cLNPb (pour [siARN] = 20 nM – N/P = 12/1 – Volume final = 500 µL).

2.2.2. Optimisation de la concentration en siARN

Une concentration en nanoparticule cLNPa, autorisant un rapport molaire N/P égal à 12/1, permet une inhibition fonctionnelle maximale après transfection d’une concentration de 20 nM de siARN sur le modèle cellulaire PC3-GFP. Nous avons dès lors cherché à déterminer si cette efficacité d’inhibition était maintenue pour une concentration en siARN plus faible, en gardant le rapport molaire N/P à 12/1 (Figure V-10). En comparaison, nous avons effectué des expériences de transfection fonctionnelle avec le vecteur commercial Lipofectamine RNAimax. Cependant, en raison d’un manque d’information sur ce produit, nous avons conservé la concentration de ce vecteur conseillée par le fournisseur, en imposant une diminution de la concentration en siARN (Figure V-11).

Alors que la Lipofectamine RNAimax montre une efficacité constante, malgré une diminution importante des concentrations en siARN (dilution au 200° de la concentration en siARN), les nanoparticules lipidiques cationiques cLNPa démontrent leur limite et voient leur efficacité diminuer avec la concentration en siARN (Figure V-10). En effet, pour un rapport molaire N/P de 12/1 et une concentration en siARN de 10 nM, l'efficacité diminue de 23,41% et plus aucun effet n'est visible à 100 pM (Figure V-11).

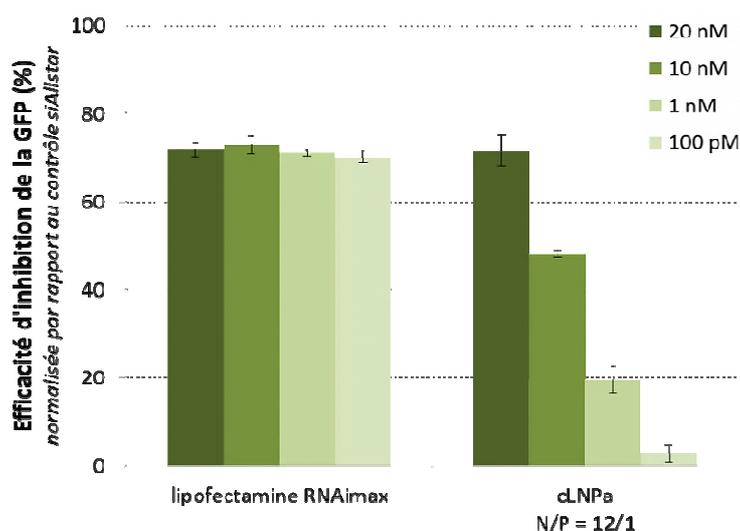


Figure V-10. Efficacité de transfection fonctionnelle à différentes concentrations en siGFP : les cellules PC3-GFP sont transfectées par des siGFP complexés à la Lipofectamine RNAimax ou à cLNPa. La concentration en siARN utilisée est diminuée de 20 nM à 100 pM. La Lipofectamine RNAimax est utilisée dans une quantité constante selon les recommandations du fournisseur. Le rapport molaire N/P est maintenu à 12/1 pour l'utilisation des nanoparticules cLNPa (n=3) (temps d'incubation = 72 heures – N/P = 12/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

Cependant, en réduisant la quantité de siARN tout en maintenant le même rapport molaire N/P, les concentrations en nanoparticules se voient diminuées jusqu'aux zones de dilution entraînant peu, voire pas de stabilité colloïdale. En effet, pour un rapport molaire N/P maintenu à 12/1, une concentration en siARN de 20 nM impose une dilution au 1162°, tandis qu'une concentration en siARN de 1 nM entraîne une dilution au 23240°, soit une différence très élevée. Il devient totalement compréhensible que, dans ces conditions, l'efficacité de transfection s'en fasse ressentir. Le protocole adéquat serait alors de diminuer la concentration en siARN sans modifier celle du vecteur. Cette démarche est d'ailleurs celle employée lors de cette expérience avec le vecteur commercial, la

Lipofectamine RNAimax, offrant un maintien de l'efficacité de l'inhibition fonctionnelle malgré la diminution de la concentration en siARN.

En outre, lors de l'optimisation de la concentration en nanoparticules lipidiques, nous avons émis l'hypothèse que le nombre de cLNP pouvait être déterminant pour favoriser l'échappement endosomal. Dès lors, un seuil de concentration en nanoparticules peut exister pour autoriser une délivrance intra-cytoplasmique optimale des siARN.

2.2.3. Importance de la quantité en nanoparticule pour la transfection

Lors de notre étude, un phénomène intéressant a été observé corroborant l'hypothèse d'une influence déterminante du nombre de nanoparticule utilisé lors de la transfection de siARN (Figure V-11).

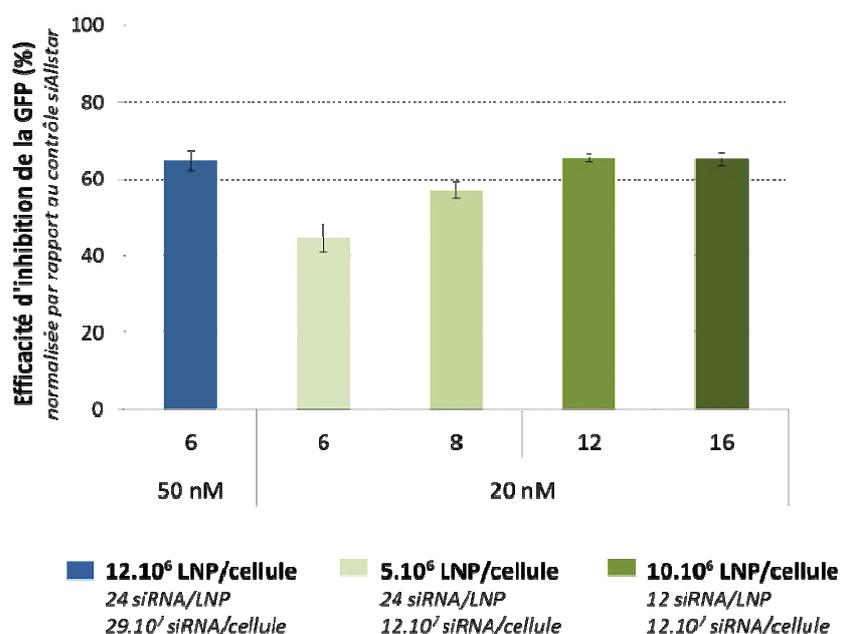


Figure V-11. Importance de la quantité en nanoparticule lors de la transfection : les cellules PC3-GFP sont transfectées avec différentes concentrations en siARN et différents rapports N/P avec les nanoparticules cLNPa (n=3). Les calculs ont été réalisés en considérant $50 \cdot 10^3$ cellules/puits. Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSR II – canal FITC).

Après une transfection à une concentration en siARN de 50 nM, un rapport molaire N/P égal à 6/1 avec des nanoparticules cLNPa a permis une inhibition fonctionnelle maximale ($\approx 65\%$). Or,

en diminuant la concentration en siARN jusqu'à 20 nM, tout en maintenant le même rapport molaire N/P, une perte d'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence de 20% est observée. Pour retrouver une efficacité d'inhibition maximale, il est nécessaire d'augmenter ce rapport molaire N/P jusqu'à 12/1.

En recherchant les points communs entre les différentes conditions, la concentration en nanoparticules apparaît être un facteur déterminant pour une efficacité d'inhibition fonctionnelle optimale. En effet, la concentration en siARN ne paraît pas être le facteur essentiel : pour une quantité estimée à $12 \cdot 10^7$ siARN/cellule ($[\text{siARN}] = 20 \text{ nM}$), l'efficacité d'inhibition est différente suivant l'utilisation d'un rapport molaire N/P de 6/1 ou 12/1. En revanche, la quantité élevée de nanoparticules cLNPa est un facteur retrouvé dans les différentes conditions permettant une forte inhibition de l'intensité de fluorescence ($>10^7$ cLNP/cellule) (Figure V-11).

Les calculs ont ainsi été effectués pour quantifier le nombre de cLNPa/cellule, suivant le rapport molaire N/P, par rapport à l'efficacité d'inhibition fonctionnelle (Figure V-12). Ainsi, la quantité en nanoparticules cLNPa présente un seuil à partir duquel l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence est optimale : 10^7 cLNPa/cellule.

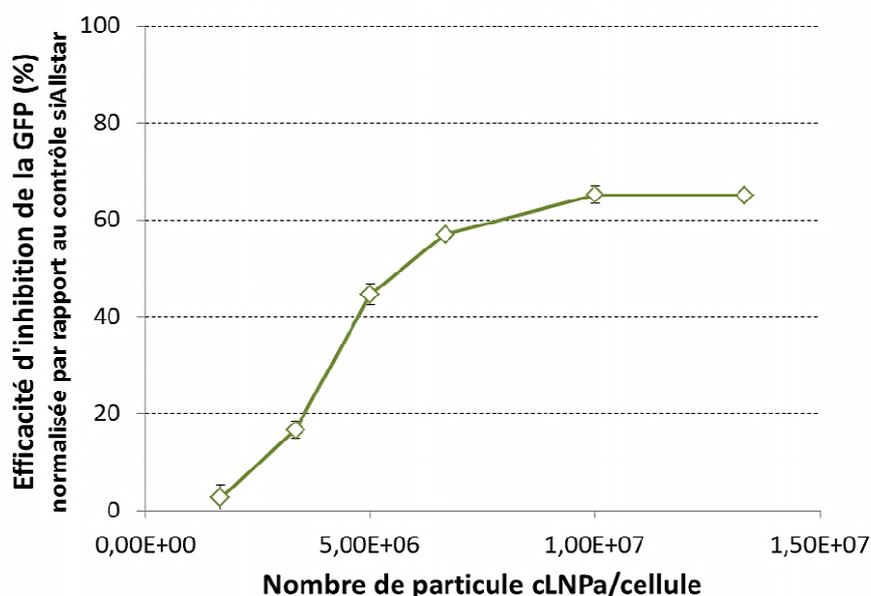


Figure V-12. Quantification du nombre de particule cLNPa par rapport à l'efficacité d'inhibition fonctionnelle : les cellules PC3-GFP sont transfectées avec des siGFP à différents rapport molaire N/P avec les nanoparticules cLNPa ($n=3$). Les calculs ont été réalisés en considérant $50 \cdot 10^3$ cellules/puits. Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII).

Dès lors, plus que le rapport molaire N/P, c'est la concentration en nanoparticules lipidiques qu'il est nécessaire d'ajuster. Sur le modèle cellulaire PC3-GFP, une concentration en nanoparticules cLNPa d'environ 22 µg/mL correspond au seuil d'utilisation permettant d'acquérir des efficacités d'inhibition fonctionnelle optimales. D'après des expériences similaires, une concentration en nanoparticules cLNPb d'environ 63 µg/mL correspond au seuil d'utilisation permettant d'acquérir des efficacités d'inhibition fonctionnelle optimales pour cette formulation (données non-montrées).

2.3. Comparaison des efficacités d'inhibition fonctionnelle par rapport aux agents de transfection commerciaux

Les nanoparticules lipidiques cLNP développées dans cette étude ayant prouvées une forte efficacité de délivrance de siARN fonctionnels sur le modèle PC3-GFP, une comparaison par rapport aux meilleurs agents de transfection commerciaux est nécessaire. Ainsi, une étude comparative a été effectuée avec un vecteur lipidique commercial, la Lipofectamine RNAimax, pour la transfection de d'une concentration de 20 nM en siGFP sur des cellules PC3-GFP (voir protocole page 145). Les nanoparticules cLNPa et cLNPb ont été utilisées dans un rapport molaire N/P établie à 12/1, soit une concentration en nanoparticules de respectivement 22 µg/mL et 63 µg/mL.

En outre, les résultats ont été normalisés suivant deux façons : par rapport à l'intensité de fluorescence de cellules transfectées avec un siARN Allstar ou par rapport à l'intensité de fluorescence de cellules non transfectées (Figure V-13).

Par rapport aux cellules transfectées avec un siARN Allstar, la transfection de siGFP médiée par cLNPa offre l'inhibition de l'intensité de fluorescence la plus élevée, environ 65,8% (rouge). Bien que la différence soit faible par rapport au vecteur commercial (vert), en termes de pourcentage d'inhibition fonctionnelle (3,8%), la Lipofectamine RNAimax est statistiquement considérée comme significativement moins efficace ($p < 0,001$) pour une concentration en siARN de 20 nM. Cette efficacité d'inhibition fonctionnelle comparable démontre le caractère compétitif des cLNPa en tant que vecteur de courtes séquences d'acides nucléiques. De même, malgré leur intérêt de par leurs propriétés différentes, les particules cLNPb autorisent une efficacité d'inhibition significativement inférieure de 11,4% (bleu) par rapport à cLNPa ($p < 0,001$), suite à la transfection de siGFP (Figure V-14). Ces résultats sont en accord avec les observations et les interprétations précédentes concernant l'internalisation et/ou l'échappement endosomal des nanoparticules cLNPb.

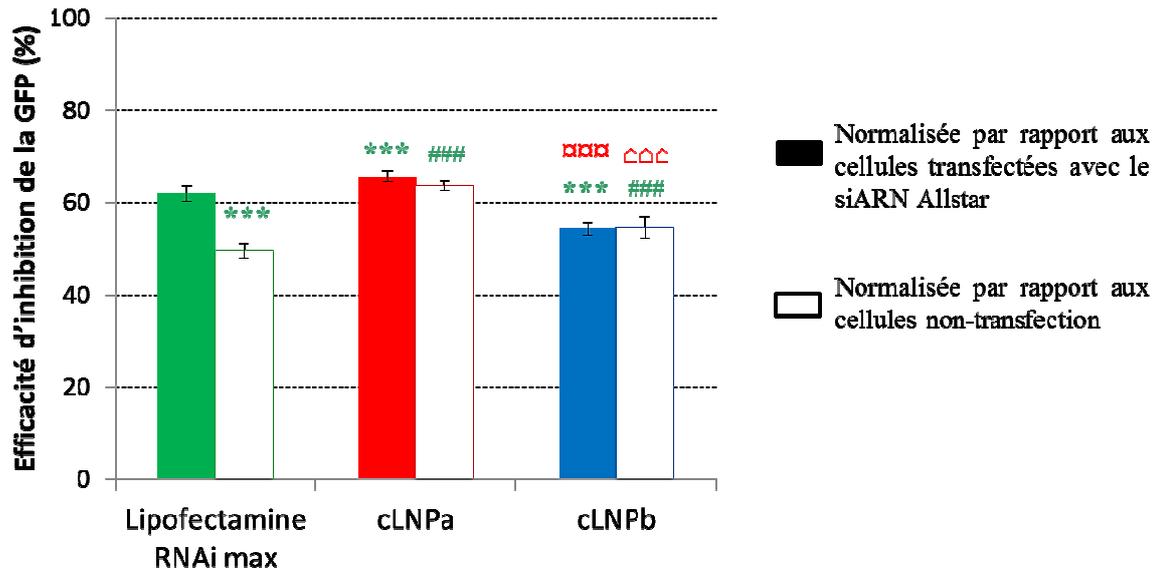


Figure V-13. Étude comparative de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle avec la Lipofectamine RNAimax : les cellules PC3-GFP ont été transfectées par des siARN avec la Lipofectamine RNAimax, cLNPa ou cLNpb (n=24) ([siARN] = 20 nM – ratio N/P = 12/1 – temps d'incubation = 72 heures) (***) : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec la Lipofectamine normalisée avec le contrôle siAllstar; ### : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec la Lipofectamine normalisée avec le contrôle cellules non-transfectées; ### : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec cLNPa normalisée par rapport au contrôle siAllstar; ∆∆∆ : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec cLNPa normalisée par rapport au contrôle cellules non-transfectées). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC). Tests statistiques réalisés par ANOVA-2.

Par ailleurs, une différence est observée concernant l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence induite par la transfection de siGFP avec la Lipofectamine RNAimax, suivant la normalisation appliquée. En effet, suite à la normalisation par rapport à l'intensité de fluorescence des cellules non-transfectées, l'inhibition fonctionnelle est significativement inférieure de 12,4% ($p < 0,001$) par rapport à la normalisation avec les cellules transfectées par un complexe Lipofectamine RNAimax/siARN Allstar. Pour rappel, le siARN Allstar est un ARN interférent contrôle n'induisant théoriquement aucune inhibition post-transcriptionnelle sur les cellules de mammifère. Au contraire, aucune variation de l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence n'est observée suite à la transfection avec les nanoparticules cLNP, quelle que soit la normalisation appliquée. En observant plus attentivement les résultats obtenus, l'intensité de fluorescence issue de la transfection de siARN Allstar avec la Lipofectamine RNAimax s'avère être exacerbée, pouvant alors induire une surestimation de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle mesurée. Plus difficile à comprendre,

l'utilisation de Lipofectamine RNAimax, dans les mêmes concentrations mais non complexé à des séquences d'acides nucléiques, n'induit aucune augmentation du niveau de l'intensité de fluorescence des cellules. Dès lors, cette exacerbation de l'intensité de fluorescence est-elle due à une modification de la quantité de protéine GFP ou à une augmentation de l'auto-fluorescence des cellules ? Pour répondre à cette question, une analyse d'immuno-détection de la protéine GFP par immuno-empreinte est effectuée pour mesurer la quantité de protéine GFP contenue dans les cellules PC3-GFP dans différentes conditions (voir protocole page 146) (Figure V-14).

Au niveau de la quantification protéique, la transfection de siGFP avec les vecteurs Lipofectamine RNAimax et cLNPa induisent respectivement 85,4% et 86,0% d'inhibition de la quantité de protéine GFP, après normalisation par rapport aux cellules non-transfectées ou par rapport aux cellules transfectées avec des siARN contrôle. De plus, la transfection de siGFP avec cLNPb permet une réduction de la quantité de protéine GFP de 71,6%, soit une différence significative par rapport aux deux autres vecteurs ($p < 0,01$).

Un élément important dans cette expérience concerne les niveaux protéiques de GFP suite à la transfection du siARN contrôle. En effet, aucune différence significative n'est observée au niveau de la quantité de la protéine GFP quel que soit le vecteur utilisé pour la transfection de siARN Allstar (Figure V-15). Ainsi, l'exacerbation de l'intensité de fluorescence observée avec la Lipofectamine RNAimax lors de la transfection de siARN Allstar ne semble pas due à une augmentation de la quantité de protéine GFP. En outre, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle comparable médiée par la Lipofectamine RNAimax et cLNPa (Figure V-14) semble être plus proche des interprétations effectuées après normalisation par rapport aux cellules transfectées avec le siARN Allstar, lors de l'étude sur l'évolution de l'intensité de fluorescence (Figure V-13). Ainsi, l'exacerbation de l'intensité de fluorescence observée avec le complexe Lipofectamine RNAimax/siARN Allstar peut également être induite dans les mêmes proportions avec le complexe Lipofectamine RNAimax/siGFP. Alors, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle n'est ni surestimée, ni sous-estimée comme ça peut être le cas après la normalisation par rapport aux cellules non-transfectées. Ce phénomène impactant probablement l'auto-fluorescence de la cellule ne semble pas être dû au vecteur lipidique commercial seul, mais à l'association entre ce vecteur et des séquences d'acides nucléiques. En dépit du manque d'information sur l'implication des lipoplexes sur la variation de l'intensité de fluorescence des cellules PC3-GFP, nous proposerons une interprétation dans la partie discussion de ce chapitre.

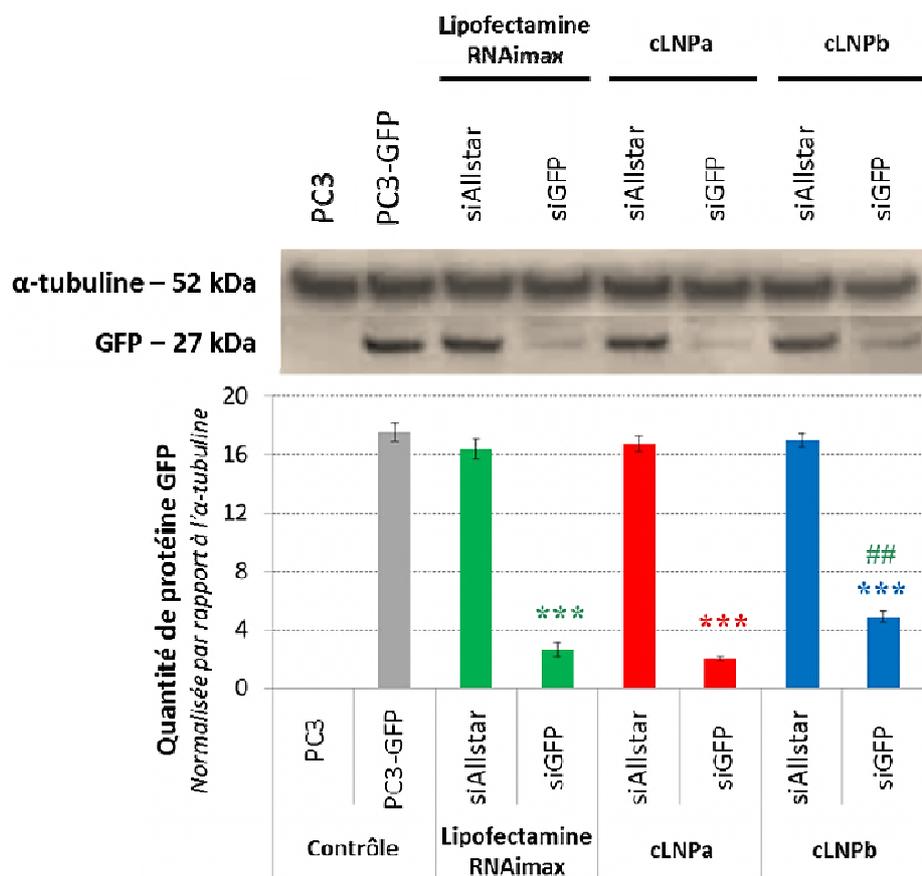


Figure V-14. Validation de l'inhibition fonctionnelle au niveau protéique : les cellules PC3-GFP ont été transfectées par des siARN avec la Lipofectamine RNAimax, cLNPa ou cLNPb. Une quantification protéine de la GFP a été réalisée par immuno-détection et normalisée par rapport à la quantité d'α-tubuline (n=3) ([siARN] = 20 nM – ratio N/P = 12/1 – temps d'incubation = 48 heures) (***) : $p < 0,001$ par rapport à la quantité de protéine GFP après transfection avec le siAllstar en utilisant le vecteur correspondant ; ## : $p < 0,01$ par rapport à la quantité de protéine GFP après transfection avec le siGFP en utilisant la Lipofectamine RNAimax). Tests statistiques réalisés par ANOVA-2.

Néanmoins, en plus des résultats d'inhibition fonctionnelle élevés induits par la transfection de siARN avec les nanoparticules cLNP, notamment cLNPa, l'absence de variation de l'intensité de fluorescence due à la présence de ces vecteurs offre un outil de vectorisation intéressant. En effet, de nombreuses études s'appuyant sur l'ARN interférence reposent sur des analyses de cytométrie en flux, et en particulier sur l'évolution de l'intensité de fluorescence induite par la transfection. Cette méthode rapide permet d'étudier des centaines de condition en parallèle immédiatement après la transfection. À l'inverse, la quantification par immuno-détection peut s'avérer plus fastidieuse et sur un nombre d'échantillon plus réduit. Dès lors, l'utilisation d'un vecteur n'influençant pas l'auto-fluorescence des cellules peut s'avérer être un avantage majeur pour une interprétation plus robuste.

Une étude comparative plus générique a alors été effectuée avec de nombreux agents de transfection de siARN commercialisés (Figure V-15), avec des compositions différentes : des vecteurs peptidiques (Nter), hybrides polymériques-lipidiques (TransIT-TKO) ou uniquement lipidiques (Lipofectamine, Oligofectamine, SilentFECT, DharmaFECT, Interferin, DOTAP liposomal reagent). Comme précédemment, les résultats d'inhibition de l'intensité de fluorescence des cellules PC3-GFP ont été normalisés suivant les deux méthodes : par rapport aux cellules transfectées avec le siARN Allstar ou par rapport aux cellules non-transfectées.

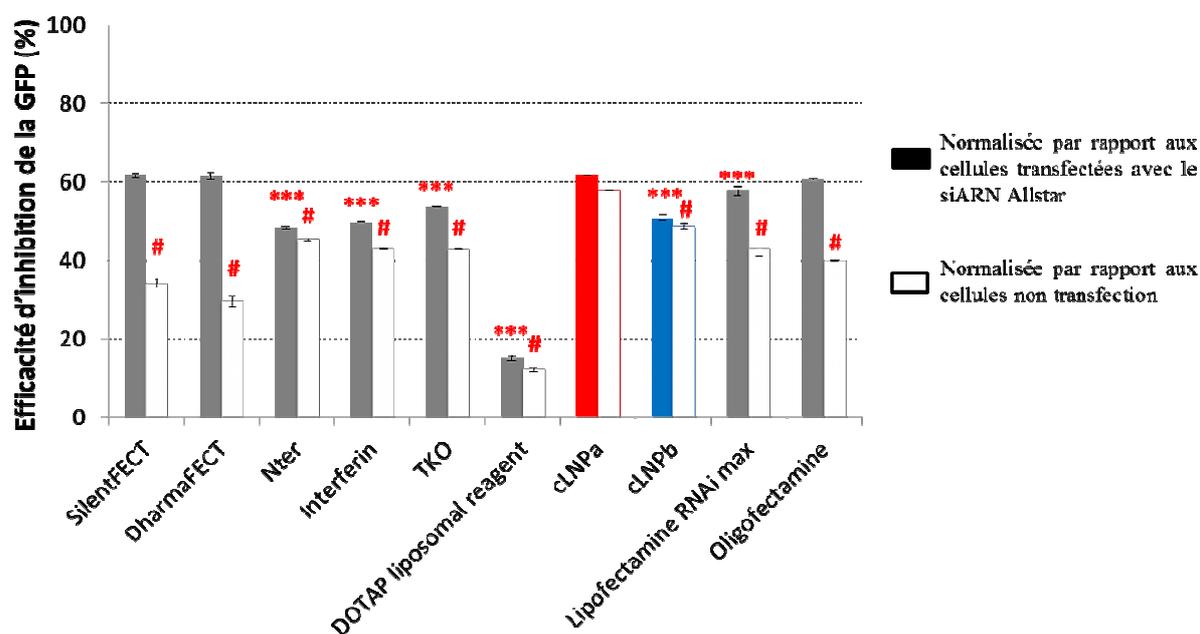


Figure V-15. Comparaison de l'efficacité de transfection par rapport aux agents commerciaux : les cellules PC3-GFP ont été transfectées par des siARN avec différents vecteurs commerciaux (n=3) ([siARN] = 20 nM – ratio N/P = 12/1 – temps d'incubation = 72 heures) (***) : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec cLNPa normalisée avec le contrôle siAllstar – ANOVA-2 –; # : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec cLNPa normalisée avec le contrôle cellules non-transfectées – Test de Kruskal-Wallis –). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

Suite à la normalisation par rapport aux cellules transfectées avec le siARN Allstar, cLNPa apparaît comme l'un des quatre agents de transfection autorisant l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence la plus élevée, sur les cellules PC3-GFP (rouge). En effet, seuls le SilentFECT, le DharmaFECT et l'Oligofectamine démontrent une efficacité d'inhibition fonctionnelle significativement comparable (Figure V-16). Tous les autres agents de transfection commerciaux testés permettent une inhibition fonctionnelle entre 4 et 14% moins élevée après transfection de

siGFP sur les cellules PC3-GFP. En particulier, malgré ses résultats inférieurs à cLNPa, cLNPb se retrouve dans cette gamme d'efficacité comparable aux autres agents de transfection testés (bleu) (Figure V-15).

Par ailleurs, le même phénomène que précédemment est observé concernant l'exacerbation de l'intensité de fluorescence suite à la transfection de siARN contrôle. Ainsi, comme précédemment, la normalisation par rapport aux cellules non-transfectées induit une sous-estimation de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle médiée par ces vecteurs. La plupart des agents de transfection commerciaux semble impacter l'intensité de fluorescence des cellules PC3-GFP après transfection de séquences d'acides nucléiques. Ce phénomène sera discuté à la fin de ce chapitre. Encore une fois, les nanovecteurs cLNP s'imposent comme des outils de transfection compétitifs de par leur efficacité d'inhibition fonctionnelle couplée à une absence d'influence sur l'auto-fluorescence des cellules due aux particules.

2.4. Les avantages apportés par les nanoparticules cLNP

2.4.1. Étude de la cytotoxicité induite lors de la transfection

2.4.1.1. Cytotoxicité des nanoparticules cLNP seules

L'innocuité des nanovecteurs utilisés est un paramètre important exigé lors de cette étude. En particulier pour l'étude de l'impact de la transfection de siARN, l'incubation des cellules en présence des nanoparticules ne doit pas engendrer une altération du phénotype. Les nanoparticules neutres LNP ont déjà prouvé une innocuité importante dans diverses études, notamment en présentant une concentration inhibitrice médiane pour laquelle 50% des cellules sont mortes (ou IC₅₀) supérieure à 1 mg/mL [24]. Cependant, les modifications apportées sur la couronne des particules, en particulier avec l'ajout de lipides cationiques, ont permis de développer un objet différent exigeant une nouvelle étude en termes de cytotoxicité. C'est pourquoi trois tests différents ont été effectués afin de mesurer l'impact des nanoparticules cLNPa et cLNPb sur les cellules PC3, d'après les recommandations des laboratoires de caractérisation en nanotechnologie (US-NCL) : un test WST-1, une mesure des quantités de LDH relarguées et un test CFE (voir protocole page 142). Pour ces différentes expériences, la concentration en lipide cationique contenue dans les particules a été choisie comme référentiel : la quantité de nanoparticules étant choisie suite à l'établissement du rapport molaire N/P, il paraît plus cohérent d'effectuer une comparaison par rapport à la concentration en DOTAP.

Le test WST-1 est basé sur la réduction de la molécule WST-1 (ou *water-soluble tetrazolium-1*) permise par l'activité déshydrogénase des enzymes de la chaîne mitochondriale (protocole page 135). Des sels de tétrazolium sont clivés en formazan, dont l'absorbance reflète la quantité de cellules métaboliquement actives en culture [25]. Une augmentation de l'absorbance de cette molécule témoigne d'une augmentation du nombre de cellules viables ou d'une activité de la chaîne mitochondriale exacerbée. À l'inverse, une diminution de l'absorbance de cette molécule peut être expliquée par une diminution de l'activité de la chaîne mitochondriale et/ou une diminution de la quantité de cellules suite à la mort cellulaire.

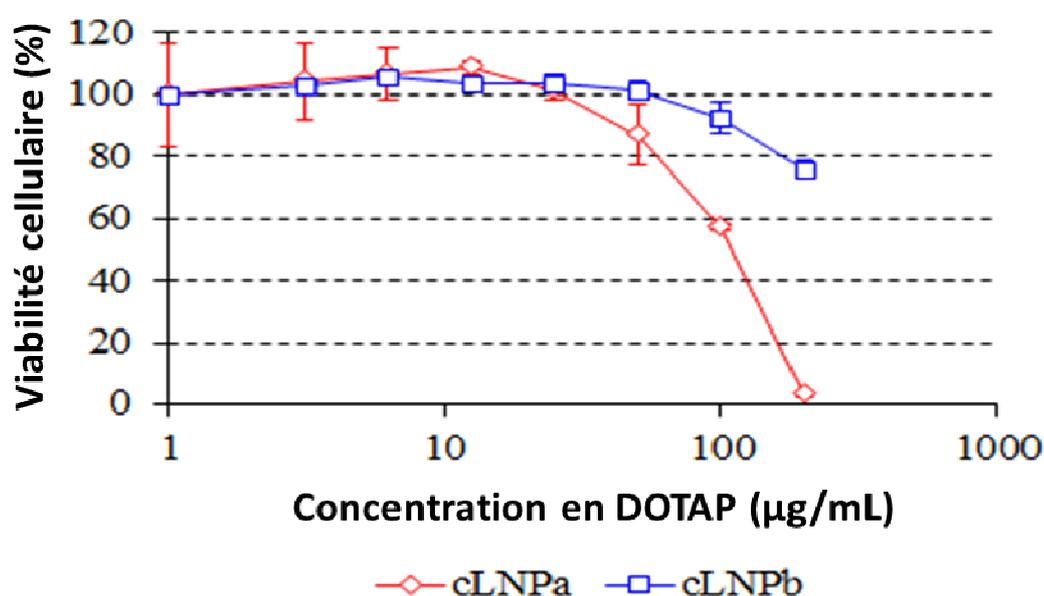


Figure V-16. Cytotoxicité des cLNP basée sur l'activité mitochondriale : les cellules PC3 sont incubées pendant 24 heures avec différentes concentrations en cLNPa (rouge) et cLNPb (bleu). Un test colorimétrique mesurant l'activité mitochondriale est permis par l'incubation de WST-1 à 10% pendant 2 à 3 heures ($n = 6$). L'absorbance est mesurée par un lecteur de microplaques Tecan.

L'absorbance du formazan est mesurée dans les cultures cellulaires ayant été incubées avec différentes concentrations en cLNP, puis le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé à partir des analyses effectuées (voir protocole page 142) (Figure V-16). Les deux formulations nanoparticulaires cLNP ne présentent aucune modification de l'activité métabolique mesurée jusqu'à une concentration en DOTAP de 25 µg/mL. Ainsi, la viabilité cellulaire des PC3 est évaluée à 100% jusqu'à cette concentration pour cLNPa (rouge) et cLNPb (bleu). Jusqu'à une concentration en DOTAP

de 50 µg/mL, cLNPa autorise une viabilité cellulaire de 86% tandis que cLN Pb ne démontre aucun signe de cytotoxicité (Figure V-16). L'IC₅₀ des cLN Pa et cLN Pb est estimé à des concentrations en DOTAP de respectivement 114 et 181 µg/mL, équivalentes à des concentrations en nanoparticules lipidiques de 394 et 1816 µg/mL.

Lorsque la comparaison s'effectue en fonction de la concentration en DOTAP, l'IC₅₀ des particules cLN Pb est environ 1,6 fois supérieur que celui des particules cLN Pa sur les cellules PC3. En comparant par rapport à la concentration lipidique totale, l'IC₅₀ est estimé 4,6 fois supérieur avec cLN Pb par rapport à cLN Pa. Cette différence s'explique par une concentration plus élevée en DOTAP dans les formulations de nanoparticule cLN Pa par rapport aux particules cLN Pb. Ainsi, pour obtenir une même concentration en lipide cationique, ou un même rapport molaire N/P, il est nécessaire d'ajouter une quantité plus élevée de nanoparticules cLN Pb.

D'après le test mesurant la viabilité cellulaire à partir de l'activité métabolique des cellules, une utilisation des cLNP est optimale pour des concentrations en DOTAP inférieures ou égales à 25 µg/mL. Néanmoins, un second test a été effectué en se basant sur l'intégrité des membranes plasmiques (voir protocole page 142). Ainsi, le lactate déshydrogénase intra-cytoplasmique (LDH) est mesuré dans le milieu extracellulaire pour établir le niveau d'intégrité de la membrane plasmique [26, 27]. Après 24 heures d'incubation des cellules PC3 en présence de différentes concentrations en cLNP, le milieu extracellulaire est prélevé pour effectuer une réaction colorimétrique quantifiant le LDH.

Comme pour le test WST-1, la mesure de l'absorbance du formazan formé témoigne de la présence de l'enzyme LDH, et ainsi de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ainsi, la cytotoxicité induite sur les cellules PC3 par 24 heures d'incubation de différentes concentrations en nanoparticules cLNP a pu être déterminée (Figure V-17). Jusqu'à une concentration en DOTAP de 25 µg/mL, cLN Pa (rouge) et cLN Pb (bleu) n'induisent pas un relargage significatif de l'enzyme LDH dans le milieu extracellulaire, ainsi la cytotoxicité reste très faible (< 5%). L'augmentation de la concentration en DOTAP contenu dans les nanoparticules entraîne alors une augmentation de la cytotoxicité induite. D'après ce test, l'IC₅₀ est estimé à une concentration en DOTAP d'environ 100 µg/mL pour les deux formulations cLNP, équivalente à une concentration en lipide total de respectivement 346 et 1006 µg/mL pour les cLN Pa et les cLN Pb.

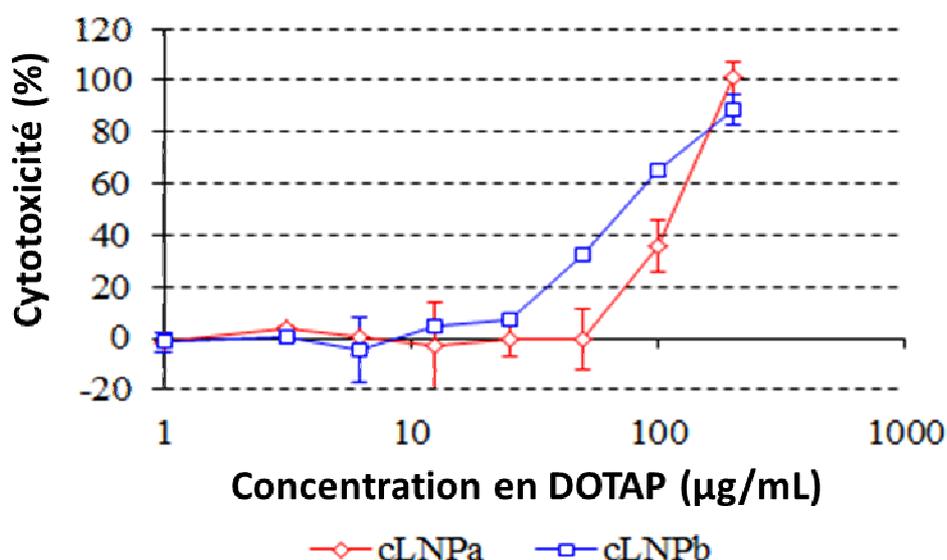


Figure V-17. Cytotoxicité des cLNP basée sur l'intégrité de la membrane : les cellules PC3 sont incubées pendant 24 heures avec différentes concentrations en cLNPa (rouge) et cLNPb (bleu). Un test colorimétrique mesurant l'intégrité des membranes plasmiques est permis par l'utilisation d'un kit quantifiant l'enzyme LDH relargué ($n = 6$). L'absorbance est mesurée par un lecteur de microplaques Tecan.

Ainsi, les deux formulations de nanoparticule cLNPa et cLNPb semble présenter un profil de cytotoxicité similaire sur les cellules PC3. Une concentration en DOTAP estimée à 25 µg/mL correspond à un rapport molaire N/P de 48/1 (pour [siARN] = 20 nM). Ces tests de viabilité cellulaire, basés sur une incubation des nanoparticules pendant 24 heures en présence des cellules, démontrent une innocuité cellulaire élevée compatible avec leur utilisation pour la transfection de siARN sur le modèle cellulaire PC3. Pour rappel, un rapport molaire N/P de 12/1 est utilisé lors des expériences de transfection fonctionnelle (pour [siARN] = 20 nM), soit une concentration quatre fois plus faible.

Ces deux premiers tests sont d'ailleurs en accord avec le contrôle visuel effectué après 24 heures d'incubation en présence des nanoparticules cationiques (Figure V-18). Sur ces photographies, la morphologie des cellules PC3 reste inchangée jusqu'à des concentrations en DOTAP de 25 µg/mL, quelle que soit la particule utilisée. Cependant, plusieurs cellules montrent des signes de souffrance pour une concentration plus élevée ([DOTAP] = 100 µg/mL) (Figure V-18).

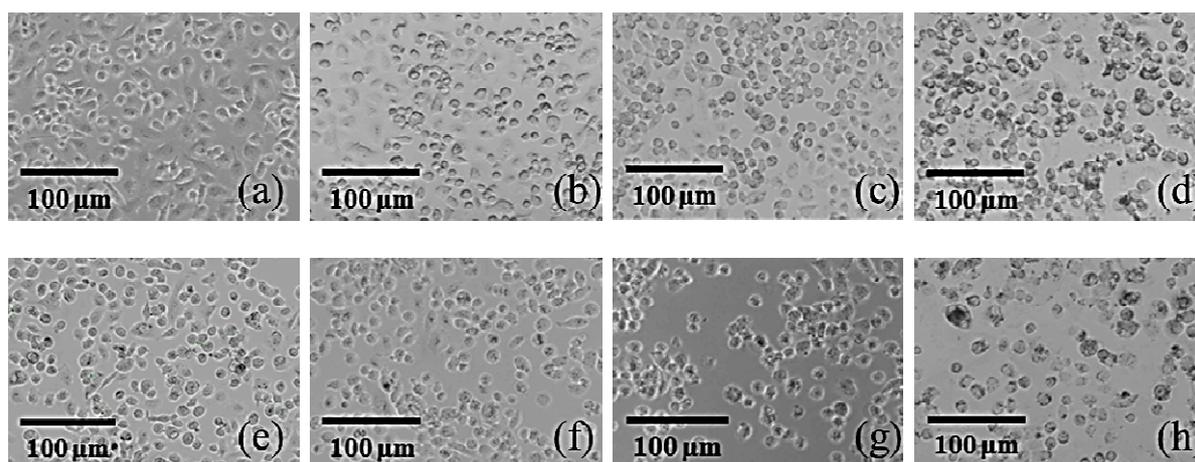


Figure V-18. Cytotoxicité des cLNP basée un contrôle visuel : (a) ; (b) ; (c) ; (d) et (e) ; (f) ; (g) ; (h) sont des photographies des cellules PC3 après incubation de cLNP à des concentrations en DOTAP de respectivement 0 ; 12,5 ; 25 et 100 µg/mL. Les quatre premières photographies concernent cLNPa tandis que les quatre dernières utilisent cLNPb. Photographies issues de microscopie en contraste de phase (10X).

Toutefois, nous avons souhaité effectué un dernier test de cytotoxicité avec une période d'incubation de 72 heures, comme c'est le cas lors de la transfection. Ce test est basé sur la faculté des cellules à former des colonies après incubation de 72 heures avec différentes concentrations en cLNP (voir protocole page 142). Jusqu'à une concentration en DOTAP de 12,5 µg/mL, le nombre de colonie formé reste identique à celui des cellules n'ayant pas incubées de nanoparticule (Figure V-19). Cependant, une augmentation de la concentration en DOTAP contenu dans les nanoparticules au-delà de cette concentration entraîne une diminution du nombre de colonie formé : dès une concentration en DOTAP de 25 µg/mL, le nombre de colonie formé est évalué 20% plus faible, démontrant une cytotoxicité modérée. À une concentration en DOTAP de 100 µg/mL, plus aucune colonie n'est visualisable dans la boîte de pétri (Figure V-19).

Ainsi, en vue de transfection avec des temps d'incubation pouvant aller jusqu'à 72 heures, une concentration inférieure ou égale à 12,5 µg/mL de DOTAP est exigée afin d'éviter tout risque de cytotoxicité sur les cellules traitées. Cette concentration correspond à un rapport molaire N/P égal à 24/1. Ainsi, le rapport molaire N/P établi précédemment à 12/1 est en accord avec les trois tests de cytotoxicité effectués sur les nanoparticules cLNP. En outre, la forte innocuité cellulaire de ces particules permet un travail dans une gamme de concentration large sans apporter de cytotoxicité.

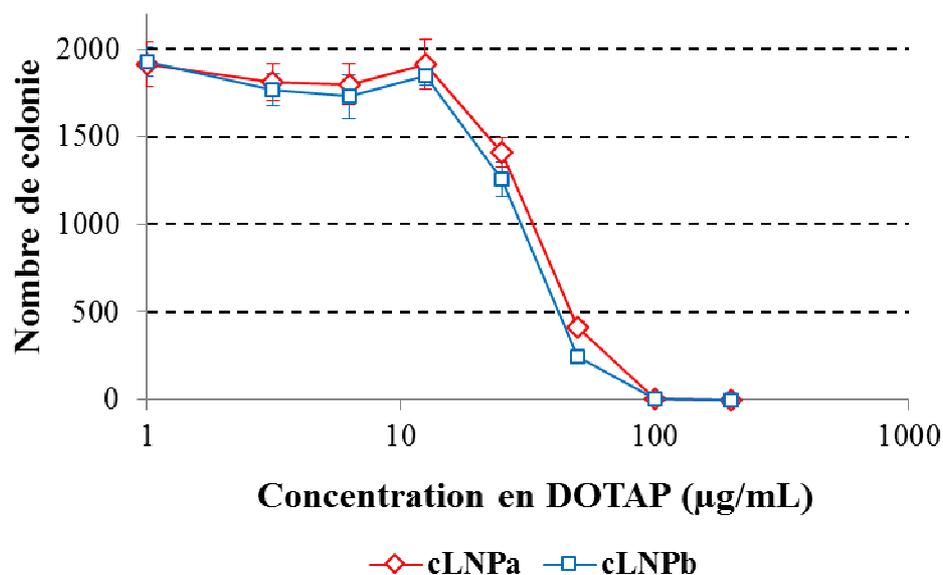


Figure V-19. Cytotoxicité des cLNP basée sur un test CFE : l'efficacité de formation des colonies cellulaires (Colony Forming Efficiency ou CFE) permet d'établir un profil de cytotoxicité des cLNPa (rouge) et cLNPb (bleu) ($n=3$).

Néanmoins, nous avons observé précédemment que les agents de transfection commerciaux pouvaient induire des variations dans le phénotype des cellules traitées, mais seulement après complexation avec des séquences d'acides nucléiques. En effet, le vecteur seul n'induisait pas de changement au niveau de l'intensité de fluorescence des cellules, alors qu'une complexation à des siARN exacerbait l'intensité de fluorescence mesurée. L'étude de la cytotoxicité des cellules PC3 semble nécessaire après incubation des complexes cLNP/siARN, en complément des tests réalisés jusqu'ici.

2.4.1.2. Cytotoxicité des complexes cLNPa/siARN

Les tests sur la viabilité cellulaire effectués sur les nanoparticules cLNP seules ont établi une concentration en DOTAP limite de 12,5 µg/mL, pour une incubation de 72 heures, à partir de laquelle des signes de cytotoxicité peuvent être mesurés. Afin d'évaluer l'innocuité de ces particules, après complexation de siARN, une transfection de siARN Allstar a été effectuée sur 72 heures au rapport molaire N/P de 24/1, correspond à une concentration en DOTAP de 12,5 µg/mL. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de CellEvent®, un marqueur de l'apoptose, avant une analyse par cytométrie en flux (Figure V-20).

Le CellEvent® est un peptide de quatre acides aminés (DEVD ou Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate) conjugué à un fluorophore se liant spécifiquement aux acides nucléiques. Le peptide correspond à un site de clivage pour les caspases 3 et 7, impliquées dans les mécanismes d'apoptose, tandis que le fluorophore reste inactif tant que sa conjugaison au peptide l'empêche de se lier à des acides nucléiques. Ainsi, dans les cellules en situation apoptotique, l'activation des caspases 3 et 7 est augmentée, provoquant le clivage du peptide contenant dans le CellEvent®. Le fluorophore une fois libre peut alors se lier à l'ADN des cellules et provoquer une émission de fluorescence à environ 530 nm. Une augmentation de la fluorescence est alors corrélée à un niveau d'apoptose des cellules traitées.

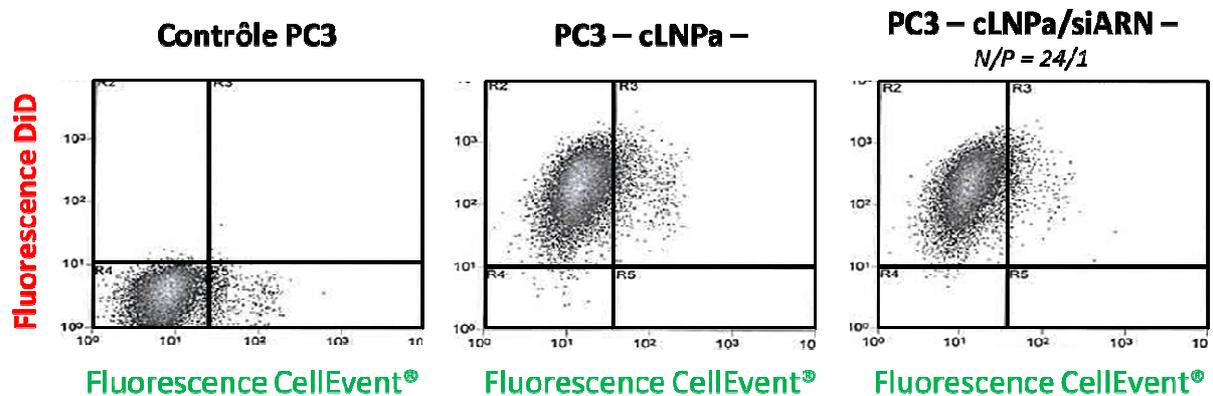


Figure V-20. Test de cytotoxicité lors de la transfection de complexes cLNPa/siARN : les cellules PC3 sont transfectées afin d'évaluer la cytotoxicité du complexe cLNPa-DiD/siARN. Un marqueur de l'apoptose, le CellEvent®, est incubé post-transfection pour établir un profil de cytotoxicité ($n=3$) ([siARN] = 20 nM – ratio N/P = 24/1 – temps de transfection = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

Les cellules PC3 incubées 72 heures avec des nanoparticules cLNPa-DiD, à une concentration en DOTAP de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ne démontrent aucune augmentation de l'intensité de fluorescence CellEvent® par rapport aux cellules non-traitées (Figure V-20). En effet, moins de 10% des cellules sont positives pour la fluorescence CellEvent® indiquant un niveau d'apoptose basal des cellules. En outre, les cLNPa testées encapsulant un fluorophore, l'augmentation de la fluorescence DiD est observée, démontrant l'interaction des nanoparticules avec les cellules (Figure V-20). Dans les mêmes conditions, les nanoparticules complexées aux siARN Allstar à un rapport molaire N/P de

24/1 n'entraînent aucune modification de l'intensité de fluorescence CellEvent®. Le nombre de cellule positive pour cette fluorescence reste inférieur à 10%, comme pour les contrôles précédents.

Complexés ou non à des courtes séquences d'acides nucléiques, les nanoparticules cLNP ne présentent donc aucune cytotoxicité sur les cellules PC3, jusqu'à une concentration en DOTAP de 12,5 µg/mL.

2.4.2. Suivi de la transfection par fluorescence

En plus d'une efficacité de transfection fonctionnelle comparable aux meilleurs agents commerciaux, les cLNP possèdent notamment l'avantage de pouvoir encapsuler des composés lipophiles tels que des molécules chimio-thérapeutiques ou des fluorophores. Cet outil autorise un suivi de la distribution des nanoparticules cLNP et ainsi, des siARN complexés à leur surface. Une sélection des cellules ayant spécifiquement internalisée ces particules est possible pour assurer une étude sur les structures ayant subies la transfection, évitant ainsi un bruit de fond apporté par les cellules non-transfectées. Une expérience de transfection a ainsi été visualisée sur 26 heures, après incubation de complexes cLNPa-DiD/siGFP (Figure V-21).

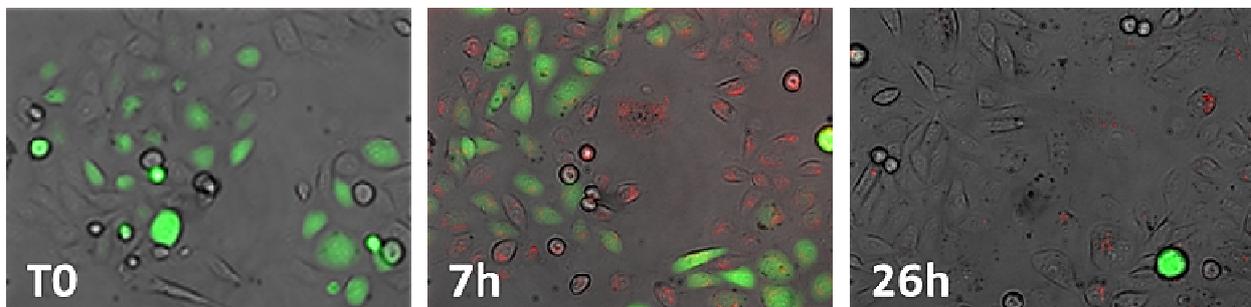


Figure V-21. Imagerie de la transfection et de l'inhibition de l'expression de la GFP : les cellules PC3-GFP sont transfectées par des siGFP complexés aux cLNPa-DiD à un rapport molaire N/P de 12/1. L'inhibition de la fluorescence GFP est suivie en épifluorescence par vidéomicroscopie (Zeiss) sur 26 heures (vert). La distribution des particules est également suivie en fluorescence (rouge). Des images ont été prises toutes les 20 minutes avec un grossissement X10. Le même champ est fixé pour chaque image.

Les images issues du suivi de la transfection en vidéomicroscopie montrent une internalisation des cLNPa qui s'accumulent dans les cellules après quelques dizaines de minutes (en rouge). Cette internalisation des cLNPa-DiD est visualisée sur la photographie prise après 7 heures

d'incubation. Cette internalisation est suivie d'une extinction majeure de la fluorescence GFP des cellules : une photographie prise après 26 heures d'incubation des complexes cLNPa-DiD/siGFP montre une absence quasi-totale de la fluorescence verte (Figure V-21).

Cette efficacité d'inhibition fonctionnelle observée après seulement 26 heures d'incubation ne concorde pas avec la cinétique effectuée précédemment. En effet, pour obtenir une efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence maximale après une analyse par cytométrie en flux, une incubation des complexes pendant 72 heures était nécessaire. La sensibilité permise par la cytométrie en flux est largement supérieure, expliquant cette différence importante. C'est pourquoi, en parallèle, nous avons souhaité analyser les efficacités d'inhibition fonctionnelle, suite à la transfection de siGFP avec des particules cLNPa contenant un fluorophore, par cytométrie en flux. Cette démarche est effectuée dans le but de vérifier l'internalisation d'un fluorophore n'influe pas sur l'efficacité d'inhibition fonctionnelle (Figure V-22).

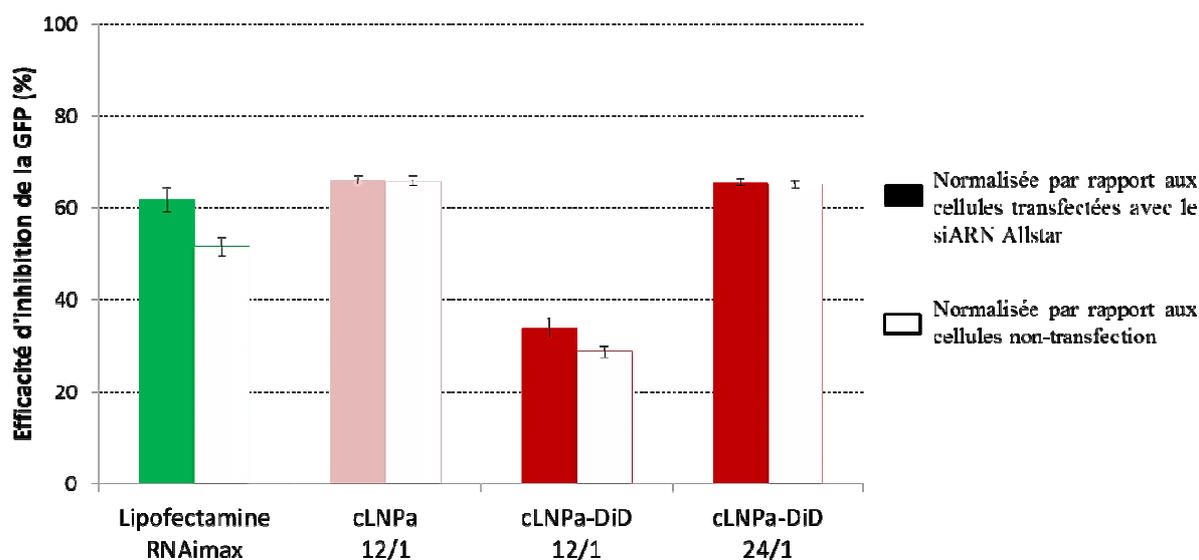


Figure V-22. Efficacité de transfection fonctionnelle avec des particules fluorescentes : les cellules PC3-GFP sont transfectées avec des particules cLNPa, contenant ou non un fluorophore, à différents ratios N/P ($n=3$) ([siARN] = 20 nM – temps de transfection = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII – canal FITC).

De façon surprenante, pour un même rapport molaire N/P établi à 12/1, les particules cLNPa contenant des fluorophores de type DiD entraînent des résultats différents des particules cLNPa sans fluorophore. En effet, après transfection de siGFP avec ces deux vecteurs, alors que

l'inhibition de l'intensité de fluorescence mesurée est d'environ 66% pour les particules cLNPa sans fluorophore, elle n'est que de 34% avec les nanoparticules contenant un fluorophore (Figure V-22). Par ailleurs, pour récupérer une efficacité d'inhibition fonctionnelle optimale, il est nécessaire d'augmenter le rapport molaire N/P jusqu'à 24/1. En outre, toutes les transfections effectuées avec cLNPa, avec ou sans DiD, ne démontrent pas d'exacerbation de l'intensité de fluorescence comme c'est le cas pour la Lipofectamine RNAimax. Comme précédemment, les vecteurs cLNPa, contenant ou non du DiD, représentent ainsi des outils intéressants et plus adéquats que la Lipofectamine RNAimax pour des études s'appuyant sur la fluorescence.

Malgré une adaptation du rapport molaire N/P pour avoir une inhibition fonctionnelle optimale après transfection des siGFP médiés par cLNPa-DiD, une question s'impose : d'où vient cette différence majeure entre les formulations cLNPa contenant ou non des fluorophores ? Une première hypothèse serait une différence d'internalisation des siARN induits par ces deux particules ; des cellules PC3 ont été transfectées des siARN pendant deux heures avec ces deux types de particules (Figure V-23).

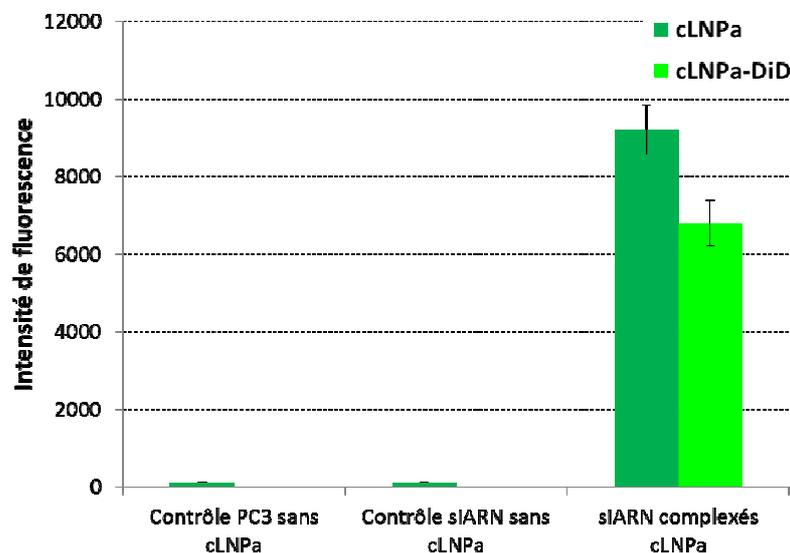


Figure V-23. Efficacité de transfection avec des particules fluorescentes : les cellules PC3-GFP sont transfectées 2 heures avec des siARN-Alexa488 complexés avec des particules cLNPa, contenant ou non un fluorophore (n=3) ([siARN] = 20 nM – temps de transfection = 2 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSR II – canal FITC).

Après transfection de siARN-Alexa488, les cellules PC3 montrent une intensité de fluorescence 26% plus faible quand les particules cLNPa contiennent du DiD par rapport à des particules sans fluorophore. Ainsi, une différence entre ces particules est visible dès l'étape d'internalisation dans les cellules. Pour expliquer cette différence, nous proposons l'hypothèse d'une modification dans la structure intra-particulaire induit par l'incorporation des molécules lipophiles. Tabatt *et al.* ont en effet démontré que l'efficacité de transfection pouvait être directement liée à l'interaction entre le cœur et la couronne de la particule [19]. Dès lors, l'encapsulation d'une molécule dans le cœur semi-cristallin de ces NLC peut modifier son environnement intra-particulaire, affectant l'association possible avec les siARN ou avec les cellules. En effet, la densité modifiée avec l'incorporation de molécules lipophiles peut notamment diminuer ou ralentir l'interaction des particules avec les membranes cellulaires. Cependant, cette étude ayant été effectuée sur seulement deux heures d'incubation, l'internalisation des siARN était peut être seulement plus lente, n'induisant pas forcément une différence sur l'inhibition fonctionnelle après 72 heures.

Pour expliquer la diminution d'efficacité d'inhibition, d'autres hypothèses peuvent être formulées. La densification de la structure nanoparticulaire peut avoir un impact au niveau de l'échappement endosomal ou du relargage des siARN. Nous avons précédemment émis l'hypothèse que l'encapsulation de fluorophore dans le cœur de la particule pouvait entraîner une diminution de l'interaction des vecteurs avec la membrane plasmique des cellules. Dans le même principe, l'interaction avec la membrane de l'endosome pourrait être diminuée, affectant alors les mécanismes responsables de l'échappement endosomal, et ainsi la libération des complexes dans le compartiment cytoplasmique. Pour explorer cette piste, des expériences de co-localisation avec un marquage des siARN, des endosomes et des lysosomes sont prévues. En outre, l'utilisation de particules cLNPa contenant du DiD ou non permettra de mettre en évidence une différence potentielle dans la distribution intracellulaire des siARN, suivant le vecteur choisi.

Une autre hypothèse pourrait être un changement de l'interaction entre la particule et le siARN dû à la modification de l'environnement intra-particulaire des nanovecteurs, notamment par une augmentation de la rétention des séquences d'acides nucléiques sur cLNPa-DiD. Ainsi, le relargage des siARN dans le compartiment cytoplasmique serait affecté en conséquence. Afin de tester cette idée, une étude peut être réalisée sur le relargage des siARN en fonction du pH imposé, après complexation avec les deux types de formulation cLNPa. Des expériences de FRET peuvent également être réalisées avec des particules et des siARN fluorescents.

En conclusion, la transfection des siARN peut être suivie par la fluorescence des nanoparticules auxquelles ils sont complexés, notamment à partir d'un rapport molaire N/P égal à 24/1 où l'efficacité d'inhibition fonctionnelle est la plus élevée sur le modèle PC3-GFP. Ce rapport correspondant à une concentration en DOTAP de 12,5 µg/mL, les nanoparticules n'entraînent alors aucun signe de cytotoxicité, d'après les expériences effectuées au cours de ce chapitre.

3. Vers une utilisation générique des nanoparticules cLNP

3.1. Inhibition fonctionnelle sur un autre modèle cellulaire

La plupart des validations *in vitro* au cours de ce chapitre ont été effectuées sur un modèle cellulaire PC3-GFP. Avec la volonté de formuler des nanovecteurs génériques, il est indispensable de valider l'efficacité d'inhibition fonctionnelle sur d'autres modèles cellulaires. Ainsi, un modèle cellulaire Hela sur-exprimant la protéine GFP a été développé dans nos laboratoires (voir protocole page 140). Sur le même principe que pour le modèle PC3-GFP, l'inhibition fonctionnelle peut être observée avec la diminution de l'intensité de fluorescence suite à la transfection de siGFP (Figure V-24).

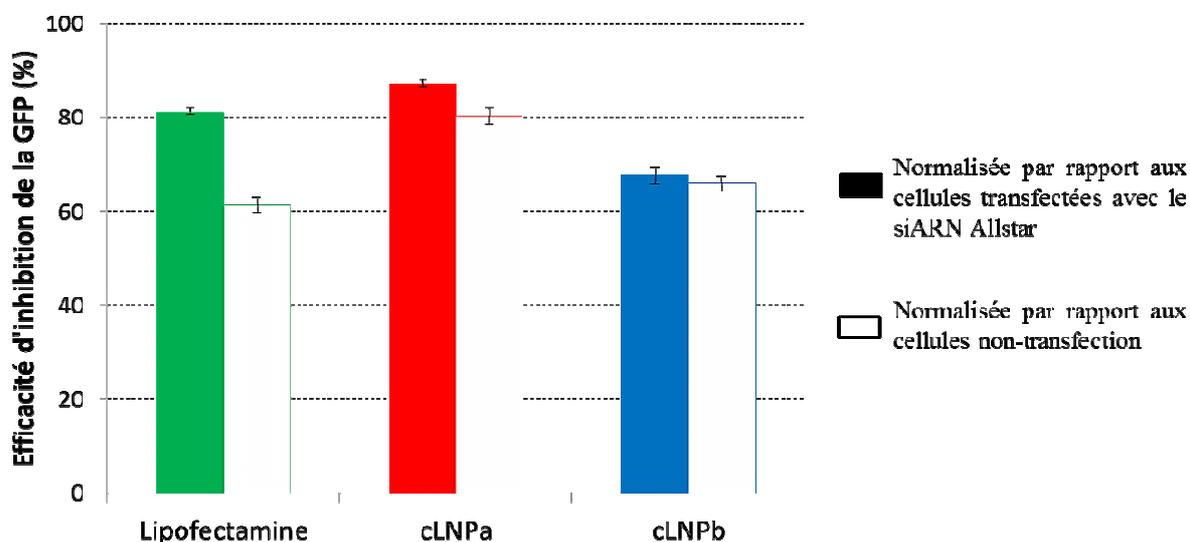


Figure V-24. Transfection fonctionnelle sur des cellules Hela-GFP : les cellules Hela-GFP sont transfectées avec des siGFP complexés à la Lipofectamine RNAimax, cLNPa ou cLNPb (n=6) ([siARN] = 20 nM – N/P = 12/1 – temps d'incubation = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ cellules (FACS BD LSRII).

Un profil d'inhibition fonctionnelle similaire est observé avec les cellules Hela-GFP par rapport au modèle PC3-GFP. En effet, l'inhibition de l'intensité de fluorescence est diminuée de 87% après transfection de siGFP avec les nanovecteurs cLNPa. Cette efficacité d'inhibition est au moins du même ordre que celle obtenue avec la Lipofectamine RNAimax, l'un des meilleurs agents de transfection commercialement disponible ($\approx 81\%$). Comme observé précédemment, la transfection de siGFP avec les cLNPa provoque une diminution de l'intensité de fluorescence 19,6% moins élevée par rapport à l'utilisation de cLNPa.

Par ailleurs, le même phénomène est observé concernant l'exacerbation de l'intensité de fluorescence avec les lipoplexes commerciaux : de cette façon, l'inhibition de l'intensité de fluorescence après normalisation avec les cellules non-transfectées est 20% plus faible. Sur ce modèle cellulaire sur-exprimant la protéine GFP, le lipoplexe commercial semble induire le même impact que celui décrit sur les cellules PC3-GFP.

En conclusion, les nanoparticules lipidiques cLNP, en particulier cLNPa, maintiennent une efficacité de transfection fonctionnelle sur un autre modèle cellulaire. En outre, ce résultat démontre le caractère compétitif des vecteurs cLNP par rapport à un agent de transfection commercial reconnu pour son efficacité. Néanmoins, des validations *in vitro* complémentaires sont prévues, et détaillées dans le chapitre VI, sur des modèles cellulaires et/ou des structures reconnus comme étant difficiles à transfecter.

3.2. Transfection de différentes séquences d'acides nucléiques

Les validations effectuées au cours de ce chapitre ont principalement utilisées des siGFP, afin d'inhiber l'expression de la protéine GFP surexprimée dans les modèles cellulaires PC3 et Hela. Toutes les courtes séquences d'ARN interférents exigent un vecteur pour une délivrance cytoplasmique *in vitro* [18], notamment pour traverser la membrane plasmique. Les structures étant proches en termes de poids moléculaire et de charge négative, les résultats positifs pour la transfection d'un siARN fonctionnel est encourageant pour la validation des autres séquences d'acides nucléiques de même taille. Pour assurer une utilisation générique, nous avons néanmoins testé un autre siARN, ainsi qu'un mimic de miARN.

Pour l'étude d'un autre type de siARN, des cellules PC3 ont été transfectées par un mélange de siARN ciblant les gènes exprimés de manière ubiquitaire et essentiels pour la survie des cellules, le siARN Cell Death (Figure V-25). L'internalisation des particules cLNPa-DiD est visualisée par cytométrie en flux : la majorité des cellules étant positives pour la fluorescence DiD ($> 95\%$),

l'internalisation des complexes cLNPa/siARN peut être validé. D'autre part, l'efficacité de la délivrance des siARN fonctionnel est visible par le déclenchement du mécanisme d'apoptose dans les cellules traitées. Pour quantifier les niveaux d'apoptose, le marqueur CellEvent® a de nouveau été utilisé en tant que marqueur des caspases 3 et 7. Les cellules PC3 transfectées avec des nanoparticules cLNPa-DiD complexées aux siARN Allstar ne démontrent qu'un niveau basal d'apoptose (< 10%) (Figure V-25). En revanche, la transfection de siARN Cell Death, responsable du déclenchement des mécanismes d'apoptose, complexés dans un rapport molaire N/P de 24/1 avec les cLNPa-DiD provoquent d'importantes modifications au niveau du phénotype. En effet, les niveaux d'apoptose quantifiés avec le CellEvent® démontrent que 98% des cellules sont positives, contenant donc des taux élevés de caspase 3 et 7. Ainsi, ces cellules présentent un phénotype de mort cellulaire programmée, validant la délivrance de siARN fonctionnels dans le compartiment cytoplasmique.

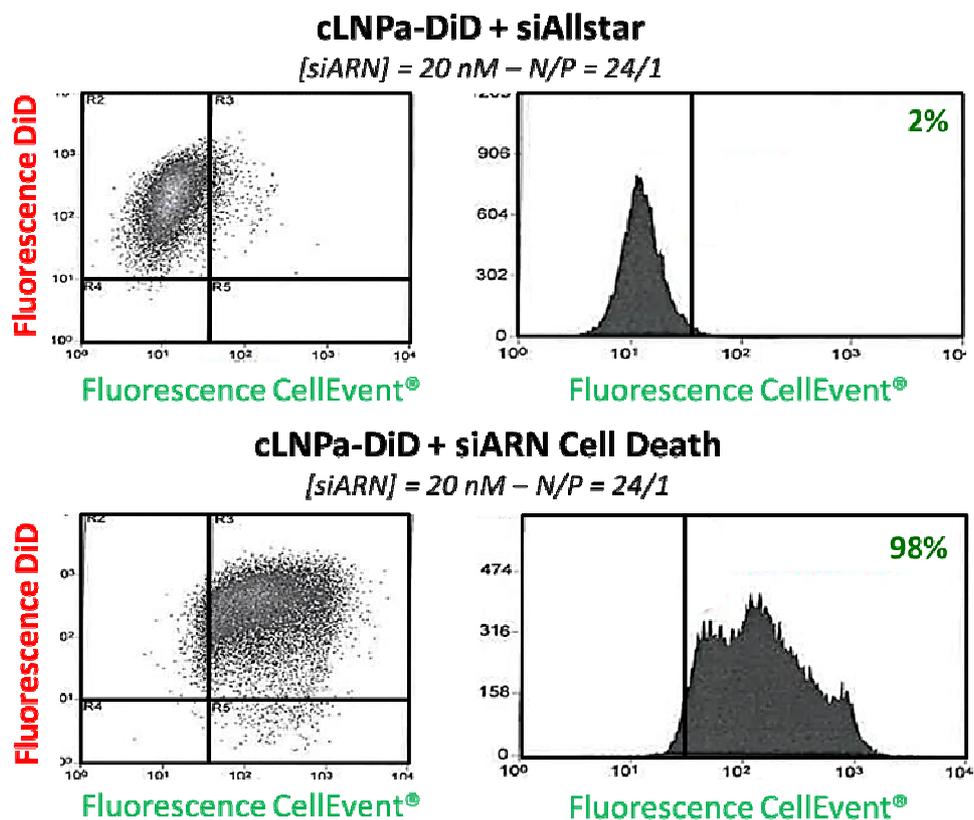


Figure V-25. Transfection de siARN provoquant l'apoptose : les cellules PC3 sont transfectées avec cLNPa-DiD afin d'évaluer l'efficacité de délivrance de siARN CellDeath (Qiagen). Le niveau d'induction de l'apoptose est révélé par un marquage CellEvent® (n=6) ([siARN] = 20 nM – N/P = 24/1 – temps d'incubation = 48 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ cellules (FACS BD LSRII).

Un autre type d'ARN interférent a été testé en transfection : des mimics de miARN (Figure V-26). Ces séquences d'acides nucléiques, décrit au cours du chapitre I, induisent une inhibition post-transcriptionnelle suite à une prise en charge par le complexe RISC. Cependant, à la différence des siARN, l'appariement avec l'ARNm ciblé est majoritairement imparfait. Néanmoins, l'induction d'une inhibition post-transcriptionnelle démontre les mêmes exigences que pour les siARN, à savoir une délivrance intra-cytoplasmique de ces séquences d'acides aminés.

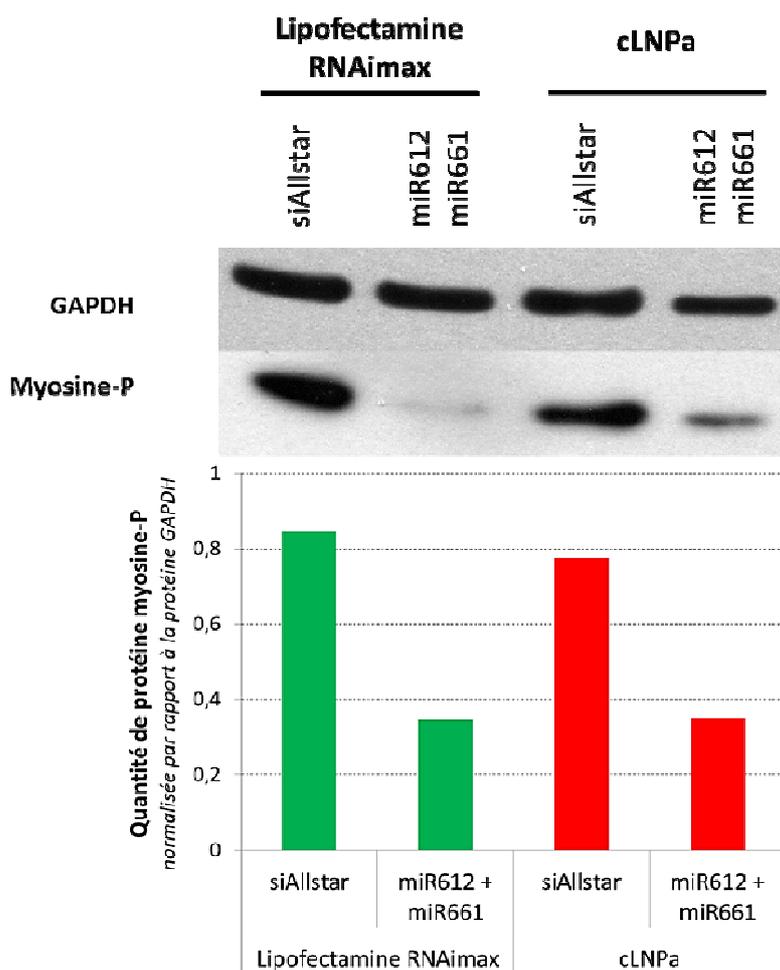


Figure V-26. Transfection fonctionnelle de mimics de miARN ciblant la myosine phosphorylée : les cellules PC3 sont transfectées avec cLNPa afin d'évaluer l'efficacité de délivrance de mimics de miARN. Une immuno-détection par immuno-empreinte permet l'analyse de la quantité de protéine post-transfection (n=1) ([mimics de miARN] = 20 nM – N/P = 12/1 – temps d'incubation = 48 heures).

Après une transfection de 48 heures avec des mimics de miARN impactant la cascade qui conduit à la phosphorylation de la myosine, une immuno-détection de cette protéine par immuno-

empreinte autorise une évaluation de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle. Les quantités protéiques ont été normalisées par rapport à la quantité de protéine de ménage GAPDH, non affectée par cette transfection (Figure V-28). Par rapport aux cellules transfectées avec le siARN Allstar, la réduction de la quantité de protéine myosine phosphorylée est évaluée à 55% après transfection des mimics de miARN avec cLNPa. Dans les mêmes conditions, l'agent de transfection commercial Lipofectamine RNAimax provoque une inhibition de 59% des quantités de la protéine dont l'ARNm a été ciblé (Figure V-26).

Ces efficacités d'inhibition fonctionnelle comparable à cet agent commercial tendent à prouver que les nanoparticules cLNP peuvent être utilisées pour la transfection de plusieurs types de séquences d'acides nucléiques capables d'induire le mécanisme d'ARNi.

3.3. Vers des applications de type criblage à haut-débit

Les nanoparticules cLNP ont démontré une efficacité élevée pour l'inhibition fonctionnelle d'un gène ciblé. Cependant, pour des applications telles que le criblage à haut-débit, certaines propriétés supplémentaires sont recommandées pour permettre une reproductibilité des essais, ainsi qu'un maintien des conditions identiques entre tous les complexes testés. En effet, du criblage à haut-débit peut permettre l'étude en parallèle de milliers de siARN différents lors de transfection sur des plaques 384 puits notamment. Avec des temps de préparation pouvant être longs, les complexes peuvent être amenés à rester longtemps dans les milieux biologiques. Pour permettre le maintien des mêmes conditions dans tous les puits, et dans toutes les plaques, tous les complexes vecteurs/siARN doivent être préparés au même moment, ou la rétention des siARN sur les vecteurs doit être élevée et identique entre tous les complexes. En outre, pour la reproductibilité des transfections effectuées, il est également nécessaire de démontrer des conditions stables et comparables entre les échantillons.

Le criblage à haut-débit pour être effectué de la façon suivante en transfection directe : les complexes vecteurs/siARN sont préparés simultanément pour plusieurs plaques 384 puits lors d'une première étape. Puis ces complexes sont ajoutés aux cellules de façon automatisée, avec un robot, lors d'une seconde étape. Or, d'après le protocole proposé par le fournisseur, la complexation de siARN avec le vecteur lipidique commercial de type Lipofectamine RNAimax exige des temps d'incubation précis. Pour former un complexe, les siARN et les vecteurs sont incubés indépendamment dans un milieu OptiMEM optimisé pour la transfection pendant 10 minutes. Puis après un mélange des deux solutions, un temps d'incubation de 15 à 20 minutes est nécessaire pour stabiliser le complexe avant transfection. D'après les expériences effectuées dans le chapitre IV, un

temps d'incubation trop long peut être corrélé à un relargage des siARN élevé. Ainsi, le respect des temps de complexation peut induire un décalage lors de la préparation des différentes plaques 384 puits, limitant alors les débits de transfection. L'un des objectifs proposés lors de la formulation des nanoparticules cLNP consiste en une complexation simple, rapide et autorisant une rétention de longue durée pour favoriser le maintien des conditions entre les différents essais. Cette stratégie serait alors en adéquation avec les exigences induites par une application de type criblage à haut-débit.

En ce sens, des complexes vecteurs/siARN ont été effectués, puis incubés durant différentes périodes jusqu'à 6 heures, avant d'être déposés sur les cellules pour l'étape de transfection. Ces différents temps d'incubation entre la complexation et la transfection ont été imposés pour vérifier l'impact de temps de préparation trop long sur l'efficacité d'inhibition fonctionnelle (Figure V-27).

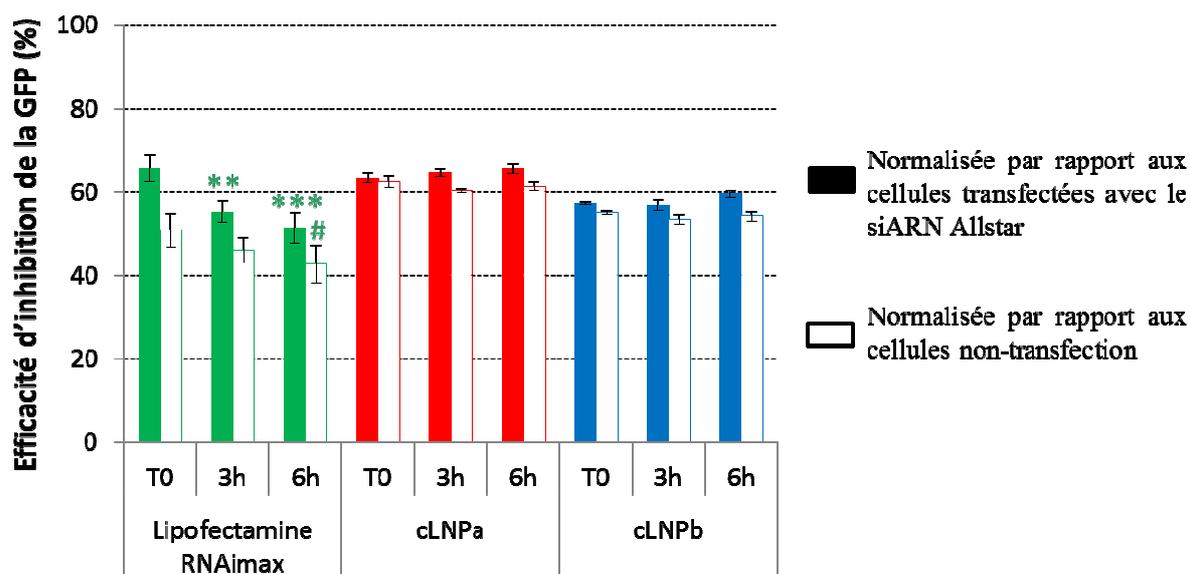


Figure V-27. Transfection de siARN après différents temps de complexation : les complexes vecteurs/siARN sont incubés pendant différents temps (T0, 3h, 6h) pré-transfection afin d'évaluer l'influence de la stabilité des complexes sur l'inhibition fonctionnelle sur des cellules PC3-GFP (n=9) (siARN = 20 nM – N/P = 12/1 – temps d'incubation = 72 heures) (***) : $p < 0,001$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec la Lipofectamine transfectée à T0, normalisée avec le contrôle siAllstar ; ** : $p < 0,01$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec la Lipofectamine transfectée à T0, normalisée avec le contrôle siAllstar ; # : $p < 0,05$ par rapport à l'efficacité d'inhibition avec la Lipofectamine transfectée à T0, normalisée avec les cellules non transfectées). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 cellules (FACS BD LSRII). Tests statistiques réalisés par ANOVA-2.

Avec l'agent de transfection commercial, la Lipofectamine RNAimax, des temps d'incubation longs entre la complexation et la transfection influence l'efficacité d'inhibition fonctionnelle. En effet, plus ce temps d'incubation est long, plus l'inhibition de l'intensité de la fluorescence diminue sur les cellules PC3-GFP (Figure V-27). Alors qu'une transfection immédiate après la complexation permet une efficacité d'inhibition de 65%, une incubation de 3 heures avant transfection diminue de manière significative cette efficacité de 10% ($p < 0,01$). Après 6 heures d'incubation, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle est diminuée significativement de 14% ($p < 0,001$) par rapport à une transfection immédiate après complexation.

Au contraire, l'utilisation de cLNPa ou cLNPb comme vecteur de siARN autorise un maintien de l'efficacité de transfection. Avec cLNPa, la délivrance de siGFP fonctionnelle permet une inhibition de l'intensité de fluorescence de 64 à 66% malgré des temps d'incubation allant jusqu'à 6 heures entre la complexation et la transfection. De même, l'utilisation de cLNPb pour la transfection de siGFP permet des inhibitions de l'intensité de fluorescence entre 57 et 59% dans les mêmes conditions.

Les vecteurs cLNP semblent plus propices à une utilisation dans des applications telles que le criblage haut-débit, étudiant des milliers de siARN en parallèle et exigeant des conditions particulières pour un maintien des conditions entre chacun des échantillons, notamment avec la forte rétention des siARN qu'ils permettent dans les milieux de culture.

4. Discussion

Les efficacités d'inhibition fonctionnelle évaluées au cours de cette étude ont été comparées aux agents de transfection commerciaux les plus couramment utilisés en laboratoire pour des applications *in vitro*. Nous avons pu démontrer que cLNPa se positionnait parmi les plus efficaces de ces vecteurs. Néanmoins, ces agents de transfection sont essentiellement des lipoplexes instables (Figure V-15). Une comparaison peut alors être effectuée par rapport à des structures plus proches des cLNP, à savoir des nanoparticules solides lipidiques de type NLC présentant des charges cationiques de surface. Yu *et al.* ont utilisé ce type de structure pour la délivrance simultanée de siARN et de molécules anticancéreuses lipophiles [28]. Lors de cette étude, une validation de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle sur des cellules dérivées d'un carcinome épithélial humain KB a été effectuée. L'inhibition de la quantité d'ARNm du gène MCL1 ciblée a été estimée à environ 50% après transfection de siARN avec cette formulation nanoparticulaire cationique d'environ 150 nm, après complexation à un rapport molaire N/P de 8/1 [28]. D'autres travaux rapportés par Taratula *et al.*

démontrent également l'utilisation de nanoparticules de type NLC, possédant des charges de surface cationiques pour la complexation et la transfection de siARN [29]. Ainsi, en transfectant des cellules du cancer du poumon A549 pendant 24 heures, cette équipe a démontré une inhibition simultanée de l'expression des gènes MRP1 et BCL2 ciblés : alors que la transfection des siMRP1 avec ces nanoparticules induit une inhibition de 41% du gène ciblé, la transfection de siBCL2 entraîne une réduction de la quantité d'ARNm codant BCL2 de 98% [29]. Cependant, chacun des deux siARN est utilisé à une concentration finale de 500 nM, soit 25 fois supérieure aux concentrations testées dans notre étude. Il apparaît que, malgré les avantages qu'elles apportent, les nanoparticules cationiques NLC rapportées de la littérature semblent démontrer des efficacités variables, ou nécessiter de fortes concentrations en siARN. Ainsi, les nanoparticules cLNP développées au cours de notre étude apparaissent être un outil intéressant pour la transfection de siARN. Néanmoins, au regard des variabilités d'inhibition démontrées par les nanovecteurs de Taratula *et al.* suivant le gène ciblé [29], il semble nécessaire d'avoir une étude comparative des nanoparticules cLNP dans les mêmes conditions pour un positionnement plus précis. À notre connaissance, les cLNPa développés dans cette étude de thèse démontrent l'une des plus fortes efficacités reportées *in vitro*, en particulier sur le modèle cellulaire PC3-GFP pour des concentrations en siARN de 20 nM.

Une information intéressante a été mise en évidence au cours de notre étude : malgré une complexation incomplète, ainsi qu'une faible rétention dans le milieu de culture utilisé lors de la transfection, la Lipofectamine RNAimax démontre des efficacités d'inhibition fonctionnelle élevées. En effet, une incubation de 6 heures dans un milieu de culture supplémenté par du sérum de veau foetal provoque un relargage massif des siARN complexés à la Lipofectamine RNAimax (> 90%). Malgré ce paramètre, l'inhibition fonctionnelle induit lors de la transfection est évaluée à plus de 50%. Deux hypothèses peuvent être formulées à partir de cette observation : soit la transfection d'une faible concentration de siARN fonctionnels dans le cytoplasme est suffisante pour une inhibition élevée, soit les complexes entre la Lipofectamine RNAimax et les siARN présentent des interactions dynamiques avec une balance « relargage/récupération » suffisamment élevée pour induire une inhibition fonctionnelle importante. L'expérience effectuée sur la diminution des concentrations en siARN, pour une même concentration en Lipofectamine RNAimax (Figure V-11), tend à aller vers la première hypothèse. En effet, une diminution forte des concentrations en siARN jusqu'à 100 pM n'impactant pas l'efficacité d'inhibition fonctionnelle, il peut être imaginé que le faible pourcentage retenu sur le vecteur après l'incubation est suffisant pour provoquer un mécanisme d'ARNi de façon efficace. Cependant, dans leur étude, Yu *et al.* ont démontré une variation de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle mesurée lors de 24 heures de transfection de siARN

chez des cellules SK-HEP-1 exprimant de façon stable la luciférase [30]. En effet, l'utilisation de la Lipofectamine 2000 pour transférer des siARN inhibant cette luciférase de façon post-transcriptionnelle autorise une efficacité mesurée à 62%, pour une concentration en siARN de 100 nM. En revanche, en diminuant la concentration de siARN à 20 nM, pour une même concentration en Lipofectamine 2000, cette équipe a observé une diminution de 17% de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle mesurée [30], réfutant ainsi la première hypothèse formulée. L'hypothèse établissant une interaction dynamique entre le liposome cationique et le siARN semble être la plus probante au regard de l'état de l'art.

En outre, Inoh *et al.* ont démontré que pour un rapport liposome cationique/siARN constant, c'est-à-dire avec une concentration en vecteur diminuant avec la concentration en siARN, la réduction des taux de siARN de 130 nM à 40 nM était responsable d'une diminution de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle de 65% à 20% [31]. Les mêmes observations ont été rapportées concernant l'utilisation des nanovecteurs cLNP pour la transfection de siARN (Figure V-10). Ainsi, tout comme la Lipofectamine RNAimax, un maintien des concentrations en vecteur cLNPa peut permettre une diminution de la concentration en siARN sans altérer l'efficacité d'inhibition fonctionnelle.

La cytotoxicité est également une information primordiale lors de la formulation de nanovecteurs. En effet, toute influence sur le phénotype des cellules traitées issue des nanoparticules, indépendamment de l'action inhibitrice des siARN, peut nuire à l'interprétation et à la compréhension des résultats obtenus. En particulier, lorsque les phénotypes étudiés correspondent à des états de mortalité cellulaire, la transfection de siARN exige une innocuité élevée des vecteurs utilisés. La cytotoxicité des nanoparticules cLNP peut être comparée par rapport à celle d'autres nanovecteurs du même type. Ainsi, les vecteurs cationiques cSLN développés par Kong *et al.* ont été étudiés par rapport à la cytotoxicité induite sur les cellules HepG2, par un test mesurant leur activité mitochondriale [9]. L'IC₅₀ de ces vecteurs a été déterminé à une concentration en nanoparticule de 333,5 µg/mL sur ce modèle cellulaire [9]. Pour rappel, L'IC₅₀ des cLNPa et cLNPb est estimé à des concentrations en DOTAP de respectivement 114 et 181 µg/mL, équivalentes à des concentrations en nanoparticules lipidiques de 394 et 1816 µg/mL. En outre, les vecteurs développés par Kong *et al.* sont utilisés à des concentrations de 72 µg/mL. Or, à cette concentration nanoparticulaire, les tests de cytotoxicité déterminent une mortalité cellulaire d'environ 16% [9]. Kim *et al.* démontrent d'ailleurs un profil de cytotoxicité équivalent sur les cellules MDAMB435, avec une mortalité cellulaire d'environ 20% à une concentration en nanoparticules de 72 µg/mL [32]. Au contraire, à leur concentration d'utilisation, les nanoparticules cLNP ne démontrent aucun signe de

cytotoxicité sur le modèle cellulaire PC3, quel que soit le test effectué. Les nanoparticules développées au cours de notre étude peuvent donc présenter un caractère intéressant en termes d'innocuité comparé à d'autres particules semblables dont l'utilisation a été rapportée dans la littérature. Néanmoins, des tests de cytotoxicité complémentaires sont nécessaires sur des modèles cellulaires identiques afin de permettre une étude comparative plus précise.

Cette caractéristique peut également être comparée par rapport aux liposomes cationiques, notamment à ceux disponibles commercialement. Au cours de leur étude, Inoh *et al.* ont pu évaluer la cytotoxicité induite par la Lipofectamine RNAimax sur les cellules B16/BL6 [31]. L'augmentation de la concentration de ce liposome cationique instable provoque une augmentation de la mortalité cellulaire : alors qu'une concentration du vecteur de 0,33 µg/mL induit une mortalité de seulement 2,4%, une utilisation à 2 µg/mL induit jusqu'à 32,3% de mortalité cellulaire [30]. Pour leur étude, une concentration de 0,67 µg/mL est choisie, corrélée à une mortalité cellulaire de 12% environ [31]. Cette équipe a apporté des modifications à ce type de liposome cationique, par l'ajout de bio-surfactant lipidique mannosylerythritol (ou MEL-A), autorisant ainsi une augmentation de la viabilité cellulaire d'environ 13% pour une concentration de 2 µg/mL, la mortalité cellulaire n'était alors que de 19% [31].

Nous avons pu observer au cours de ce chapitre une influence des agents de transfection commerciaux sur l'auto-fluorescence des cellules sur-exprimant la protéine GFP. En effet, une exacerbation de l'intensité de fluorescence était mesurée lors de l'utilisation des liposomes cationiques commerciaux, le vecteur N-ter peptidique ne démontrant aucune variation à ce niveau-là. Plus particulièrement, c'est l'association des liposomes cationiques avec les séquences de siARN, formant alors des lipoplexes, qui induirait ce phénomène ; les vecteurs seuls n'altérant pas le phénotype des cellules étudiées. Nguyen *et al.* ont clairement indiqué qu'une synergie existait entre le lipide cationique et des séquences d'acides nucléiques, provoquant une cytotoxicité [33]. En effet, cette équipe a constaté que le lipide cationique seul, la Lipofectamine 2000, n'induit qu'une faible cytotoxicité tandis que l'incubation de séquences d'acides nucléiques seules n'impactent pas la viabilité cellulaire. Au contraire, les lipoplexes formés à partir de ces deux éléments provoquent une cytotoxicité significative sur des cellules Hela, B16BL6 et RGC-6 [33]. En outre, la mortalité cellulaire est accrue lorsque la teneur en lipide cationique dans le lipoplexe est augmentée [33]. Les facteurs pouvant influencer la cytotoxicité des lipoplexes comprennent le potentiel zêta, la durée d'incubation, mais aussi le type de cellule transfectée et la densité cellulaire [34, 35]. En outre, la cytotoxicité induite par les lipoplexes peut dépendre de la nature des agrégats formés [36]. Par exemple, le même vecteur a démontré une cytotoxicité sensiblement réduite quand il se présente sous forme vésiculaire, par opposition à une solution micellaire [37]. Ainsi, nous avons émis une

hypothèse, concernant la modification du phénotype des cellules PC3-GFP et Hela-GFP, selon laquelle l'interaction des agents de transfection commerciaux avec des séquences d'acides nucléiques modifie leur structure : d'abord sous forme de vésicules instables, les charges anioniques des siARN induisent une conformation micellaire de ces vecteurs. La cytotoxicité provoquée par ces lipoplexes sur les cellules s'en trouvent augmentée, impactant alors le phénotype des cellules traitées. Néanmoins, à notre connaissance, les mécanismes liant une cytotoxicité accrue à une exacerbation de l'intensité de fluorescence, sur des modèles cellules sur-exprimant la protéine GFP, restent inconnus ou mal décrits.

5. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de démontrer l'efficacité de transfection de siARN induite par l'utilisation de nanoparticule cLNP. En outre, la délivrance cytoplasmique de ces ARN interférents fonctionnels devait provoquer une inhibition fonctionnelle du gène ciblé.

La distribution des nanovecteurs cLNP a été visualisée suite à l'encapsulation de fluorophore lipophile dans le cœur des particules, tandis que les siARN peuvent être suivis suite à un marquage par de l'Alexa488. Les tests de transfection effectués ont démontré une internalisation rapide des siARN dans les cellules, après seulement 30 minutes d'incubation après complexation avec cLNPa. L'internalisation semble d'ailleurs emprunter des voies d'endocytoses essentiellement dépendantes des clathrines en surface des cellules. Cette entrée par une vésicule endosomale exige un échappement afin d'accéder au compartiment cytoplasmique et déclencher le mécanisme d'ARNi.

L'efficacité d'inhibition fonctionnelle induite par la transfection de siARN avec des nanovecteurs cLNP démontre l'accessibilité du cytoplasme exigée. En effet, après complexation des siARN à un rapport molaire N/P établi à 12/1, une inhibition des gènes ciblés est évaluée à un niveau comparable ou meilleur que l'inhibition induite par la transfection avec les vecteurs commerciaux les plus utilisés en laboratoire. En outre, cette efficacité est retrouvée sur plusieurs modèles cellulaires et avec différentes séquences d'ARN interférents, nous autorisant d'envisager un caractère générique de ces particules pour la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques.

Par ailleurs, ce chapitre a pu démontrer la possibilité d'encapsuler des molécules lipophiles dans le cœur non cristallin des particules cLNP. Cette caractéristique offre des perspectives intéressantes pour la co-délivrance de plusieurs molécules en simultanée : des siARN complexés en surface et des molécules lipophiles telles que des fluorophores ou des anticancéreux. Cette stratégie

a d'ailleurs été démontré par Yu *et al.* lors de délivrance simultanée de siARN et de Paclitaxel dans des cellules KB [28].

Néanmoins, des tests complémentaires sur des cellules et/ou des structures considérées comme étant difficiles à transfecter sont encore nécessaires pour développer le caractère générique de ce type de vecteur (cellules primaires, cellules non-adhérentes, neurones et/ou culture cellulaire tridimensionnelle). Ainsi, l'utilisation des particules cLNPa, démontrant les meilleures propriétés pour la transfection de siARN, ont été testées dans ce cadre au cours du chapitre VI.

Bibliographie

1. Aaron JS, Greene AC, Kotula PG, Bachand GD, Timlin J a. Advanced optical imaging reveals the dependence of particle geometry on interactions between CdSe quantum dots and immune cells. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2011 Mar 7;7(3):334–41.
2. Fairbairn N, Christofidou A, Kanaras AG, Newman T a, Muskens OL. Hyperspectral darkfield microscopy of single hollow gold nanoparticles for biomedical applications. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2013 Mar 28;15(12):4163–8.
3. Schultz RA, Nielsen T, Zavaleta JR, Ruch R, Wyatt R, Garner HR. Bioimaging Hyperspectral Imaging : A Novel Approach For Microscopic Analysis. *Cytometry*. 2001;247:239–47.
4. Nuutila J, Lilius E-M. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2005 Jun;65(2):93–102.
5. Xue H-Y, Wong H-L. Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS nano*. 2011 Sep 27;5(9):7034–47.
6. Foley M, MacGregor AN, Kusel JR, Garland PB, Downie T, Moore I. The lateral diffusion of lipid probes in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* 1986;103: 807–818.
7. Rejman J, Oberle V, Zuhom IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 2004 ;377 :159-169.
8. Thuahnai ST, Lund-Katz S, Williams DL, Phillips MC. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J. Biol. Chem.* 2001;276 :43801-43808.
9. Kong WH, Park K, Lee M-Y, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials*. 2013 Jan;34(2):542–51.
10. Sahay G, Querbes W, Alabi C, Eltoukhy A, Sarkar S, Zurenko C, Karagiannis, E, Love K, Chen D, Zoncu R, Buganim Y, Schroeder A, Langer R, Anderson DG. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nature Biotechnology*. 2013;31:653-658.

11. Subtil A, Dautry-Varsat A. Microtubule depolymerization inhibits clathrin coated-pit internalization in non-adherent cell lines while interleukin 2 endocytosis is not affected. *J Cell Sci.* 1997;110(Pt 19):2441–2447.
12. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):473–483.
13. Dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson K a. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PloS one.* 2011 Jan;6(9):e24438.
14. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1994;127(5):1199–1215.
15. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003;161(4):673–677.
16. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pits formation. *J Cell Biol.* 1993;123(5):1107-1117.
17. Sahay G, Querbes W, Alabi C, Eltoukhy A, Sarkar S, Zurenko C, Karagiannis E, Love K, Chen D, Zoncu R, Bugarim Y, Schroeder A, Langer R, Anderson DG. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol.* 2013;31:653–658.
18. Juliano RL, Alahari S, Yoo H, Kole R, Cho M. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisens oligonucleotides. *Pharmaceutical research.* 1999;16(4):494–502.
19. Tabatt K, Sameti M, Olbrich C, Müller RH, Lehr C-M. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2004 Mar;57(2):155–62.
20. Ribet C. Analyse cinétique de l'interférence par l'ARN dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules de mammifères. Thèse de doctorat de l'université Paris Sud. 2005.
21. Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine.* 2014;9(2):295-312.
22. Ma D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale.* 2014 Jun 21;6(12):6415–25.

23. Kerr MC, Lindsay MR, Luetterforst R, Hamilton N, Simpson F, Parton RG, Gleeson PA, Teasdale RD. Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *Journal of cell science*. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3967–80.
24. Navarro FP, Mittler F, Berger M, Josserand V, Gravier J, Vinet F, Texier I. Cell Tolerability and Biodistribution in Mice of Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012 Aug 1;8(4):594–604.
25. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005 Jan;11(05):127–52.
26. Korzeniewski C, Callewaert DM. An Enzyme-Release Assay for Natural. *Science*. 1983;64:313–20.
27. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*. 2000;38:325–9.
28. Yu YH, Kim E, Park DE, Shim G, Lee S, Kim YB, Kim CW, Oh YK. Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012 Feb;80(2):268–73.
29. Taratula O, Kuzmov A, Shah M, Garbuzenko OB, Minko T. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013 Nov 10;171(3):349–57.
30. Yu B, Hsu S-H, Zhou C, Wang X, Terp MC, Wu Y, Teng L, Mao Y, Wang F, Xue W, Jacob ST, Ghoshal K, Lee RJ, Lee LJ. Lipid nanoparticles for hepatic delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(25):5924–34.
31. Inoh Y, Furuno T, Hirashima N, Kitamoto D, Nakanishi M. Rapid delivery of small interfering RNA by biosurfactant MEL-A-containing liposomes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011 Oct 28;414(3):635–40.
32. Kim HR, Kim IK, Bae KH, Lee SH, Lee Y, Park TG. Cationic Solid Lipid Nanoparticles Reconstituted from Low Density Lipoprotein Components for Delivery of siRNA. 2008;5(4):622–31.
33. Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H. Complex formation with plasmid dna increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:751-757.

34. Pinnaduwege P, Schmitt L, Huang L. Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim Biophys Acta*. 1989;985:33-37.
35. Dass CR. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med*. 2004;82:579-591.
36. Ma B, Zhang S, Jiang H, Zhao B, Lv H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J Controlled Release*. 2007;123(3):184-194.
37. Lawrence MJ. Surfactant systems: their use in drug delivery. *Chem Soc Rev*. 1994;23:417-423.

CHAPITRE VI

Délivrance active de siARN sur cellules et structures difficiles à transfecter

Chapitre VI. Délivrance active de siARN sur des cellules et structures difficiles à transférer.....	279
1. Les modèles cellulaires difficiles à transférer	281
1.1. Description des modèles cellulaires.....	281
1.2. Interaction des siARN avec les cellules difficiles à transférer	284
2. Les structures difficiles à transférer : culture 3D.....	288
2.1. Principe de la culture tridimensionnelle	288
2.2. Transfection fonctionnelle sur culture 3D de PC3-GFP	291
2.2.1. Mise en place du modèle d'étude	291
2.2.2. Optimisation du rapport molaire N/P.....	292
2.2.3. Optimisation de la concentration en siARN	298
2.3. Étude de la cytotoxicité induite	300
3. Discussion	303
4. Conclusion	306

Les nanoparticules lipidiques cLNP ont démontré leur pertinence pour la délivrance de siARN fonctionnels en transfection *in vitro* sur des lignées immortalisées, mais aussi pour des applications telles que le criblage à haut-débit. En outre, les expériences précédentes ont démontré une efficacité d'inhibition fonctionnelle, permise par la transfection de siARN avec les cLNP, sur différentes lignées cellulaires et avec diverses séquences d'ARN interférents, apportant alors un caractère générique à ces vecteurs. Néanmoins, certains modèles cellulaires sont décrits comme difficiles à transfecter selon la littérature. C'est le cas notamment des cellules primaires, des cellules non-adhérentes et des cellules différenciées en neurone. En outre, la culture cellulaire tridimensionnelle induit également des limites importantes pour la transfection de séquences d'acides nucléiques.

Ce chapitre a donc pour objectif de décrire ces différents modèles cellulaires et les limites induites par leurs propriétés. Surtout, des tests de délivrance de siARN avec des nanoparticules cLNPa sont étudiés afin d'établir le potentiel de ces vecteurs sur ces modèles plus réfractaires à la transfection.

1. Les modèles cellulaires difficiles à transfecter

1.1. Description des modèles cellulaires

La capacité de moduler l'expression des gènes dans les cellules primaires est essentielle pour la génomique fonctionnelle, l'analyse des voies de signalisation et pour les applications médicales. En effet, la possibilité d'étudier les interactions clés sur des cellules physiologiquement plus proches des conditions *in vivo* est importante. Ces modèles cellulaires sont obtenus à partir de prélèvements biologiques et dérivent directement d'un organisme, sans modification provoquée par l'Homme, en admettant que les conditions de culture ne changent pas, ou peu, le phénotype (culture 2D, absence de réelle matrice extracellulaire, pression partielle en oxygène, ...). L'avantage de ces cellules est qu'elles ont théoriquement une morphologie, un comportement et une activité plus représentative des conditions physiologiques. Cependant, ces cellules sont moins accessibles (accès aux prélèvements, prix), plus fragiles, exigeantes et se cultivent beaucoup moins longtemps que les lignées. Les lignées cellulaires sont obtenues par une transformation des cultures cellulaires, généralement par un agent oncogène. Elles sont beaucoup moins fragiles et échappent à la sénescence cellulaire normale. Cependant, les modifications génétiques induites les éloignent des réalités physiologiques.

À notre connaissance, aucune publication n'explique clairement les paramètres responsables de la difficulté de transfection accrue avec certains modèles cellulaires. Néanmoins, des hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène. Li *et al.* ont démontré que pour des modèles cellulaires lutéales de caprin CLC, le temps de doublement de la population avec des cellules immortalisées est diminué d'environ une heure par rapport aux cellules primaires [1]. Ainsi, une croissance et une division cellulaire plus rapide des cellules immortalisées pourraient être associées à une exacerbation des mécanismes d'endocytose, facilitant la transfection de séquences d'acides nucléiques par des vecteurs empruntant ce type de voie d'entrée. En outre, des travaux complémentaires ont prouvé que l'immortalisation de certains modèles cellulaires était associée à une modification de caractéristiques phénotypiques, notamment sur les propriétés d'endocytose. C'est le cas par exemple lors de l'immortalisation de cellules endothéliales du cerveau de porc qui induit une diminution de l'activité de certaines enzymes [2]. Dans cette étude, l'activité de la phosphatase alcaline et de la transpeptidase γ -glutamyl est retrouvée respectivement 100 fois et 40 fois plus faible suite à l'immortalisation des cellules primaires, issues du cerveau de porc, en lignée cellulaire PBMEC/C1-2 [2]. Dès lors, une modification phénotypique est envisageable lors des étapes d'immortalisation des cellules, pouvant potentiellement améliorer leurs capacités à être transfectées, notamment par une surexpression de récepteurs membranaires. Par ailleurs, ces changements pouvant être provoqués contribuent à une volonté d'effectuer les essais biologiques sur des modèles primaires plus proches des cellules différenciées dans leur environnement tissulaire. Dans le cadre de notre étude, des expériences de transfection ont été réalisées sur un modèle cellulaire de type Huvec, représentant des cellules endothéliales humaines primaires issues de la veine ombilicale, largement utilisé pour des recherches sur l'angiogénèse [3] (voir protocole page 140).

En plus des cellules primaires, d'autres modèles cellulaires sont réputés pour être difficiles à transfecter. C'est le cas par exemple des cellules neuronales et des cellules non-adhérentes. Au niveau de la littérature, les transfections effectuées sur les cellules neuronales primaires ou sur les lignées cellulaires issues de neuroblastome de souris ne démontrent que 3 à 30% d'efficacité avec des vecteurs de type PEI ou Lipofectamine 2000 [4-6]. Ces faibles efficacités sont en parties dues à la taille des cellules, à la variation de leur forme et à leur stade dans le cycle cellulaire [7]. En outre, la transfection de neurones de mammifères constitue un obstacle d'autant plus important que ces cellules sont fortement sensibles aux stress physiques, aux modifications de température ou de pH, ainsi qu'aux changements d'osmolarité [8]. Afin de vérifier la qualité de transfection permise par les vecteurs cLNPa sur ce type de modèle, des expériences ont été effectuées sur des cellules issues d'un

phéochromocytome de rat qui, sous l'action de NGF notamment, se différencie en structures proches des neurones avec des neurites (voir protocole page 140).

Concernant les cellules non-adhérentes, la difficulté de transfection vient probablement d'une présentation tridimensionnelle associée à un mouvement permanent qui, contrairement aux cellules adhérentes, entraînent une absence de polarité spécifique et de contrainte sur la cellule. Par ailleurs, des cellules primaires non-adhérentes telles que les cellules lymphoïdes (les cellules issues de la moelle osseuse ou les splénocytes) présentent également des difficultés de transfection. Pour étudier l'impact des nanovecteurs cLNPA pour la transfection de siARN sur ce type de modèle cellulaire, une lignée immortalisée de cellules de lymphocytes T humains a été utilisée (voir protocole page 140).

À l'heure actuelle, ces différents modèles reconnus comme difficiles à transfecter sont devenus la cible de nombreuses recherches en raison de leur comportement proche des conditions physiologiques. Certaines méthodes se voient d'ailleurs très efficaces, comme l'utilisation de vecteurs dérivés de virus inactivés. En effet, lors d'une transfection de 1 µg de siARN sur des cellules en suspension de type U937 pendant 48 heures, l'utilisation de ce vecteur viral a permis une inhibition de 97% du gène MK2 [9]. Dans le même temps, cette étude de Tietz *et al.* a démontré que des vecteurs commerciaux lipidiques (Lipofectamine LTX, X-tremeGENE, PromoFectine-siRNA) ne permettent aucune efficacité de transfection [9]. De même, la technique d'électroporation est couramment étudiée pour la délivrance de siARN dans les cellules difficiles à transfecter [9-11]. Notamment, Jordan *et al.* ont démontré une inhibition de 88% du gène GAPDH ciblé sur les monocytes humains U937, après émission d'impulsions de 250 V, 300 µF et 1000 Ω et transfection de siARN à 100 nM [11]. En outre, une impulsion à 250 V pendant 20 millisecondes provoque une inhibition fonctionnelle du gène ciblé évaluée à 60% dans les cellules primaires de type HUVEC [10]. Cependant, les vecteurs viraux et les techniques d'électroporation sont soumis aux limitations décrites dans le chapitre II, à savoir les risques d'immunogénicité/d'oncogénicité pour les premiers et une certaine cytotoxicité pour les seconds.

Néanmoins, les techniques actuelles se développent permettant d'entrevoir des perspectives intéressantes dans ce domaine. Par exemple, l'optimisation des formulations des liposomes cationiques disponibles peuvent augmenter les efficacités de transfection observées. Dans leur étude, Leus *et al.* ont démontré une inhibition de 48% du gène codant pour VE-cadhérines sur les cellules HUVEC, après transfection pendant 48 heures de siARN à 60 nM complexés aux vecteurs cationiques SAINT-MIX (un mélange de lipides cationiques et de lipides fusogènes) sous forme de

lipoplexes [12]. Par ailleurs, la modification de ce vecteur, par greffage d'anticorps reconnaissant sélectivement les cellules Huvec, permet une efficacité d'inhibition fonctionnelle 20% plus élevée [12]. L'utilisation de vecteurs lipidiques peut donc s'avérer être une alternative intéressante pouvant autoriser la transfection de siARN.

1.2. Interaction des siARN avec les cellules difficiles à transfecter

Comme pour les études précédentes, la première analyse consiste à vérifier l'internalisation des siARN dans les cellules, après complexation avec les nanoparticules cLNPa. Ainsi, des complexes cLNPa/siARN-Alexa488 ont été transfectés sur les modèles cellulaires sélectionnés durant plusieurs heures. L'étape d'internalisation semblant être l'un des facteurs limitants au niveau de la délivrance de siARN fonctionnels dans les cellules considérées comme difficiles à transfecter, nous avons choisi d'observer l'interaction des siARN-Alexa488 avec les cellules après un temps long d'incubation, soit 6 heures. Par ailleurs, comme pour les expériences précédentes, la Lipofectamine RNAimax a été utilisée comme agent de transfection de référence. Pour permettre les conditions optimales, les transfections ont été réalisées au rapport molaire N/P de 24/1 avec des nanoparticules cLNPa-DiD, correspondant à une concentration en DOTAP de 12,5 µg/mL pour une concentration en siARN de 20 nM.

Après 6 heures de transfection sur des cellules primaires de type HUVEC, une interaction élevée est mesurée avec les siARN-Alexa488 complexés aux vecteurs (Figure VI-1). Avec la Lipofectamine RNAimax, la fluorescence des siARN-Alexa488 au contact des cellules HUVEC est 10,3 fois plus élevée que pour les cellules traitées avec des siARN non-complexés (Figure VI-1). En outre, l'utilisation de cLNPa en tant que vecteur pour ces siARN provoque une intensité de fluorescence 2,2 fois plus élevée par rapport à l'utilisation de Lipofectamine RNAimax, attestant d'une forte interaction induite par cLNPa (Figure VI-1).

De plus, la quantité de cellules positives pour une interaction avec les siARN-Alexa488 est différente selon le vecteur employé : après 6 heures d'incubation, 91% des cellules HUVEC démontrent une interaction avec les siARN-Alexa488 complexés à cLNPa, tandis que seulement 59% des cellules sont positives avec le complexe Lipofectamine RNAimax/siARN dans les mêmes conditions, soit un tiers de moins (Figure VI-1). Ainsi, après 6 heures d'incubation, les cLNPa permettent une distribution des siARN plus rapide que la Lipofectamine RNAimax dans la majorité des cellules traitées.

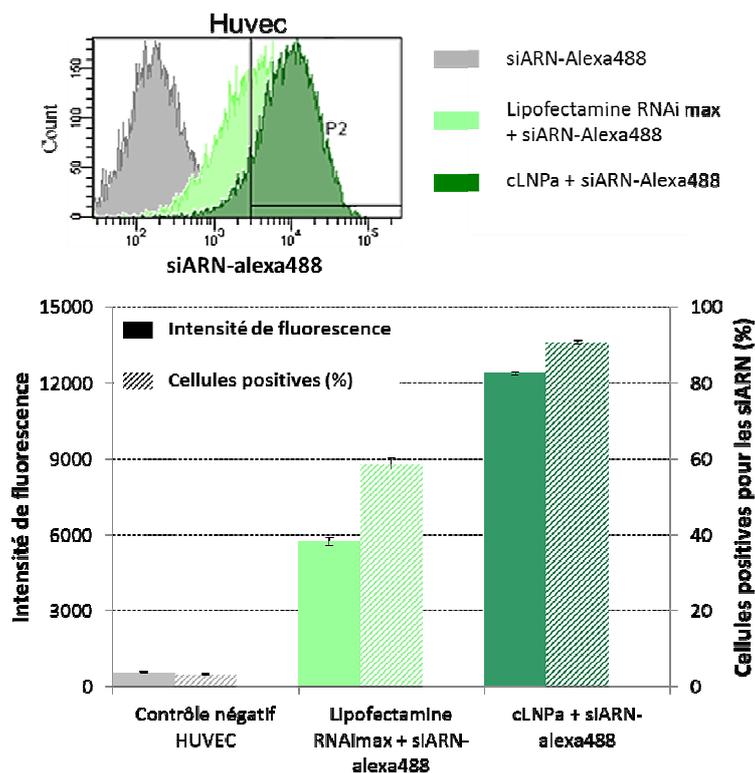


Figure VI-1. Transfection de cellules primaires : Les cellules primaires de type Huvec ont été transfectées 6 heures par des siARN fluorescents avec deux vecteurs, la Lipofectamine RNAi max (vert clair) et cLNPa-DiD (vert foncé) ($n=4$) (siARN = 20 nM – N/P = 24/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

La même observation peut être effectuée au regard des expériences effectuées sur les cellules non-adhérentes d'origine lymphoïde de type Jurkat. Cependant, les différences observées entre l'utilisation de Lipofectamine RNAi max et cLNPa sont plus marquées (Figure VI-2). Après 6 heures de transfection, l'intensité de fluorescence induite par la transfection de siARN-alexa488 avec la Lipofectamine RNAi max (vert clair) est mesurée 60% inférieure à celle autorisée par cLNPa (vert foncé).

En effet, par rapport aux cellules Jurkat traitées uniquement avec les siARN-Alexa488, l'intensité de fluorescence des cellules transfectées avec le complexe Lipofectamine RNAi max/siARN est 20 fois plus élevée. Tandis que l'intensité de fluorescence permise par la transfection de siARN-Alexa488 avec cLNPa est 2,5 fois plus élevée que celle mesurée avec l'utilisation de l'agent commercial. Par ailleurs, cette différence se retrouve au niveau du pourcentage de cellules interagissant avec les siARN-Alexa488 : la Lipofectamine RNAi max ne permet une interaction qu'avec seulement 46% des cellules Jurkat traitées. Au contraire, la transfection de ces siARN avec les

nanoparticules cLNPa autorise une interaction avec 95% des cellules Jurkat traitées, soit la totalité de la population. De plus, la distribution des siARN-Alexa488 entre les cellules Jurkat traitées semble plus homogène avec cLNPa par rapport à la Lipofectamine RNAimax. En effet, le signal de fluorescence démontrant un pic plus étroit atteste d'une distribution plus égale entre les cellules analysées (Figure VI-2).

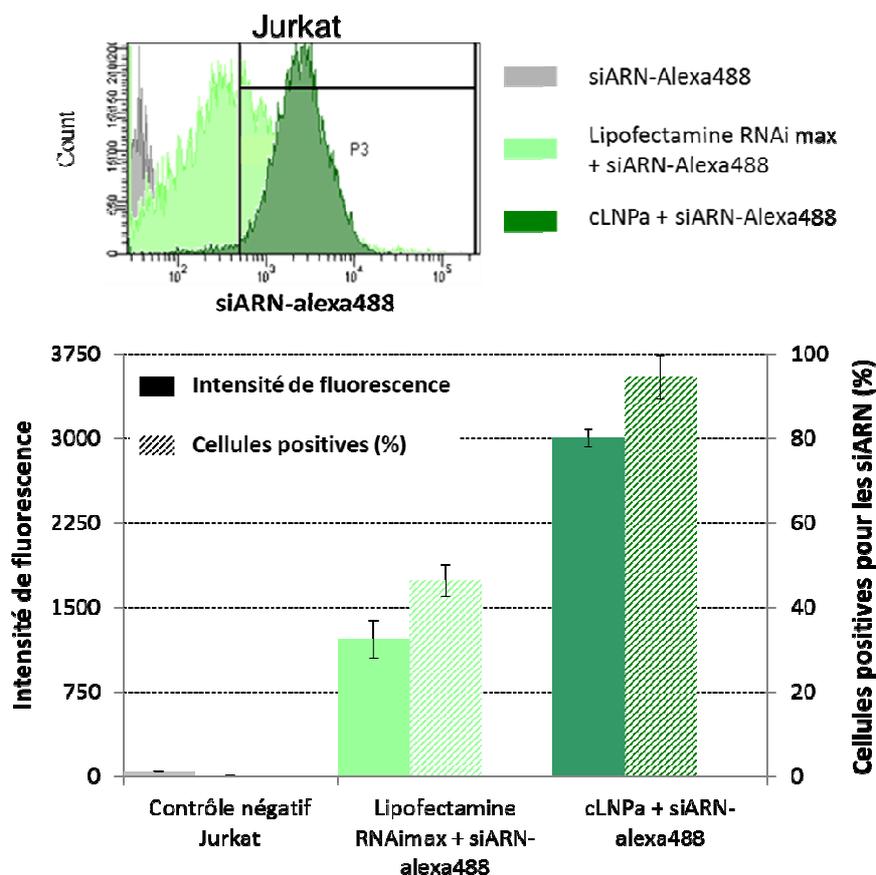


Figure VI-2. Transfection de cellules non-adhérentes : les cellules non-adhérentes Jurkat ont été transfectées 6 heures par des siARN fluorescents avec deux vecteurs, la Lipofectamine RNAimax (vert clair) et cLNPa-DiD (vert foncé) ($n=6$) (siARN = 20 nM – N/P = 24/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

La différence entre les deux vecteurs testés est la plus importante pour le troisième modèle, réputé difficile à transfecter, étudié : les cellules différenciées en structures proches des neurones (Figure VI-3). Avec ce modèle, l'agent commercial Lipofectamine RNAimax ne permet qu'une faible interaction des siARN-Alexa488 complexés avec les cellules traitées. En effet, seulement moins de 15% des cellules analysées sont positives pour la fluorescence du siARN-

Alexa488. Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus en utilisant cLNPa comme vecteur. En effet, ces nanoparticules lipidiques permettent une interaction des siARN-Alexa488 avec 65% des cellules traitées (Figure VI-3).

En termes d'intensité de fluorescence mesurée, l'interaction mesurée entre les siARN-Alexa488 et les cellules PC12 différenciées est 2,8 fois plus élevée après transfection avec les nanoparticules lipidiques cLNPa, soit une intensité de fluorescence 61% plus élevée. En observant le profil de distribution des siARN-Alexa488 obtenu par cytométrie en flux (Figure VI-3), la majorité des cellules PC12 différenciées en structures proches des neurones interagissent avec les siARN complexés aux vecteurs cLNPa (vert foncé), tandis que le profil des cellules transfectées avec le lipoplexe Lipofectamine RNAi max/siARN se confond en partie avec le profil des cellules transfectées avec les siARN seuls (vert clair).

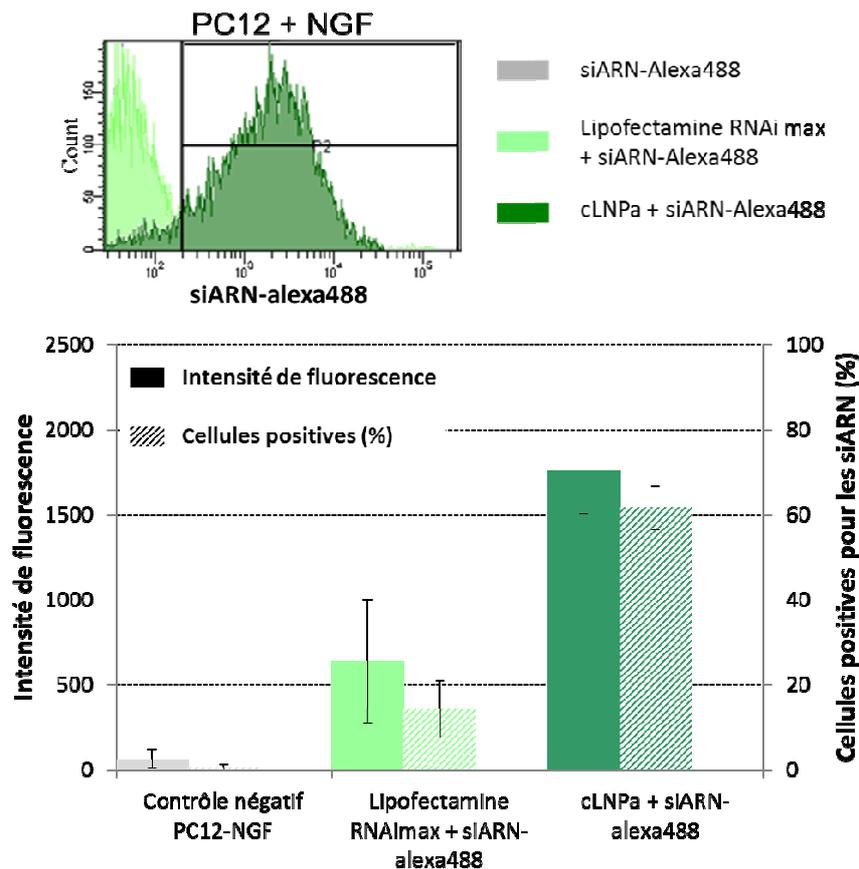


Figure VI-3. Transfection de cellules neuronales : les cellules PC12, différenciées en structures proches des neurones après traitement NGF, ont été transfectées 6 heures par des siARN fluorescents avec deux vecteurs, la Lipofectamine RNAi max (vert clair) et cLNPa-DiD (vert foncé) ($n=7$) (siARN = 20 nM – N/P = 24/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

Ainsi, ces premières observations soulignent le caractère prometteur des cLNPa pour la délivrance intracellulaire des siARN dans les modèles cellulaires réputés comme étant difficiles à transférer. L'interaction entre les séquences d'acides nucléiques complexés et les cellules traitées semble affecter l'ensemble des populations analysées avec le vecteur cLNPa, autorisant des tests complémentaires sur ces modèles cellulaires. En outre, les résultats obtenus démontrent un avantage des nanoparticules cLNPa par rapport à la Lipofectamine RNAimax concernant l'accessibilité des cellules pour les siARN complexés. Néanmoins, des tests d'internalisation nécessitent d'être réalisés pour prouver une transfection effective, notamment par l'utilisation de bleu trypan inhibant la fluorescence extracellulaire de l'alexa488 par un phénomène de FRET.

Suite aux essais permettant de visualiser l'interaction des siARN avec ces cellules, après complexation avec les vecteurs lipidiques cationiques de type cLNPa, des expériences d'inhibition fonctionnelle nécessiteront d'être réalisées sur ces différents modèles cellulaires. Trois phénotypes à inhiber par transfection de siARN ont été isolés concernant les modèles de notre étude.

Pour les cellules primaires de type Huvec, des siARN induisant la mort cellulaire sur des cellules humaines (siARN Cell Death) ont été choisis comme précédemment. L'efficacité d'inhibition fonctionnelle sera mesurée par l'induction des phénomènes de mort cellulaire, notamment par apoptose. Concernant le modèle de cellules non-adhérentes de type Jurkat, les récepteurs de surface CD2 modérément exprimés seront la cible d'une inhibition spécifique par la transfection de siARN. Enfin, pour le modèle cellulaire proche des neurones, les PC12 différenciées seront transfectées avec des siARN inhibant l'expression du récepteur de surface P75, diminuant alors la reconnaissance du facteur de différenciation NGF. Ces différentes validations seront entreprises pour la suite de ces travaux de thèse car elles nécessitent encore des mises au point.

2. Les structures difficiles à transférer : culture 3D

2.1. Principe de la culture tridimensionnelle

Les cellules qui se développent dans les tissus sont dans un environnement tridimensionnel ayant des signaux caractéristiques biophysiques et biomécaniques. Ces signaux influencent des fonctions cellulaires majeures telles que la migration, l'adhésion, la prolifération et l'expression génique [13-16].

Cependant, l'essentiel des tests cellulaires *in vitro* effectués en laboratoire se concentrent sur une culture des cellules en deux dimensions plus simple à mettre en place. De cette façon, les

cellules sont cultivées sur des boîtes en plastique de type polystyrène qui sont très rigides et non-naturelles. Les adhésions des cellules se font sur ces structures synthétiques par des adhésions différentes peu représentatives des conditions physiologiques (Figure VI-4). En effet, la cellule subit de nombreuses contraintes pour s'étaler sur la surface et migrer en $x-y$. Le microenvironnement de la cellule est ainsi négligé et les résultats obtenus peuvent donner des interprétations différentes de celles obtenues au niveau des tissus.

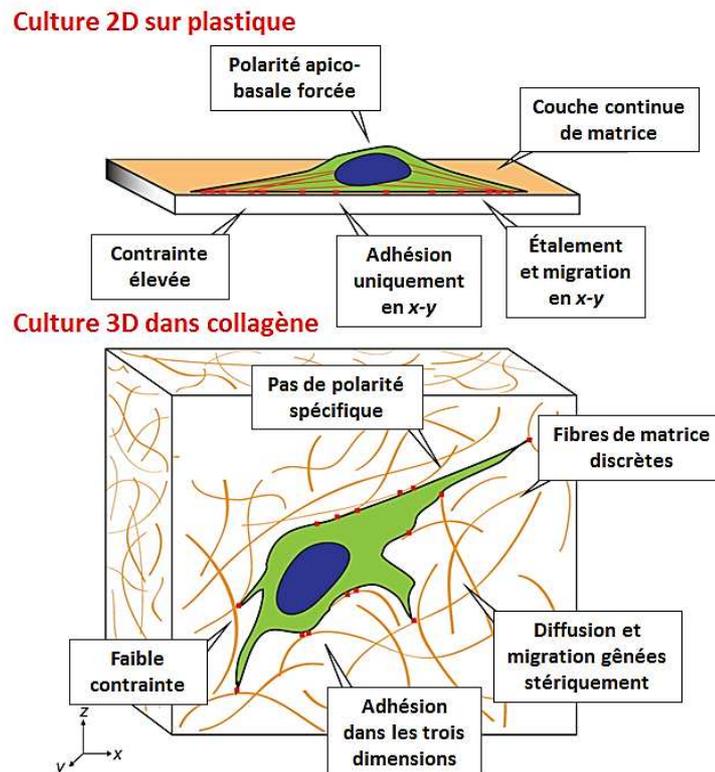


Figure VI-4. Différence de contraintes sur des cellules entre la culture 2D et 3D : les cellules cultivées sur boîte de pétri subissent des contraintes d'adhésion, de migration et de polarité alors que les cellules cultivées en 3D dans un gel de matrigel sont plus représentatives des conditions physiologiques (d'après Baker et al., 2012 [17]).

Depuis une trentaine d'année, une culture cellulaire tridimensionnelle ($x-y-z$) se développe visant à reproduire plus précisément la physiologie des tissus et des organes naturels. Par cette voie, les cellules se fixent les unes aux autres formant des attachements physiques de cellule à cellule (Figure VI-5). En outre, le matériel utilisé pour permettre le développement tridimensionnel possède une rigidité mécanique comparable aux tissus naturels, et il est composé de protéines complexes dans leur configuration native fournissant ainsi des instructions biologiques importantes pour les cellules (exemple : le matrigel). Dans cet environnement, les cellules peuvent exercer des forces les

unes sur les autres stimulant leurs interactions par la création de jonction gap, par des échanges ioniques ou même par des courants électriques. Ces liens privilégiés permettent d'obtenir des phénotypes plus complexes et des fonctions cellulaires plus proches des tissus natifs par une communication et une signalisation renforcée.

Sung *et al.* ont d'ailleurs démontré une modification de l'expression des molécules de signalisation entre des cellules cultivées en deux dimensions et des cellules cultivées de manière tridimensionnelle [18]. Au cours de leur étude sur la culture des fibroblastes mammaires humains (HMF), cette équipe a démontré que la culture sous forme tridimensionnelle provoquait une augmentation de la sécrétion de molécules de signalisation (COX2, HGF, MMP-14) par les cellules HMF par rapport aux fibroblastes cultivés en boîte de pétri [18], améliorant ainsi la progression vers des phénotypes invasifs des cellules du cancer du sein [18]. L'une des conséquences de ce phénomène est une résistance plus élevée des cellules cultivées de façon tridimensionnelle face aux agents chimio-thérapeutiques ou même face aux rayonnements [19, 20]. La validation des agents anticancéreux et des effets cytotoxiques devient alors plus représentative des conditions *in vivo* lors d'évaluations précliniques.

En outre, contrairement à la culture 2D où les cellules forment une monocouche très mince sur la surface plastique, la culture 3D présentent une succession de couches cellulaires et de matrice. La nécessité de diffuser à travers ces couches pour atteindre les cellules les plus profondes est importante (Figure VI-5). Par ailleurs, lors de cultures cellulaires tridimensionnelles dans du matrigel, les cellules épithéliales s'auto-organisent en *acini* parfaitement différenciés (Figure VI-5). L'expression protéique est alors dite polarisée lorsque ces cellules (alors appelées polarisées) forment un *lumen* (une lumière) et que l'expression des protéines s'effectue du côté de cette lumière. En revanche, des cellules provenant de lignées tumorales forment des sphéroïdes ayant perdu toute capacité à se polariser. Sans polarité et avec une absence de *lumen*, l'expression des protéines est alors beaucoup plus diffuse. Le modèle d'étude concernant les cellules PC3, issues du cancer de la prostate, une culture tridimensionnelle en matrigel entraîne alors la formation de sphéroïdes ne possédant pas de *lumen* et étant non polarisés.

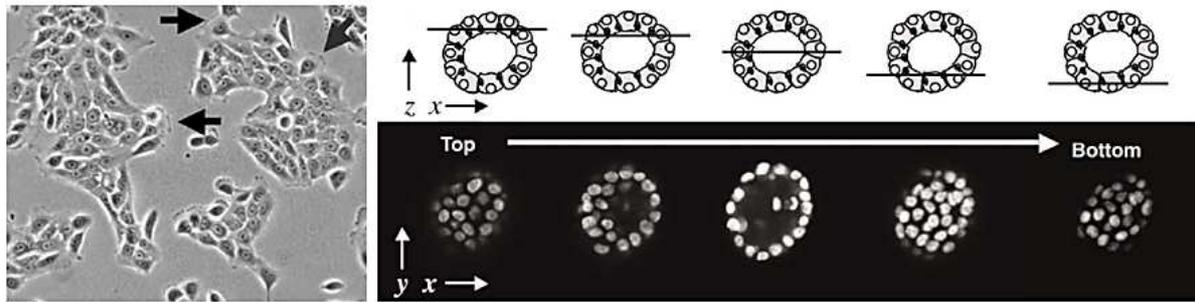


Figure VI-5. Représentation des cellules MCF-10A dans les différentes conditions de culture : Les cellules sont plus étalées en culture 2D (à gauche). En culture 3D, elles subissent moins de contrainte et communiquent plus facilement (à droite) (d'après Debnath et al., 2003 [21]).

Cependant, l'utilisation de la culture 3D est actuellement limitée par un verrou technique lié à la difficulté de transfection sur ce type de structure. Notamment, le matrigel utilisé pour permettre le développement tridimensionnel apporte une densité beaucoup plus élevée que celle rencontrée lors de la culture cellulaire en deux dimensions, et ainsi une diffusion plus difficile. En outre, en absence de contraintes imposées aux cellules cultivées sous forme tridimensionnelle, les mécanismes d'endocytose ne sont plus exacerbés et l'internalisation devient une limite plus importante. Par ailleurs, la formation en multicouches cellulaires permet d'avoir des cellules plus accessibles en périphérie, ou à l'inverse difficilement atteignables au cœur de structures de type sphéroïde. Une transfection efficace nécessite une internalisation des siARN dans toutes les cellules de chaque structure.

2.2. Transfection fonctionnelle sur culture cellulaire 3D de PC3-GFP

2.2.1. Mise en place du modèle d'étude

Pour rappel, les cellules sont cultivées dans du matrigel, un mélange de protéines gélatineuse sécrétées par les cellules Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) issues d'un sarcome de souris. Le matrigel ressemble à l'environnement extracellulaire complexe retrouvé dans de nombreux tissus, autorisant l'interprétation de résultats dans des conditions plus proches de l'environnement physiologique.

Les cultures cellulaires tridimensionnelles de PC3-GFP ont été effectuées suivant les instructions fournies dans le protocole (voir page 147). Ainsi, après quatre jours de culture dans les conditions définies, les cellules s'auto-organisent en structures sphéroïdes dépourvues de *lumen* (Figure VI-6). Une fois ces structures formées, les expériences de transfection peuvent être effectuées. Les cellules PC3 ayant été modifiées pour surexprimer la protéine GFP, ces structures

sphéroïdes peuvent se distinguer par une fluorescence verte en microscopie à épifluorescence (Figure VI-6).

En outre, un test préliminaire a été effectué avec l'incubation de nanoparticules lipidiques cationiques contenant un fluorophore de type DiD (Figure VI-6). Utilisés à une concentration en DOTAP de 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ces nanovecteurs sont visualisables par des zones rouges comprises à l'intérieur du sphéroïde vert rapporté en figure VI-6. Ainsi, les nanoparticules semblent interagir avec les cellules cultivées de façon tridimensionnelle, fournissant alors une preuve de concept pour des expériences plus approfondies.

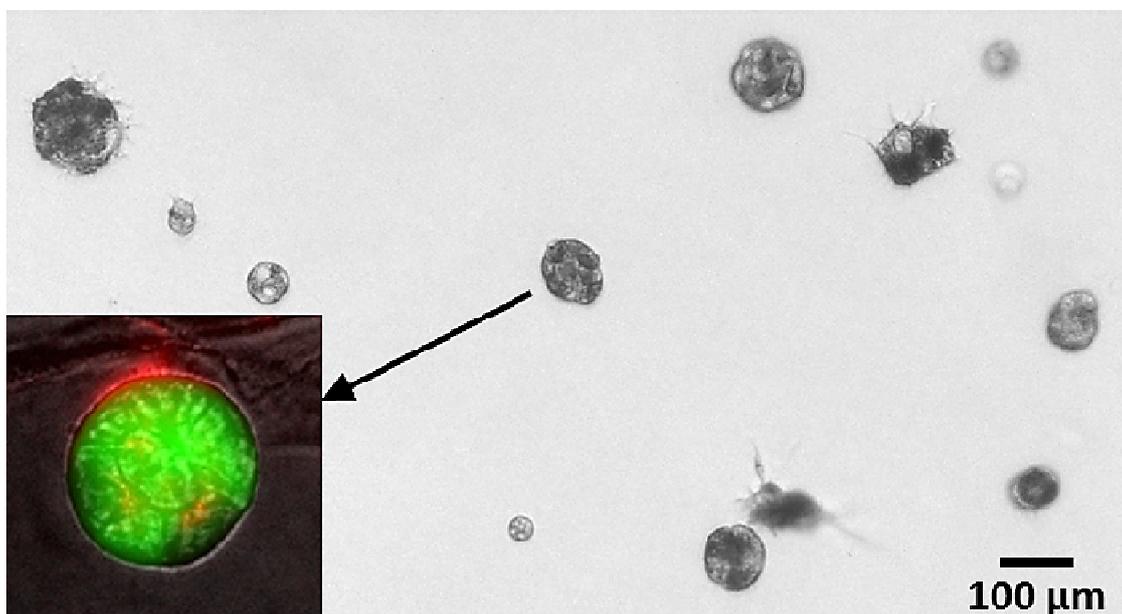


Figure VI-6. Culture de cellules PC3-GFP sous forme de sphéroïde : les cellules PC3-GFP sont cultivées sur du matrigel suivant un protocole spécifique afin de former des sphéroïdes. Image prise après quatre jours de culture, grossissement X5. Les sphéroïdes formés ont été incubés avec des nanoparticules cLNPa-DiD pendant 48 heures ([DOTAP] = 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.2.2. Optimisation du rapport molaire N/P

L'expertise acquise par nos laboratoires sur la culture cellulaire tridimensionnelle, ainsi que les essais préalablement entrepris pour la transfection de telles structures avec des vecteurs commerciaux, ont conduit à effectuer les expériences suivantes à des concentrations plus fortes en siARN, à savoir 100 nM. En outre, nous avons émis l'hypothèse que la culture dans une matrice telle que le matrigel ne s'accordait pas avec les tests de cytotoxicité effectués dans le chapitre V ; ce

changement d'environnement nécessiterait de nouveaux tests de viabilité cellulaire. C'est pourquoi nous avons effectué les premiers essais avec des concentrations très fortes en nanoparticules, matérialisées par des rapports molaires N/P élevés, partant de l'hypothèse qu'une faible fraction de ces nanoparticules serait capable d'atteindre les cellules en raison d'une difficulté de transfection accrue dans ces conditions, notamment en raison de la densité du matrigel (Figure VI-6 et Figure VI-7).

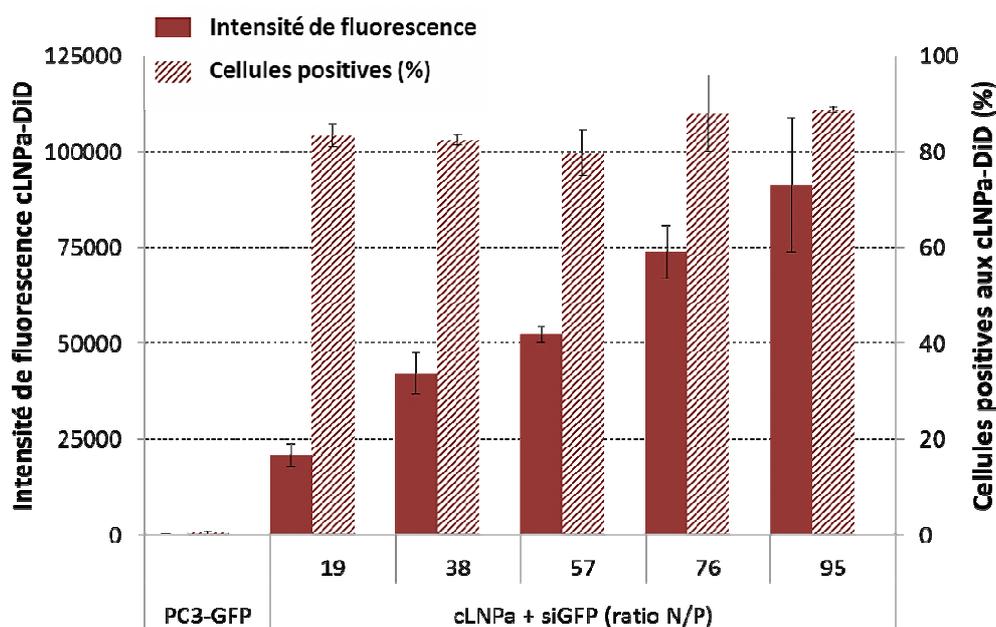


Figure VI-7. Internalisation de cLNPa dans les cellules PC3-GFP sous forme de sphéroïde : les cellules PC3 sont cultivées 96 heures sur du matrigel pour former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siARN complexés aux cLNPa-DiD. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence autorisée par les cLNPa-DiD (siARN=100 nM) (n=2). Analyse par cytométrie en flux sur 10^3 évènements (FACS BD LSRII – canal DiD).

Ainsi, les cellules sous forme de sphéroïdes ont été transfectées pendant 72 heures par des complexes cLNPa-DiD/siGFP. Les cellules sont ensuite récupérées par traitement enzymatique suivant le protocole décrit page 148, puis analysées par cytométrie en flux. L'augmentation de la concentration en nanoparticules cLNPa-DiD, matérialisée par une augmentation du rapport molaire N/P, est corrélée à une augmentation linéaire de la fluorescence DiD (rouge plein) exprimée par les cellules analysées (Figure VI-7). En effet, entre des rapports molaires N/P de 19/1 à 95/1, l'intensité de fluorescence est multipliée par 4,6. Par ailleurs, en plus de l'intensité de fluorescence, la cytométrie en flux permet de quantifier le pourcentage de cellules ayant intégré les nanoparticules

contenant du DiD (rouge hachuré) : dès le rapport molaire N/P égal à 19/1, plus de 80% des cellules interagissent avec les nanoparticules cLNPa-DiD. Au cours de cette expérience, quel que soit le rapport molaire N/P testé, ce pourcentage reste constant entre 80 et 90%. Ce résultat démontre que, malgré la densité accrue de la matrice à traverser, les nanovecteurs cLNPa sont capables d'atteindre et d'interagir avec les cellules traitées. En outre, le pourcentage élevé de cellules positives pour les nanoparticules tend à prouver que les cellules au centre des structures de type sphéroïde sont également atteintes par les nanovecteurs (Figure VI-7).

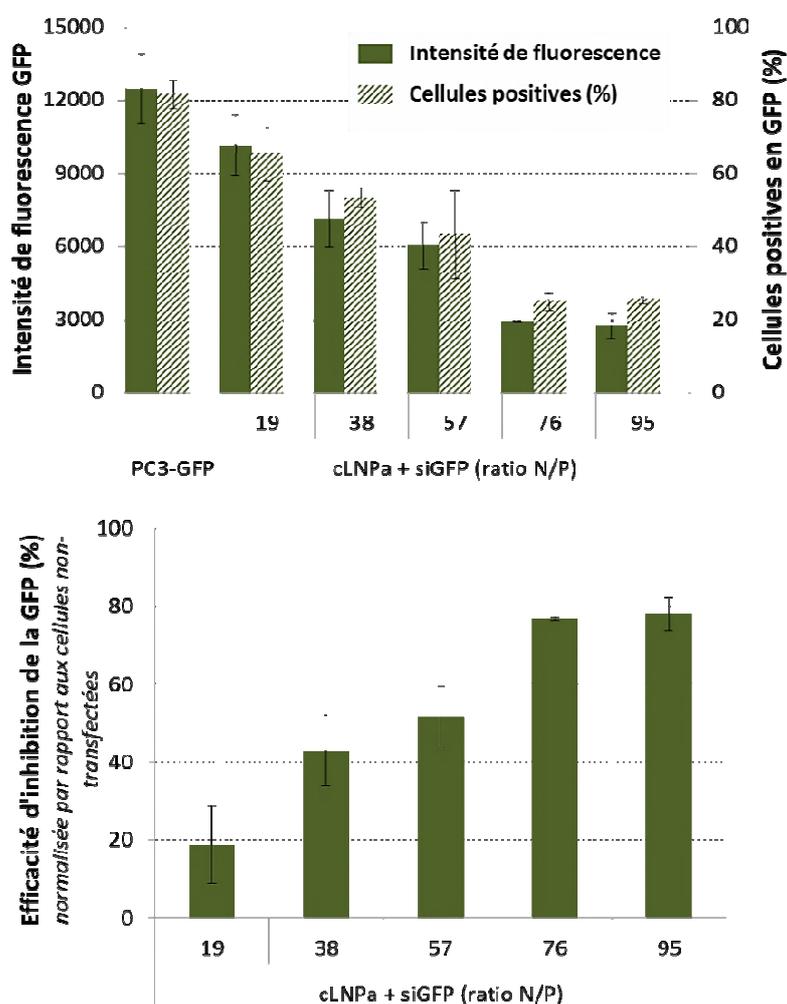


Figure VI-8. Transfection fonctionnelle de PC3-GFP sous forme de sphéroïde : les cellules PC3-GFP sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés aux nanoparticules cLNPa. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence (siARN=100 nM – temps d'incubation = 72 heures) (n=2). Analyse par cytométrie en flux sur 10^3 évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

L'efficacité d'inhibition fonctionnelle est ensuite analysée avec la transfection des complexes cLNPa-DiD/siGFP dans les mêmes conditions que précédemment (Figure VI-8). L'augmentation du rapport molaire N/P est corrélée à la diminution de l'intensité de fluorescence mesurée sur les cellules transfectées. En effet, alors qu'un rapport molaire N/P égal à 19/1 ne permet que 20% d'inhibition de l'intensité de fluorescence, une augmentation jusqu'à un rapport molaire de 76/1 permet une inhibition de 77%. Ce rapport molaire correspond à une concentration en DOTAP contenu dans les cLNPa d'environ 200 µg/mL. À partir de cette concentration, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle reste inchangée indiquant l'établissement d'un plateau.

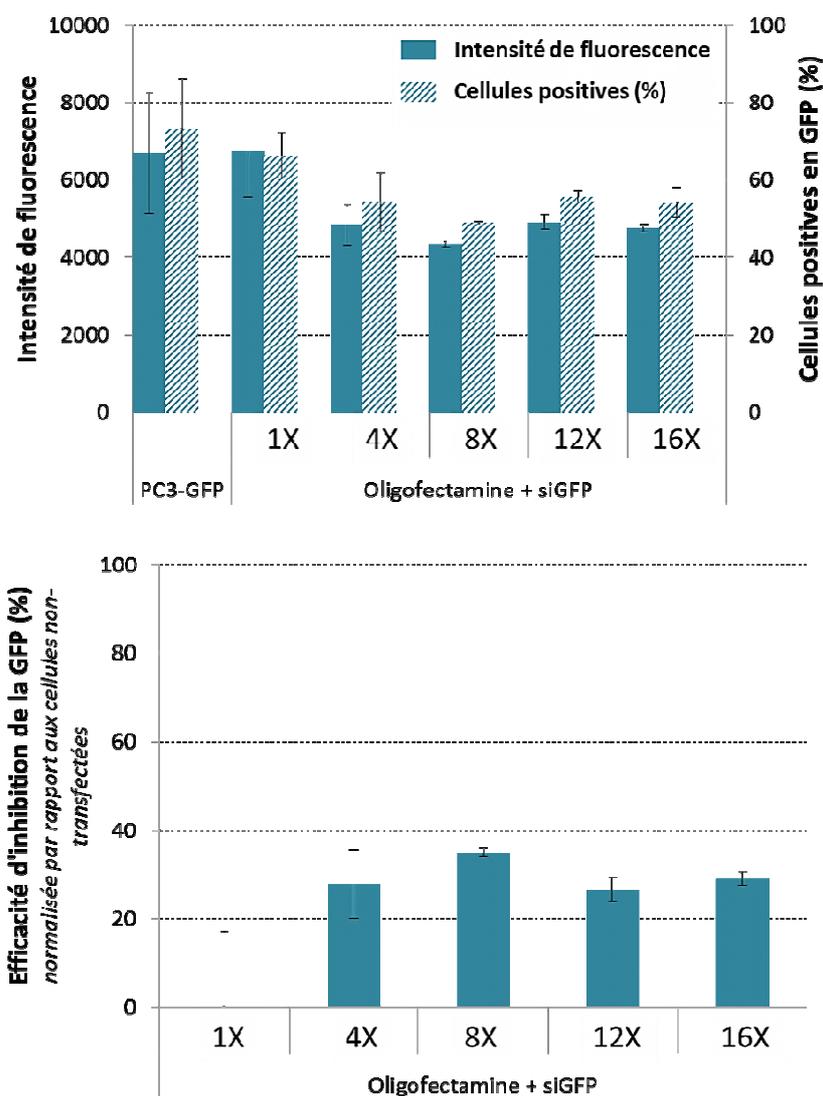


Figure VI-9. Transfection fonctionnelle de PC3-GFP sous forme de sphéroïde : les cellules PC3-GFP sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés à l'Oligofectamine®. L'Oligofectamine® est utilisé à des volumes allant de 1X à 16X. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence (siARN=100 nM – temps d'incubation = 72 heures) (n=2). Analyse par cytométrie en flux sur 10³ évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

Dans le même temps et suivant les mêmes conditions, des tests utilisant l'Oligofectamine ont été réalisés à titre comparatif (Figure VI-9). L'Oligofectamine® a été préféré à la Lipofectamine RNAimax® en raison d'une efficacité décrite comme significativement plus élevée dans le chapitre précédent ; pour rappel, cLNPa, Oligofectamine®, SilentFECT® et DharmaFECT® ont été décrits comme les plus efficaces pour la transfection de siARN fonctionnels dans les cellules PC3.

Selon les recommandations du fournisseur pour les transfections dans des conditions de culture 2D, ce vecteur doit être utilisé dans des volumes allant de 0,1% à 0,6% (v/v), soit 1X sur la figure VI-9. Comme pour les nanoparticules cLNPa, les quantités d'Oligofectamine® complexées aux siGFP ont été augmentées jusqu'à 16X afin de vérifier une éventuelle efficacité d'inhibition dépendante de la concentration en vecteur. Avec l'Oligofectamine®, l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence n'excède pas les 30%. En outre, l'efficacité maximale est atteinte dès une quantité en Oligofectamine® de 4X et reste constante malgré l'augmentation de la quantité de vecteur. Ces résultats démontrent une efficacité d'inhibition fonctionnelle supérieure permise par la transfection de siGFP avec cLNPa par rapport à l'agent commercial choisi (77%).

Néanmoins, ces expériences préliminaires sur des structures tridimensionnelles ont été effectuées avec une présence concomitante de cellules uniques se développant en deux dimensions. Dès lors, une amélioration du protocole, notamment en diminuant la quantité de cellule de 10^4 à 7.10^3 par cellule, nous a permis de passer d'environ 20% de cellules ne présentant pas des caractéristiques 3D à des quantités négligeables estimées à moins de 2%. Cette optimisation du protocole exige alors une redéfinition des efficacités de transfection dans les conditions les plus favorables décrites précédemment. Ainsi, de nouvelles expériences de transfection de siGFP à 100 nM sur structure 3D ont été effectuées, avec des rapports molaires N/P de 80/1 et 96/1 concernant l'utilisation des particules cLNPa-DiD, et des quantités 4X et 8X pour l'utilisation de l'Oligofectamine® (Figure VI-10).

Avec ces nouvelles caractéristiques, l'efficacité mesurée pour l'inhibition de l'intensité de fluorescence est de d'environ 50% suite à la transfection de complexes cLNPa-DiD/siGFP à un rapport molaire N/P de 80/1, au lieu de 77% avec le protocole non-optimisé (Figure VI-10). Ce rapport correspond d'ailleurs à un seuil, une augmentation de la concentration en nanoparticules jusqu'à un rapport molaire N/P de 96/1 ne permettant pas d'améliorer l'efficacité d'inhibition fonctionnelle d'avantage. Toutefois, cette efficacité d'inhibition fonctionnelle reste élevée, notamment au regard

des résultats obtenus avec l'Oligofectamine® dont l'inhibition fonctionnelle mesurée reste inférieure à 20% quelle que soit la quantité de vecteur utilisée (13,98% en moyenne dans les meilleures conditions).

Concernant le pourcentage de cellules transfectées, seulement 50% présente une diminution d'intensité de fluorescence significative. Les résultats obtenus indiquent cependant qu'une majorité des cellules traitées interagit avec les nanoparticules cLNPa-DiD (> 85%).

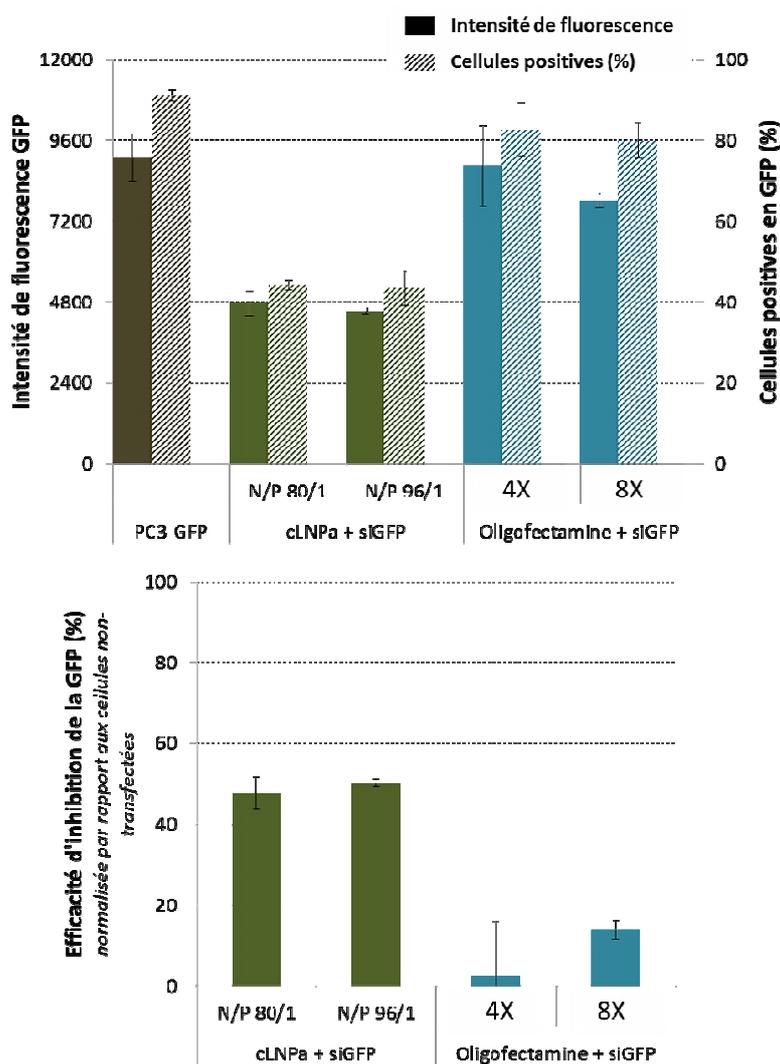


Figure VI-10. Efficacité de transfection fonctionnelle de PC3-GFP sous forme de sphéroïde : les cellules PC3-GFP sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés à cLNPa-DiD ou à l'Oligofectamine®. Les particules cLNPa-DiD sont utilisées dans des ratios molaires N/P de 80 et 96/1. L'Oligofectamine® est utilisé à des volumes de 4X et 8X. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence (siARN=100 nM – temps d'incubation = 72 heures) (n=3). Analyse par cytométrie en flux sur 10³ évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

Une hypothèse concernant cette inhibition n'impactant pas toute la population cellulaire traitée peut être une distribution hétérogène entre le cœur et la surface des sphéroïdes. En effet, le cœur de ces structures apolaires est plus difficile à atteindre par les complexes particules/siARN. Ainsi, l'observation microscopique de l'inhibition de la protéine GFP semble nécessaire afin de vérifier les zones de transfection fonctionnelle privilégiées.

2.2.3. Optimisation de la concentration en siARN

Au cours du chapitre précédent, nous avons émis l'hypothèse que le nombre de particules cLNP est primordial pour la délivrance intra-cytoplasmique de siARN. Pour rappel, avec une concentration en siARN diminuée, le maintien de la concentration en nanoparticules cLNPa a permis d'obtenir les mêmes efficacités d'inhibition fonctionnelle. À l'inverse, le maintien du rapport molaire N/P, induisant la diminution de la concentration en nanoparticules cLNPa avec celle de siARN, provoquait alors une réduction de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle. Dès lors, il est raisonnable d'imaginer qu'une diminution de la concentration en siARN, sans modifier la concentration en nanoparticules cLNPa, peut permettre de maintenir les efficacités d'inhibition fonctionnelle mesurées.

Les expériences précédentes ont rapporté les résultats les plus probants pour une concentration en DOTAP contenu dans les nanoparticules d'environ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ([siGFP] = 100 nM – N/P = 80/1). Ainsi, cette concentration a été maintenue malgré la diminution de la concentration en siGFP jusqu'à 20 nM, augmentant d'un facteur cinq le rapport molaire N/P ([siGFP] = 20 nM – N/P = 400/1). En outre, une condition a été ajoutée avec un maintien du rapport molaire N/P à 80/1 lors de transfection de siGFP sur des PC3-GFP cultivées de façon tridimensionnelle (Figure VI-11).

En accord avec l'hypothèse proposée, l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence mesurée reste d'environ 50% en maintenant la concentration en DOTAP contenu dans les particules cLNPa à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ainsi, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle peut être maintenue malgré la diminution de la concentration en siGFP de 100 nM à 20 nM, corrélée à une évolution du rapport molaire N/P de 80/1 à 400/1 (Figure VI-11). Au contraire, le maintien du rapport molaire N/P à 80/1 malgré l'inhibition de la concentration en siGFP à 20 nM démontre une perte totale de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle induit par la transfection. Ainsi, la diminution de la concentration en DOTAP contenu dans les particules jusqu'à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est responsable de la perte d'efficacité d'inhibition fonctionnelle observée. Rapportée au nombre de particules, la transfection de cellules

PC3-GFP en condition tridimensionnelle, exigent environ $8,2 \cdot 10^{12}$ nanoparticules cLNPa pour une efficacité d'inhibition optimale, soit 33 fois plus que pour une culture 2D.

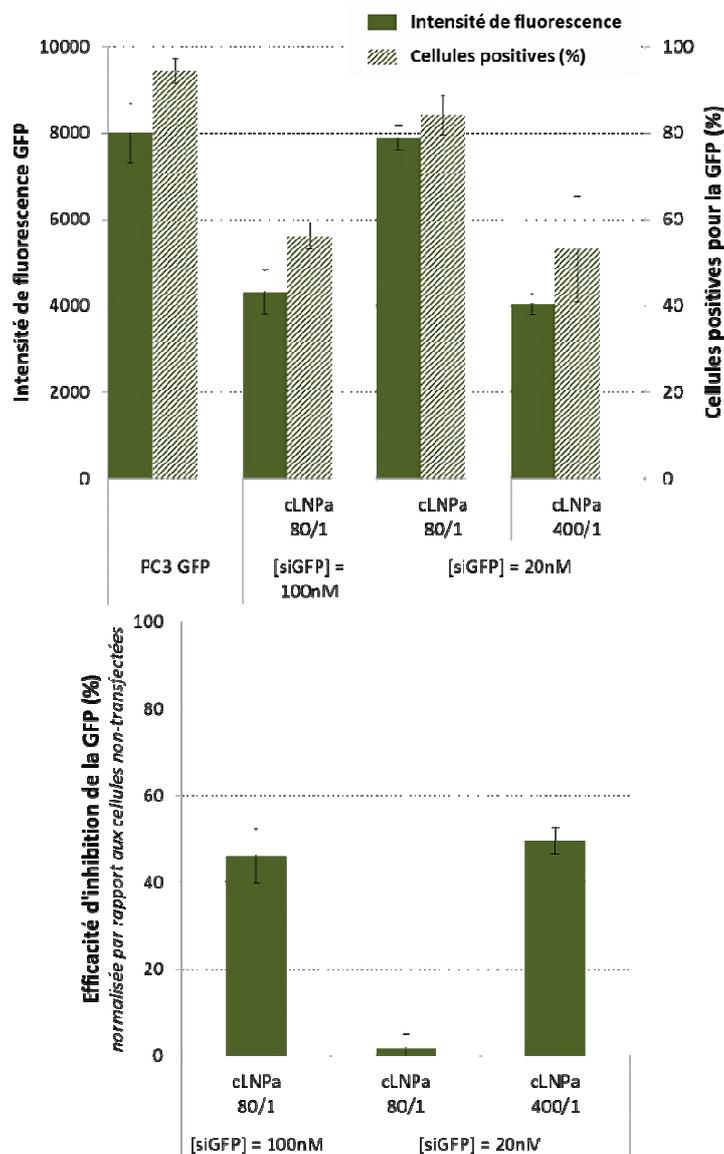


Figure VI-11. Efficacité de transfection fonctionnelle de PC3-GFP sous forme de sphéroïde en diminuant les concentrations en siARN : les cellules PC3-GFP sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés à cLNPa. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence. Les couleurs les plus foncées représentent l'intensité de fluorescence tandis que les couleurs claires représentent le pourcentage de cellules positives en GFP (n=3). Analyse par cytométrie en flux sur 10^3 évènements (FACS BD LSR II – canal FITC).

En complément des résultats démontrant une interaction forte des cLNPa avec les cellules PC3-GFP cultivées de façon tridimensionnelle, dès les plus faibles rapports molaires N/P testés, ces

données sont en accord avec l'hypothèse formulée précédemment. En effet, la quantité de nanoparticules lipidiques cLNPa exige d'être à un seuil limite pour autoriser une inhibition fonctionnelle du gène ciblé lors de la transfection de siARN. Les hypothèses formulées pour expliquer ce phénomène peuvent alors être les mêmes que celles explicitées dans le chapitre V, à savoir une quantité limite de cLNPa pour favoriser l'internalisation et/ou l'échappement endosomal. En outre, l'environnement spécifique offert par le matrigel, un mélange de protéines gélatineuses, peut exiger des concentrations élevées en vecteur pour favoriser la rétention et/ou la protection des siARN complexés, ou encore pour surmonter les difficultés de diffusion dans ce type de milieu.

Cependant, la forte augmentation de la concentration en nanoparticules cLNPa, et ainsi en DOTAP contenu dans leur couronne, peut entraîner une interrogation quant à la cytotoxicité induite. En effet, dans des conditions 2D, l'IC₅₀ des nanoparticules cLNPa a été évalué à environ 100 µg/mL de DOTAP lors d'une incubation de 24 heures sur les cellules PC3. La concentration en particules utilisée pour la transfection sur des cellules PC3 cultivées en 3D étant deux fois plus élevée que la concentration définissant l'IC₅₀ en 2D, des tests de viabilité cellulaire sont nécessaires afin d'établir le profil de cytotoxicité dans ces conditions différentes.

2.3. Étude de la cytotoxicité induite

Afin d'avoir un aperçu de la cytotoxicité potentiellement induite par la transfection de siARN avec des nanoparticules cLNPa, dans les conditions définies pour la culture 3D ([siARN] = 20 nM – N/P = 400/1 – [DOTAP] = 200 µg/mL), un test préliminaire mesurant les niveaux d'apoptose des cellules transfectées a été effectué à l'aide de CellEvent®, marqueur des caspases 3 et 7 (Figure VI-12).

La transfection de siARN, avec une concentration en DOTAP de 200 µg/mL contenu dans les particules cLNPa, induit une augmentation du marquage CellEvent® reflétant une légère augmentation de l'activité des caspases 3 et 7. Toutefois, l'intensité de fluorescence CellEvent® n'atteint pas le seuil d'intensité observé lors d'une induction d'apoptose. En outre, le pourcentage de cellules positives pour le CellEvent® est augmenté de 13,2%, suite à la transfection avec le complexe cLNPa/siARN dans les conditions précédemment décrites, par rapport aux cellules non-transfectées. Ainsi, environ 20% des cellules présentent une augmentation de l'activation des caspases 3 et 7, pour seulement 7% dans des conditions basales. Ces résultats indiquent que la concentration en

nanoparticules utilisée est probablement aux limites des doses utilisables avec ce type de particule, dans les conditions de culture tridimensionnelle de cellule PC3 non-GFP.

Un comparatif est réalisé avec les cellules transfectées par du siARN complexé à l'Oligofectamine®, utilisé à une concentration 4X (Figure VI-12). L'intensité de fluorescence est légèrement augmentée par rapport aux conditions basales (x 1,5) tandis que le pourcentage de cellule positive pour le CellEvent® est d'environ 13%. Cependant, ce vecteur ne permet qu'une faible efficacité d'inhibition fonctionnelle sur les cellules PC3 cultivées de façon tridimensionnelle.

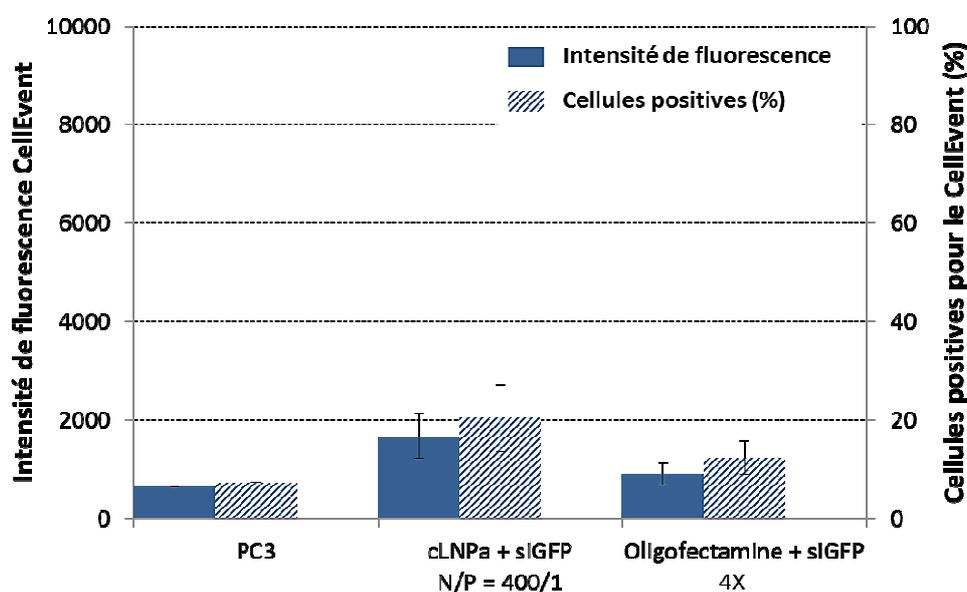


Figure VI-12. Cytotoxicité induite par la transfection de PC3 sous forme de sphéroïde avec des siARN : les cellules PC3 sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés à cLNPa ou à l'Oligofectamine®. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence. Un marqueur de l'apoptose, le CellEvent®, est incubé post-transfection pour établir un profil de cytotoxicité (n=3) ([siARN] = 20 nM – N/P = 400/1 – temps d'incubation = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10³ évènements (FACS BD LSRII – canal FITC).

Selon ces résultats, cLNPa semble montrer une légère cytotoxicité (13,2% des cellules positives à l'apoptose par rapport aux conditions basales). Néanmoins, une stratégie a été testée afin de palier à l'impact d'une concentration en cLNPa élevée, ceci par un changement de milieu de culture 24 heures après l'incubation du complexe (Figure VI-13). En admettant une internalisation des complexes cLNPa/siARN en moins de 24 heures, changer le milieu de culture par du milieu frais

supplémenté par du sérum de veau fœtal peut améliorer les conditions de culture, et ainsi favoriser la viabilité cellulaire en diminuant le temps d'exposition des cellules aux particules.

Cependant, cette modification du protocole entraîne une diminution de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle : alors que le protocole initial permet d'obtenir une inhibition de l'intensité de fluorescence sur 49% des cellules traitées, un changement du milieu de culture 24 heures après incubation ne permet d'avoir que 25% de cellules démontrant une réduction de l'intensité de fluorescence significative. Ainsi, ce changement de protocole induit une diminution de l'efficacité d'inhibition fonctionnelle par un facteur 1,9.

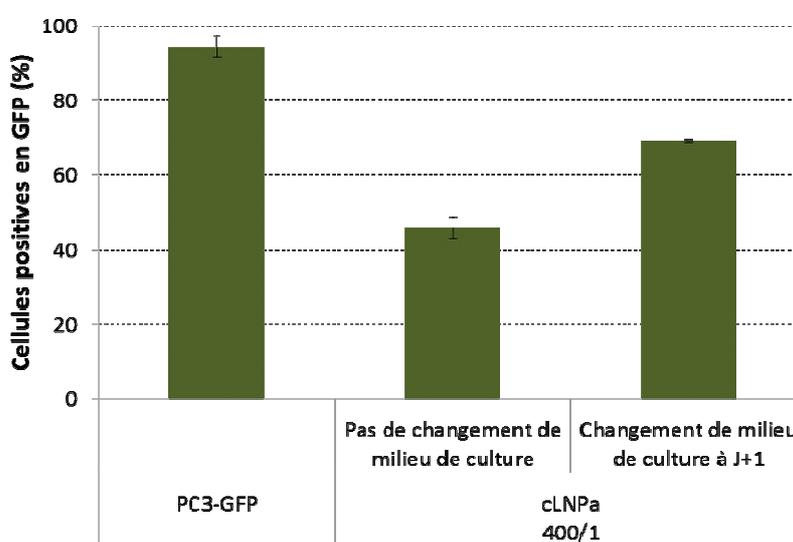


Figure VI-13. Cytotoxicité induite par la transfection de PC3 sous forme de sphéroïde avec des siARN : les cellules PC3 sont cultivées 96 heures sur du matrigel afin de former des sphéroïdes, puis transfectées pendant 72 heures par des siGFP complexés à cLNPa ou à l'Oligofectamine®. Le matrigel est dégradé et les sphéroïdes dissociés pour étudier la fluorescence (n=3) ([siARN] = 20 nM – N/P = 400/1 – temps d'incubation = 72 heures). Analyse par cytométrie en flux sur 10³ évènements (FACS BD LSRII).

Il semble donc préférable de maintenir le protocole en dépit d'une légère induction de l'apoptose. Une optimisation des conditions peut être imaginée par une amélioration des conditions de culture tridimensionnelle (adaptation de la matrice utilisée, de ses concentrations, ...) ou encore une modification de la concentration en nanoparticules cLNPa jusqu'à un équilibre efficacité/innocuité satisfaisant. Des tests complémentaires sont néanmoins nécessaires pour évaluer de manière plus précise l'impact de l'utilisation des cLNPa dans de telles concentrations au niveau de la cytotoxicité.

3. Discussion

Durant ces travaux de thèse, les tests préliminaires effectués sur les modèles cellulaires considérés comme difficiles à transfecter se concentrent essentiellement sur l'interaction des siARN avec les cellules traitées. C'est pourquoi cette partie de la transfection seulement peut être comparée aux travaux issus de la littérature.

Plusieurs études ont démontré une internalisation élevée de siARN transfectés dans des modèles cellulaires primaires. Notamment, Yang *et al.* ont visualisé que des siARN marqués par un fluorophore étaient internalisés dans trois modèles cellulaires primaires suite à une transfection avec des vecteurs de type Lipofectamine RNAimax et PEI (Figure VI-14) [22]. Sur les photographies rapportées par Yang *et al.*, l'internalisation des siARN dans tous les compartiments cellulaires des différents modèles est nettement visualisable par une fluorescence diffuse après 24 heures de transfection avec la Lipofectamine RNAimax. Avec le PEI comme vecteur, la distribution des siARN dans les cellules est moins homogène, notamment avec une concentration dans des vésicules du cytosol (Figure VI-14).

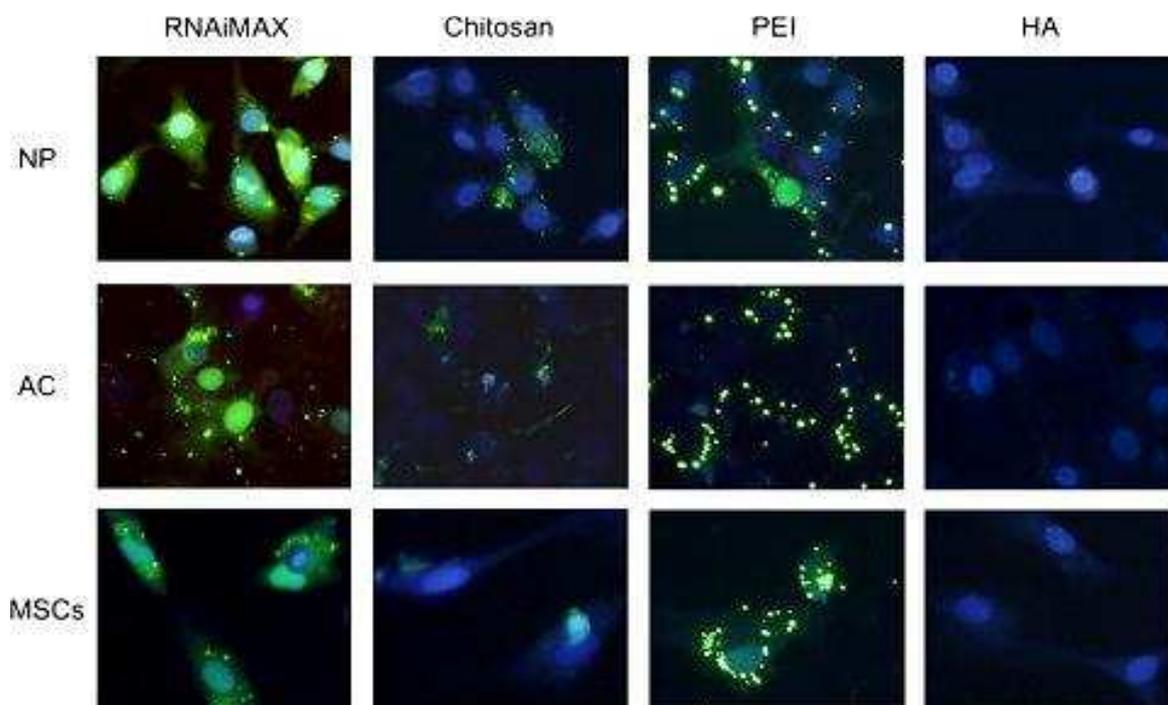


Figure VI-14. Internalisation de siARN dans des cellules primaires : étude de l'internalisation de siARN fluorescents à 20 nM après complexation avec de la Lipofectamine RNAimax®, du chitosan, du PEI ou de l'acide hyaluronique (HA). Les images ont été réalisées par l'équipe de Yang *et al.* 24 heures après transfection sur des noyaux pulpeux issus des disques intervertébraux des lombaires humains (NP), des chondrocytes articulaires (AC) et des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les noyaux sont marqués au DAPI tandis que les siARN fluorescent sont visualisables en vert (d'après Yang *et al.* [22]).

Ainsi, l'interaction des siARN avec les cellules primaires semble la plus élevée avec des vecteurs lipidiques, notamment la Lipofectamine RNAimax dans le cas de l'étude de Yang *et al.* D'ailleurs, cette internalisation est corrélée à une inhibition fonctionnelle élevée du gène ciblé, la GAPDH, dans les trois modèles cellulaires étudiés [22], résultat non-retrouvé avec les trois autres vecteurs testés. Au cours de ce chapitre, une comparaison a été effectuée concernant l'interaction des siARN avec les HUVEC lors de la transfection avec les nanoparticules cLNPa ou la Lipofectamine RNAimax. Une interaction 2,2 fois plus élevée a d'ailleurs été mesurée suite à la transfection de siARN-Alexa488 par rapport à une transfection avec le vecteur lipidique commercial (Figure VI-1). Ce résultat s'avère prometteur concernant une éventuelle inhibition fonctionnelle induite lors de la transfection. Néanmoins, des tests complémentaires restent à être effectués pour attester une internalisation, ainsi qu'un relargage efficace des siARN dans le compartiment cytoplasmique.

Cependant, les liposomes cationiques tels que la Lipofectamine RNAimax sont reconnus pour démontrer une certaine instabilité, notamment dans les milieux de culture contenant des protéines sériques. Ainsi, une autre étude a souhaité mesurer l'impact de l'intégration de polymère PEG, tensio-actif stabilisant les particules et améliorant leur furtivité, au niveau de l'internalisation dans un modèle cellulaire primaire [23]. Des lipoplexes issus de la complexation de siARN fluorescents avec un mélange DOPE/groupement pyridinium cationique (SAINT-MIX) ont été transfectés pendant 4 heures en présence de cellules primaires de type HUVEC [23]. En outre, des polymères PEG d'une taille de 2 Kda, couplés au DOPE, ont été intégrés dans la formulation à la place de 2% et 4% molaire de DOPE. En présence de PEG, le lipoplexe perd totalement sa faculté d'être associé aux cellules primaires traitées [23]. Pour rappel, cLNPa comprend jusqu'à 17% molaire de PEG dans la formulation nanoparticulaire. Ainsi, les nanoparticules lipidiques de type cLNPa semble apporter un avantage pour l'obtention d'un vecteur stable, présentant une innocuité élevée, mais également efficace pour la transfection de siARN dans les modèles cellulaires primaires.

L'interaction des siARN avec les cellules non-adhérentes de type Jurkat, suite à une étape de transfection, est également rapportée dans la littérature. En ce sens, Tezgel *et al.* ont démontré une interaction des siARN à 50 nM, complexés avec des peptides cationiques, avec des cellules de type Jurkat après 4 heures d'incubation [24]. En effet, en utilisant des vecteurs synthétiques dérivés de l'oligo-arginine (PTDM-1), cette équipe démontre une interaction significative avec ce modèle cellulaire. Cependant, cette association est fortement dépendante de la présence de sérum dans le milieu de culture utilisé : l'utilisation de milieu complet supplémenté par des protéines sériques inhibe fortement l'interaction des siARN avec les cellules de type Jurkat [24]. Ainsi, le protocole doit

être adapté pour une transfection de plusieurs heures dans un milieu dépourvu de sérum, avant d'ajouter du milieu complet sur les cultures cellulaires [24]. Ainsi, l'utilisation de vecteurs lipidiques tels que la Lipofectamine RNAimax® ou cLNPa permet de s'émanciper de cette contrainte, par une transfection directement dans le milieu de culture supplémenté, tout en favorisant l'interaction forte de siARN avec les cellules traitées. En outre, les tests effectués au cours de notre étude démontrent une interaction des siARN avec les cellules 2,5 fois plus élevée après transfection avec le vecteur cLNPa par rapport au vecteur Lipofectamine RNAimax®, permettant des perspectives prometteuses pour une utilisation sur ce type de modèle cellulaire. Néanmoins, des validations biologiques sur l'inhibition fonctionnelle induite par la transfection s'avère nécessaire pour prouver l'efficacité de ces vecteurs avec des cellules non-adhérentes.

Cardoso *et al.* ont étudié la transfection de siARN dans des cultures neuronales primaires [25]. Leurs travaux ont démontré la possible internalisation de siARN complexés à des liposomes cationiques ; néanmoins, cette internalisation est fortement dépendante d'une association de ce vecteur à la transferrine, une molécule connue pour faciliter l'internalisation de lipoplexes dans de nombreux types cellulaires [26, 27]. En ce sens, la transfection de siARN avec les liposomes cationiques contenant de la transferrine autorise une inhibition fonctionnelle du gène ciblé d'environ 50%, tandis que dans le même temps, la Lipofectamine 2000 utilisée comme vecteur contrôle, ne possédant pas de transferrine, ne permet qu'une inhibition fonctionnelle de 27% [25]. Lors de notre étude, les siARN complexés aux vecteurs cLNPa démontrent une interaction 61% supérieure aux siARN complexés à la Lipofectamine RNAimax, sur des cellules possédant des caractéristiques proches des neurones. Ainsi, avec des expériences supplémentaires visant à prouver l'internalisation de ces siARN, les vecteurs développés au cours de ces travaux de thèse peuvent présenter des perspectives intéressantes pour la transfection de siARN sur des modèles neuronales. En complément d'une efficacité de transfection potentiellement forte, ces vecteurs présentent des avantages importants en termes de stabilité, d'innocuité et de multifonctionnalité, notamment par l'encapsulation de molécules lipophiles.

En dépit de l'intérêt et du potentiel représenté par les modèles de culture cellulaire tridimensionnelle, peu de solutions réellement efficaces ou satisfaisantes existent à l'heure actuelle d'après nos connaissances. La plupart des essais voient une préparation de matrices dites activées, c'est-à-dire comprenant les complexes vecteurs/siARN avant le dépôt des cellules [28, 29]. De cette façon, la transfection s'effectue dès le dépôt des cellules, avant la formation des structures

tridimensionnelles. Néanmoins, les travaux de Zhang *et al.* se focalisent sur la transfection de siARN dans des structures tridimensionnelles, formées dans des matrices de collagène, avec des particules super-paramagnétiques possédant un revêtement de polymères PEI [30]. Toutefois, cette équipe utilise les propriétés de ces particules inorganiques pour imposer un champ magnétique, forçant leur pénétration dans la matrice et leur interaction avec les cellules en culture [30]. Au contraire, les nanovecteurs de type cLNPa utilisés au cours de ce chapitre démontrent une forte interaction avec les cellules cultivées de façon tridimensionnelle, par simple diffusion dans la matrice gélatineuse. Les nanoparticules cLNPa semble donc représenter une alternative intéressante pour la transfection dans les structures 3D, notamment en raison des caractéristiques évoquées concernant leur faible diamètre hydrodynamique, leur stabilité et leur innocuité, associées à l'efficacité d'inhibition fonctionnelle mesurée sur ces structures.

4. Conclusion

Les nanoparticules cLNPa ont démontré des caractéristiques très intéressantes pour la transfection de siARN fonctionnels sur les modèles cellulaires PC3-GFP et Hela-GFP. En effet, en complément d'une efficacité d'inhibition fonctionnelle de respectivement 65% et 80% sur les cellules PC3-GFP et Hela-GFP, ces vecteurs présentent une innocuité totale et des possibilités de multi-délivrance intéressantes, notamment pour le suivi de la distribution en fluorescence. L'objectif de ce chapitre était donc de vérifier la transposition de ces vecteurs pour des applications sur des modèles cellulaires considérés comme difficiles à transférer.

Ainsi, pour une utilisation de siARN à 20 nM et un rapport molaire N/P établie à 24/1 pour les particules cLNPa-DiD (voir chapitre V), nous avons vérifié l'interaction des siARN avec ces différents modèles cellulaires traités. Pour les cellules primaires, non-adhérentes et pour les cellules possédant une structure proche des neurones, la transfection de siARN avec cLNPa démontre une très forte interaction des séquences d'acides nucléiques avec les cellules traitées. En outre, les caractéristiques observées sont au-delà de celles obtenues avec l'utilisation de Lipofectamine RNAimax. Ces résultats prometteurs nécessitent désormais des validations biologiques concernant l'efficacité d'inhibition fonctionnelle de gènes ciblés.

La culture cellulaire tridimensionnelle représente également une limite importante pour la transfection de siARN. En effet, la conformation des cellules plus proches des conditions *in vivo*, l'existence de différentes couches cellulaires au sein d'une même structure sphéroïde, ainsi que l'environnement gélatineux de la matrice extracellulaire utilisée engendrent des difficultés pour l'accessibilité des cellules par les complexes vecteurs/siARN. Néanmoins, l'augmentation du nombre

de particules jusqu'à une concentration de 200 µg/mL en DOTAP, soit une quantité de particules lipidiques d'environ $8,2 \cdot 10^{12}$, permet d'obtenir une efficacité d'inhibition fonctionnelle lors de la transfection de siARN. Cette quantité de particule est environ 33 fois plus élevée que pour les expériences de transfection en culture cellulaire 2D avec les particules cLNPa, démontrant une nécessité d'un nombre plus élevé de nanovecteurs avec le changement d'environnement extracellulaire. En outre, les efficacités d'inhibition fonctionnelle, jusqu'à 50%, sont nettement supérieures aux résultats obtenus avec l'agent de transfection de référence, l'Oligofectamine®, qui induit une inhibition de l'intensité de fluorescence inférieure à 20%. Pour rappel, l'efficacité d'inhibition obtenue sur ce même modèle, PC3-GFP, mais cultivé en 2D allait jusqu'à 65%. Ainsi, la transposition à une culture tridimensionnelle reste assez proche des résultats obtenus en 2D. Néanmoins, des validations biologiques complémentaires restent nécessaires pour assurer une innocuité élevée du vecteur dans les concentrations utilisées.

Bibliographie

1. Li W, Xu X, Huang Y, Li Z, Yu G, Wang Z, Ding L, Tong D. Establishment and evaluation of a stable steroidogenic caprine luteal cell line. *Theriogenology*. 2012 Jul 15;78(2):263–72.
2. Cantrill C a, Skinner R a, Rothwell NJ, Penny JI. An immortalised astrocyte cell line maintains the in vivo phenotype of a primary porcine in vitro blood-brain barrier model. *Brain research*. 2012 Oct 15;1479:17–30.
3. Chen Y, Wei T, Yan L. Developing and applying a gene functional association network for anti-angiogenic kinase inhibitor activity assessment in an angiogenesis co-culture model. *BMC Genomics*. 2008;9:264-279.
4. Horbinski C, Stachowiak MK, Higgins D, Finnegan SD. Polyethyleneimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina. *BMC Neurosci*. 2001;2:2
5. Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods*. 2001;112:95-99.
6. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA and high-throughput applications. *Methods*. 2004;33:95-103.
7. Zhang C, Yagava P, Hughes J. Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells. *Methods*. 2004;33:144-150.
8. Karra D, Dahm R. Transfection techniques for neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(18):6171-6177.
9. Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *Journal of biomolecular techniques*. 2008 Dec;19(5):328–34.
10. Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tübing F, Thomas S, Kiebler M, Dahm R. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat. Protoc*. 2007;2(7):1692-704.
11. Tietz SM, Berghoff M. Gene silencing of MK2 in hard-to-transfect human U937 cells. *J Biomol Tech*. 2012;23(2):47-50.

12. Leus NGJ, Talman EG, Ramana P, Kowalski PS, Woudenberg-Vrenken TE, Ruiters MHJ, Molema G. Effective siRNA delivery to inflamed primary vascular endothelial cells by anti-E-selectin and anti-VCAM-1 PEGylated SAINT-based lipoplexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;459(1-2):40-50.
13. Bott K, Upton Z, Schrobback K, Ehrbar M, Hubbell J a, Lutolf MP, Rizzi SC. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(32):8454–64.
14. Li C-li, Tian TAO, Nan K-jun, Zhao NA, Guo Y-huan, Cui JIE, Wang J, Zhang WG. Survival advantages of multicellular spheroids vs .monolayers of HepG2 cells in vitro. *Medicine*. 2008;;1465–71.
15. Qutub A a, Popel AS. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. *BMC systems biology*. 2009 Jan;3:13.
16. Ayala P, Lopez JI, Ph D, Desai TA, Ph D. Microtopographical Cues in 3D Attenuate Fibrotic Phenotype and Extracellular Matrix Deposition : Implications for Tissue Regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;16(8).
17. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science*. 2012 Jul 1;125(Pt 13):3015–24
18. Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A, Beebe DJ. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PloS one*. 2013 Jan;8(10):e76373.
19. Valvi-Nagy K. Three-dimensional tumor cell cultures and the role of tissue biorepositories in personalized medicine. *J Clin Anat Pathol*. 2013;1:1-2.
20. Breslin S, O’Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link to drug discovery. *Drug discovery today*. 2013;18:240-249.
21. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*. 2003 Jul;30(3):256–68.
22. Yang H-yin, Vonk L a, Licht R, van Boxtel AMG, Bekkers JEJ, Kragten AHM, Hein S, Varghese OP, Howard KA, Oner FC, Dhert WJA, Creemmers LB. Cell type and transfection reagent-dependent effects on viability, cell content, cell cycle and inflammation of RNAi in human primary mesenchymal cells. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2014 Mar 12;53:35–44.

23. Leus NGJ, Talman EG, Ramana P, Kowalski PS, Woudenberg-Vrenken TE, Ruiters MHJ, Molema G, Kamps JA. Effective siRNA delivery to inflamed primary vascular endothelial cells by anti-E-selectin and anti-VCAM-1 PEGylated SAINT-based lipoplexes. *International journal of pharmaceuticals*. 2014 Jan 1;459(1-2):40–50.
24. Tezgel a Ö, Gonzalez-Perez G, Telfer JC, Osborne B a, Minter LM, Tew GN. Novel protein transduction domain mimics as nonviral delivery vectors for siRNA targeting NOTCH1 in primary human T cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013 Jan;21(1):201–9.
25. Cardoso a LC, Simões S, de Almeida LP, Plesnila N, Pedroso de Lima MC, Wagner E, Culmsee C. Tf-lipoplexes for neuronal siRNA delivery: a promising system to mediate gene silencing in the CNS. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2008 Dec 8;132(2):113–23.
26. Cardoso a LC, Simões S, de Almeida LP, Pelisek J, Culmsee C, Wagner E, Pedroso de Lima MC. siRNA delivery by a transferrin-associated lipid-based vector: a non-viral strategy to mediate gene silencing. *J. Gene Med*. 2007;9(3):170–183.
27. Da Cruz MT, Cardoso AL, de Almeida LP, Simões S, Pedroso de Lima MC. Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury. *Gene Ther*. 2005;12(16):1242-1252.
28. Tierney EG, Duffy GP, Hibbitts AJ, Cryan S-A, O'Brien FJ. The development of non-viral gene-activated matrices for bone regeneration using polyethyleneimine (PEI) and collagen-based scaffolds. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012 Mar 10;158(2):304–11.
29. Yin L, Zhao X, Ji S, He C, Wang G, Tant C, Gu S, Yin C. The use of gene activated matrix to mediate effective SMAD2 gene silencing against hypertrophic scar. *Biomaterials*. 2014; 35:2488-2498.
30. Zhang H, Lee M-yeal, Hogg MG, Dordick JS, Sharfstein ST. Gene Delivery in Three-Dimensional Nanoparticles. *ACS Nano*. 2010;4(8):4733–43.

CONCLUSIONS

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de développer un vecteur générique autorisant la transfection de diverses séquences d'ARN interférent pour induire la régulation spécifique de gènes ciblés dans différents modèles cellulaires. L'intérêt d'une telle étude était de surpasser les outils actuellement disponibles en répondant aux critères exigés pour une utilisation dans différentes applications : transfection *in vitro*, criblage à haut-débit, délivrance de siARN dans des modèles cellulaires difficiles à transfecter et dans des cultures cellulaires tridimensionnelles, transposition possible pour des applications *in vivo*.

En ce sens, des nanoparticules lipidiques cationiques hautement stables ont été développées pour une stratégie de complexation de surface. Le caractère cationique de ces nanovecteurs, issus d'un plan mathématique, autorise la complexation efficace de milliers de séquences d'ARN interférents différentes à partir d'une unique formulation ; cette propriété offre un intérêt majeur pour des études de criblage à haut-débit notamment.

Par ailleurs, l'inhibition fonctionnelle induite par le transport de siARN avec les vecteurs cLNP, développés dans notre étude, démontre une efficacité de transfection comparable à quatre des meilleurs agents de délivrance commerciaux (peptidiques, polymériques et lipidiques), sur le modèle cellulaire PC3-GFP. Cette forte efficacité d'inhibition fonctionnelle est d'ailleurs rapportée sur d'autres modèles cellulaires et avec différents ARN interférents, démontrant le caractère potentiellement générique de la délivrance avec cLNP.

De plus, les nanoparticules lipidiques offrent l'avantage d'une très forte rétention des siARN en surface, autorisant des temps longs de préparation sans affecter l'efficacité de transfection fonctionnelle. Dans le cadre de criblage à haut-débit où la préparation de centaines de complexe peut prendre jusqu'à plusieurs heures, les nanoparticules cLNP présentent un avantage supérieur pour maintenir les mêmes conditions entre tous les échantillons et garder la même efficacité d'inhibition fonctionnelle, contrairement à la Lipofectamine RNAimax notamment.

En outre, la conception de ces nanoparticules est issue de modifications apportées à un vecteur lipidique utilisé comme agent de contraste. En apportant des variations uniquement au niveau de la couronne, les propriétés d'encapsulation de molécules lipophiles sont maintenues, fournissant alors un vecteur de délivrance multiple : tandis que la couronne cationique permet la complexation avec des séquences d'acides nucléiques (siARN, mimics de miARN, séquences d'ADN), le cœur non cristallin hydrophobe permet l'encapsulation de molécules lipophiles telles que des anticancéreux ou, comme dans notre étude, des fluorophores.

Enfin, les nanoparticules lipidiques cationiques cLNP ont démontré une innocuité cellulaire élevée sur le modèle PC3, autorisant une large adaptation des concentrations en vecteur lors des expériences de transfection. De cette façon, ces nanoparticules permettent une augmentation majeure des concentrations pour s'adapter en fonction du modèle cellulaire traité. En effet, certaines cellules sont réputées pour être difficiles à transférer et cette stratégie d'augmentation des concentrations peut s'avérer être une réponse potentielle pour pallier à ces limites. Ainsi, les résultats d'internalisation des siARN après transfection avec cLNPa démontrent des perspectives intéressantes pour la transfection de cellules primaires, non-adhérentes et également neuronales. Suivant une stratégie d'augmentation des concentrations en vecteur, des résultats très prometteurs ont été rapportés dans ce manuscrit concernant la transfection fonctionnelle de cellules PC3 cultivées de façon tridimensionnelle. En effet, d'après nos connaissances, aucun vecteur synthétique (peptide, polymère ou lipide) n'a démontré des résultats d'inhibition fonctionnelle aussi élevés, en atteste les faibles inhibitions obtenues avec l'Oligofectamine lors de notre étude.

Par ailleurs, cette innocuité cellulaire élevée permet d'envisager une transposition vers des applications *in vivo*. Comme nous l'avons mentionné, les particules cLNP sont issues de modifications apportées à des vecteurs lipidiques utilisés pour des applications *in vivo*. La présence de polymère PEG en surface offre des possibilités de furtivité à la particule, augmentant alors les temps de circulation. En outre, les tests de stabilité colloïdale ayant démontré un maintien élevé de l'intégrité des particules, même en présence de protéines sériques, ce vecteur devient dès lors envisageable pour la délivrance, ou la multi-délivrance *in vivo*. En complément de ces propriétés prometteuses, des améliorations de la formulation restent possibles en raison du caractère versatile de ces particules cationiques. En effet, la surface des particules peut être fonctionnalisée, notamment par l'utilisation de polymère PEG possédant des fonctions réactives en fin de chaîne. De cette façon, des polymères (chitosan, polylysine, ...), des peptides (CPP) ou même des anticorps peuvent être ajoutés à la formulation des nanoparticules afin d'améliorer leurs propriétés, particulièrement concernant le ciblage actif et/ou l'échappement endosomal. Alors que le ciblage actif peut induire une biodistribution hautement sélective (co-culture *in vitro* ou applications *in vivo*), l'amélioration de l'échappement endosomal reste l'une des limites importantes décrites dans la littérature qu'il est nécessaire d'optimiser. Néanmoins, de telles perspectives exigent des validations biologiques complémentaires concernant la distribution et les risques de toxicité de ces vecteurs cationiques.

En outre, ces nanoparticules développées au cours de ces travaux de thèse possèdent un avantage primordial en vue d'un transfert industriel : une formulation facile, rapide et ne dépendant pas de l'utilisation de solvant. Même si la technologie adoptée au cours de cette étude utilise l'application d'ultrasons par une sonde conique, la formulation peut être réalisée par d'autres méthodes favorisant une production de masse. En effet, des entreprises telles que Capsum® utilisent des procédés d'homogénéisation haute-pression pour produire plusieurs dizaines ou centaines de kilo par jour de nanoparticules lipidiques de type LNP, pour des applications cosmétiques principalement. Dès lors, les nanoparticules cLNP étant basées sur des formulations similaires peuvent être transposables à l'industrialisation.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de développer des vecteurs lipidiques possédant des propriétés en adéquation avec des applications de transfection d'ARN interférents *in vitro*, permettant notamment le criblage à haut-débit, et proposant des perspectives intéressantes pour l'étude sur des modèles difficile à transfecter et des cultures cellulaires tridimensionnelles. Par ailleurs, leurs caractéristiques avantageuses offrent de fortes possibilités de transfert industriel et pour des applications *in vivo*, démontrant le potentiel élevé de ces formulations nanoparticulaires.

ANNEXES

ANNEXE 1. Optimisation du plan de travail

L'utilisation de siARN, composés de courts fragments d'ARN, nécessite de travailler dans des conditions particulières exemptes de nucléase. En effet, ces enzymes ayant la particularité de dégrader les séquences d'acides nucléiques sont très solides, les rendant réfractaires à de nombreuses méthodes de décontamination [1]. Ainsi, la limitation de l'exposition à ces nucléases, en développant un environnement propre et dépourvu au maximum de RNase, ne peut que favoriser les conditions d'étude. Afin de mesurer l'impact d'expérimentations dans des conditions non-optimisées, des tests de transfection de siARN fonctionnels ont été effectués sur des modèles U2OS sur-exprimant la protéine GFP (voir protocole page 140). Ainsi, ces cellules ont été transfectées 72 heures par des siGFP, complexés au vecteur Lipofectamine RNAimax, suivant trois conditions différentes.

Dans la première condition, le complexe siARN/liposome cationique se fait de manière classique, sous PSM de type 2 (Figure A-1). L'inhibition de l'intensité de fluorescence résultante est totale, démontrant des conditions optimales et une grande efficacité du vecteur sur ce modèle cellulaire (Figure A-1).

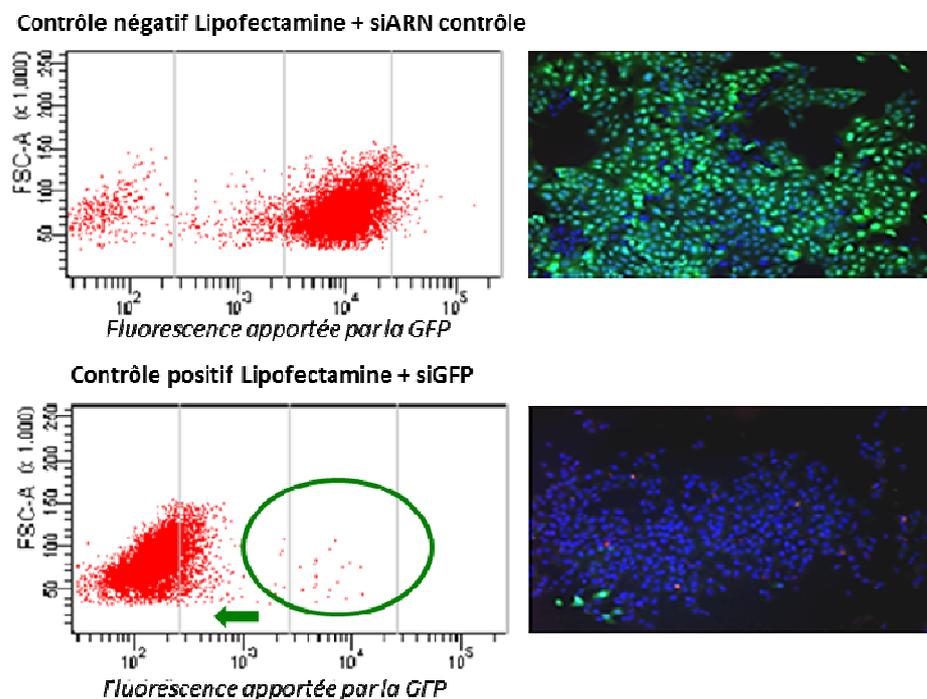


Figure A-1. Inhibition de l'expression de la GFP sur le modèle cellulaire U2OS-GFP : les cellules U2OS-GFP ont été transfectées 72 heures des siGFP complexé à la Lipofectamine RNAimax ([siGFP] = 20 nM – quantités conseillées par le fournisseur). Analyse par cytométrie en flux sur 104 évènements (n=3) (FACS BD LSRII). Images issues de microscopie d'épifluorescence (marquage du noyau au DAPI).

Cependant, dans une seconde condition, le complexe Lipofectamine RNAimax/siARN est mis en contact de la sonde à ultrason utilisée pour formuler les particules. Un simple contact de 20 minutes, sans activer le processus d'ultrason, induit une diminution de 50% de l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence (Figure A-2). En effet, sur le profil d'expression de fluorescence disponible figure A-2, deux populations se différencient : l'une avec une inhibition totale de l'intensité de fluorescence et l'autre avec une intensité de fluorescence maintenue par rapport aux conditions basales.

Dans les mêmes conditions, mais avec un lavage spécifique de la sonde à ultrason par un agent d'élimination des RNase, avant la mise en contact du complexe, l'efficacité d'inhibition fonctionnelle est totalement restaurée (Figure A-2).

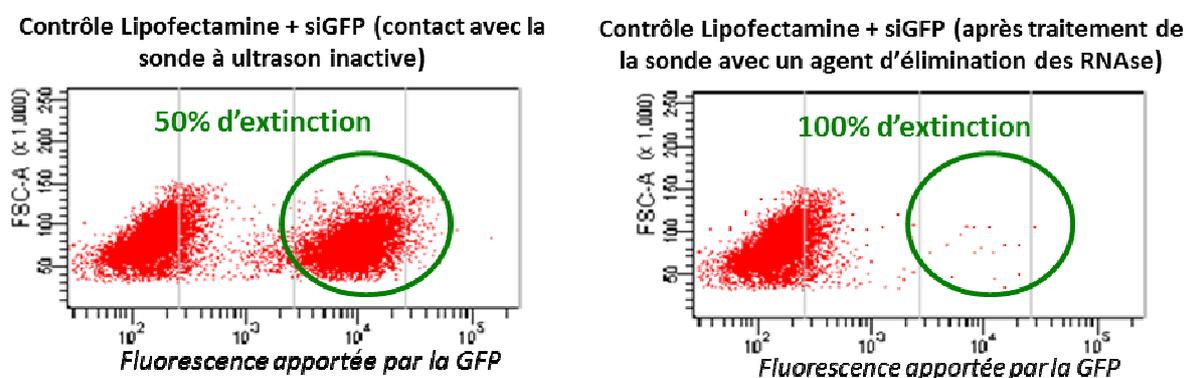


Figure A-2. Inhibition de l'expression de la GFP sur U2OS-GFP – contrôle de l'environnement : les cellules U2OS-GFP ont été transfectées 72 heures avec un complexe siGFP/Lipofectamine RNAimax ayant été en contact durant 20 minutes avec une sonde à ultrason, ayant subi ou non un traitement spécifique contre les RNases ($n=3$) ([siGFP] = 20 nM – quantités conseillées par le fournisseur). Analyse par cytométrie en flux sur 10⁴ évènements (FACS BS LSRII).

Ce résultat témoigne de l'impact que peut avoir un environnement non-optimisé sur l'efficacité d'inhibition fonctionnelle induit par la transfection de siARN. Les nanoparticules lipidiques de type cLNP étant formulées dans un laboratoire de chimie non-exempt de RNase, des précautions supplémentaires sont importantes. Ainsi, les outils nécessaires à la formulation des vecteurs cLNP ont été lavés avec un produit détruisant les RNases et stérilisés par autoclave. Les étapes de complexation et de transfection se sont ensuite déroulées sous un PSM de type II afin d'éviter toute contamination et permettre une optimisation des conditions de travail.

ANNEXE 2. Amélioration du protocole de complexation

La complexation entre les siARN et les nanoparticules cLNP est permise par un protocole simple et rapide, nécessitant une étape de mélange de 30 minutes à 700 rpm. Toutefois, ce temps de mélange pourrait être limitant pour certaines applications, notamment pour du criblage à haut-débit qui exigerait alors une organisation particulière. En effet, malgré une rétention forte autorisant le maintien des conditions équivalentes entre des milliers de complexes en parallèle, l'utilisation d'un mélangeur pour une complexation à 700 rpm peut exiger une adaptation lors de la création des milliers de complexes. L'une des solutions envisagées pourrait être une réduction du temps de complexation. Cependant, au niveau de l'état de l'art, un équilibre est décrit entre la concentration en siARN, la vitesse et le temps de mélange (Figure A-3).

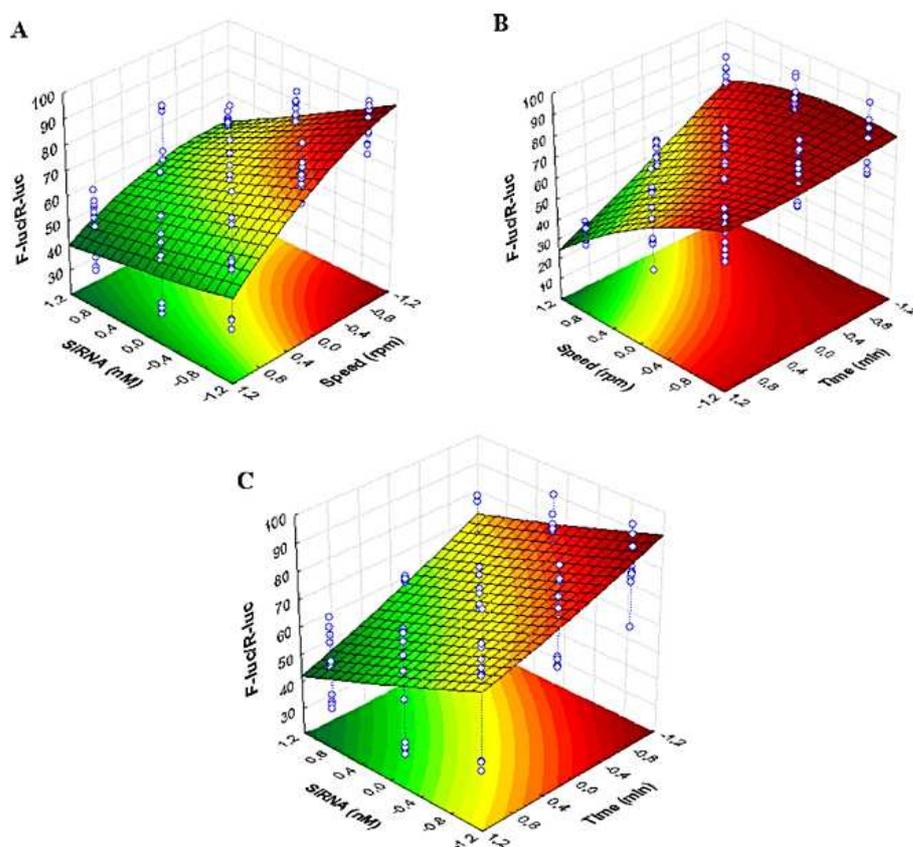


Figure A-3. Impact des conditions de complexation sur l'efficacité de transfection : la concentration en siARN, la vitesse et le temps de complexation sont trois paramètres ayant un impact important sur l'efficacité de transfection avec des liposomes cationiques. L'efficacité de transfection est représentée en ordonnée et matérialisée par différentes couleurs allant du rouge (faible efficacité de transfection fonctionnelle) au vert (forte efficacité de transfection fonctionnelle) (d'après Barichello et al., 2012 [2]).

En utilisant des liposomes cationiques, une vitesse de complexation plus élevée accroît l'efficacité de transfection fonctionnelle (A), matérialisée par les zones vertes. Pour une vitesse de mélange élevée, un temps de complexation plus long permet également d'augmenter l'efficacité de transfection (B). En revanche, le seul changement de la concentration en siARN ne suffit pas à améliorer significativement l'efficacité de transfection fonctionnelle (A et C). Ainsi, l'utilisation de liposomes cationiques exige certaines contraintes de turbulence et de temps au niveau de l'étape de complexation pour permettre des efficacités de transfection fonctionnelle optimales. Il est alors légitime d'envisager un comportement proche pour les nanoparticules de type cLNP. C'est pourquoi, dans cette hypothèse, des expériences de transfection fonctionnelle ont été réalisées sur des cellules PC3-GFP avec des complexes cLNPa/siARN ayant subi différents temps de complexation à 700 rpm (Figure A-4).

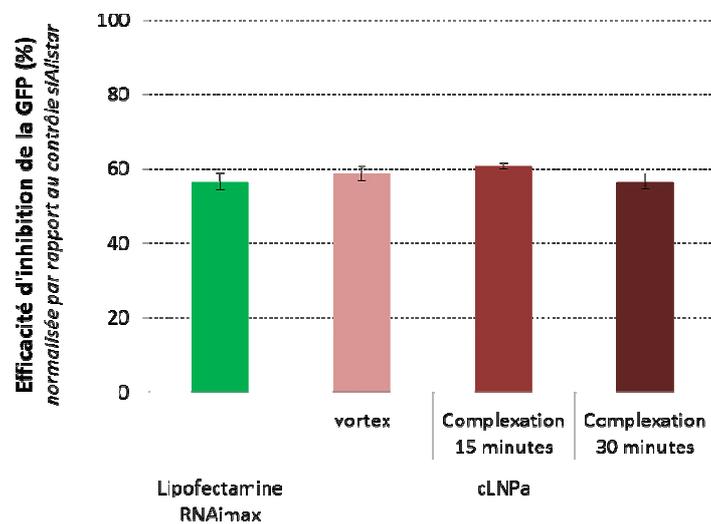


Figure A-4. Optimisation du protocole de complexation : Les cellules PC3-GFP ont été transfectées par des siGFP complexés à la Lipofectamine RNAi-max (vert) ou aux cLNPa-DiD (rouge). Plusieurs protocoles de complexation ont été testés : les complexes cLNPa/siARN ont été vortexés brièvement (rouge clair), ou homogénéisés à l'aide d'un mélangeur à 700 rpm pendant 15 minutes (rouge moyen) ou 30 minutes (rouge foncé) à 700 rpm ($n=3$) (siARN = 20 nM – N/P = 24/1). Analyse par cytométrie en flux sur 10^4 évènements (FACS BD LSRII).

Contrairement aux résultats obtenus par Barichello *et al.* sur les liposomes cationiques, aucune modification de l'efficacité d'inhibition n'a été observée suivant le protocole de complexation utilisé (Figure A-4). En effet, l'efficacité d'inhibition de l'intensité de fluorescence reste d'environ 60% quel que soit le temps de mélange utilisé. La complexation peut ainsi s'effectuer très rapidement sans affecter l'efficacité de transfection, apportant un atout supplémentaire pour ce type de particule comparé aux liposomes cationiques notamment.

ANNEXE 3. Optimisation des formulations cLNPa pour la rétention

Les particules cationiques les plus petites, cLNPa, n'ont vraisemblablement aucun besoin d'être améliorées en ce qui concerne leur faculté de rétention. En revanche, cLNPa autorise une légère fuite de siARN, jusqu'à 17% des séquences d'acides nucléiques complexées, après incubation pendant 6 heures dans un milieu de culture supplémenté par du sérum de veau fœtal (voir chapitre IV). Dans l'objectif d'un maintien des conditions exactes entre différents complexes préparés à différentes heures d'intervalle, une stratégie peut être envisagée pour palier à ce défaut de rétention. La versatilité des nanoparticules cLNPa permet des modifications simples de la couronne ; une stratégie dite de couche par couche (ou *layer-by-layer*) peut être établie afin de recouvrir les siARN, une fois la complexation effectuée (Figure A-5) [3, 4].

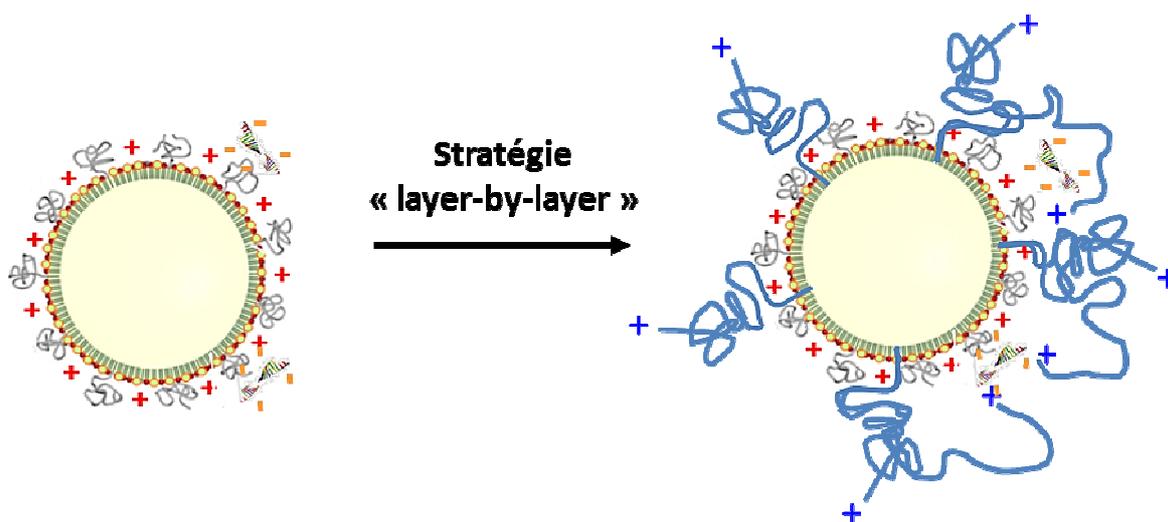


Figure A-5. Stratégie de rétention des siARN couche par couche : les cLNPa peuvent intégrer des polymères cationiques protégeant les siARN en se repliant.

Dans notre étude, des polymères cationiques de type PEG, possédant un groupement terminal ammonium, ont été intégrés dans la formulation à la place des polymères neutres. En outre, ces polymères chargés possèdent une taille de 5 kD contrairement aux polymères neutres en faisant seulement 2 kD (voir Figure A-6).

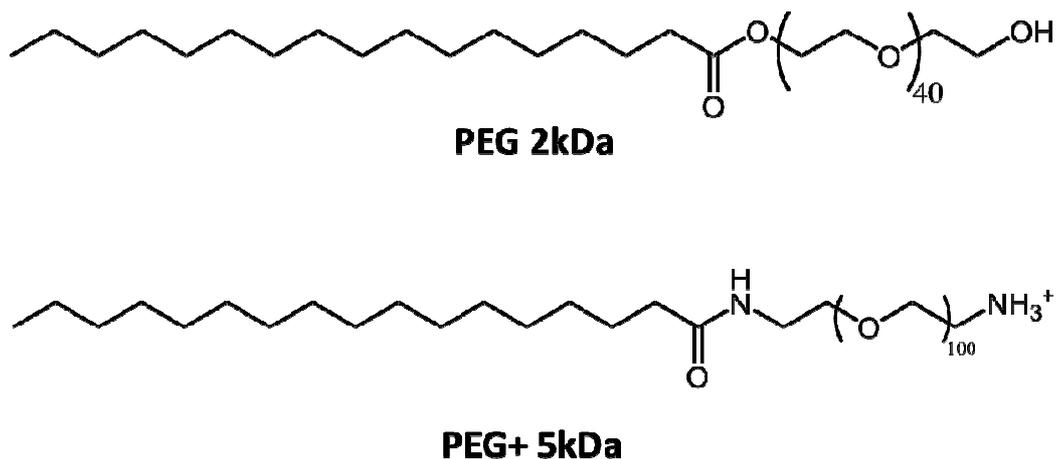


Figure A-6. Structure des polymères PEG utilisés : les polymères PEG+ présentent un groupement terminal ammonium et une chaîne de 100 unités éthylène.

Les paramètres physico-chimiques de la particule sont visualisés après intégration de diverses concentrations massiques de PEG+5k à la place du PEG 2k neutre (Figure A-7). L'augmentation du remplacement des PEG 2kD neutres par du PEG+ 5kD, de 25% à 100% (m/m) induit une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules cLNpb, sans modification significative du potentiel zêta (Figure A-7). Alors que les nanoémulsions cLNpb, n'ayant subi aucune modification, possèdent un diamètre hydrodynamique de 73 nm, un remplacement de 100% de PEG 2kD par des PEG+ 5kD (m/m) provoque une augmentation de taille de l'ordre de 24 nm.

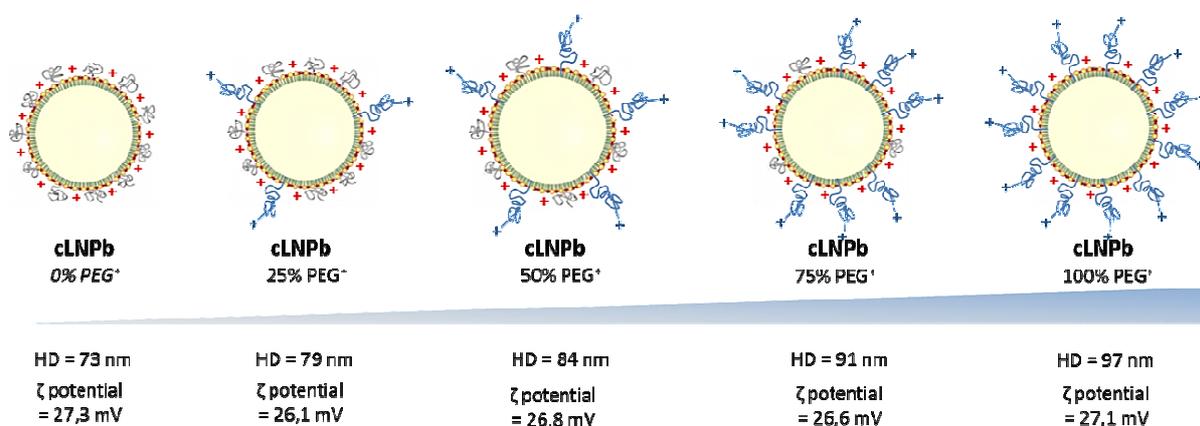


Figure A-7. Caractérisation des cLNpb possédant des polymères cationiques : le remplacement des PEG neutres par des PEG cationiques entraîne une variation du diamètre hydrodynamique sans modifier le potentiel zêta.

Nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer cette évolution. Pour la première, les PEG+ 5kD utilisés possèdent 100 unités éthylène contrairement aux PEG 2kD neutres qui n'en possèdent que 40. Cette variation de taille pour le polymère utilisé peut engendrer l'évolution du diamètre hydrodynamique observée. Pour la seconde hypothèse, le remplacement des PEG 2kD neutres par des PEG+ 5kD s'est effectué en fonction d'une concentration massique. Or, ces deux types de polymère possèdent un poids moléculaire différent; ainsi, l'augmentation de la concentration massique en polymère PEG+ 5kD, au détriment du polymère 2kD, entraîne une diminution du pourcentage molaire en polymère par rapport à la particule totale (Tableau A-1). En effet, avec la différence de poids moléculaire entre ces deux types de polymère, il est nécessaire d'avoir une concentration massique de PEG 2kD plus élevée pour obtenir la même quantité de matière que celle obtenue avec les PEG+ 5kD (Tableau A-1). Cette réduction de la quantité de polymère totale, par rapport à la particule, correspond à une diminution de la quantité de tensio-actif, induisant alors un diamètre hydrodynamique plus élevé.

	cLNpb	cLNpb 25% PEG+	cLNpb 50% PEG+	cLNpb 75% PEG+	cLNpb 100% PEG+
PEG 2kD (% molaire totale)	12,04	9,20	6,25	3,18	0,00
PEG+ 5kD (% molaire totale)	0,00	1,23	2,50	3,82	5,19
PEG total	12,04	10,43	8,75	7,00	5,19

Tableau A-1. Mesure de la concentration molaire en polymère PEG par rapport à la particule totale : le remplacement des PEG 2kD par des PEG+ 5kD (m/m) induit une diminution du pourcentage molaire total en PEG.

Cependant, la charge globale de la particule n'est pas modifiée malgré l'apport de tensio-actifs cationiques. L'hypothèse émise est que la longueur importante de la chaîne polyéthylène du PEG+ 5kD entraîne un repliement, cachant ainsi la charge lors de la mesure. Par ailleurs, la stabilité colloïdale de ces particules modifiées est garantie par un maintien du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta pendant un mois post-formulation, lors d'une conservation à 40°C recommandée par le développement pharmaceutique pour l'étude de vieillissement accéléré [5] (données non montrées).

Ces formulations cLNpb modifiées ont ensuite été testées pour vérifier l'amélioration de la rétention suite à l'établissement d'une stratégie couche par couche (Figure A-8). Ainsi, les complexes

cLNPs modifiées/siARN ont été incubés durant différentes périodes dans le milieu de culture utilisé pour la transfection (voir protocole page 140). La présence de siARN sous forme libre démontre alors les niveaux de rétention permis par les nanovecteurs testés. L'augmentation de la concentration en polymère PEG+ 5kD est corrélée à une amélioration des taux de rétention des siARN, dans le milieu de culture utilisé pour la transfection. En effet, l'établissement de la stratégie couche par couche provoque une diminution de la quantité de siARN sous forme libre, notamment après 6 heures d'incubation dans le milieu de culture complet (Figure A-8) : alors qu'une formulation cLNPs contenant uniquement des PEG 2kD entraîne un relargage pouvant aller jusqu'à 40% des siARN, les particules contenant 100% de PEG+ 5kD permet une rétention de 98% des siARN complexés (Figure A-8).

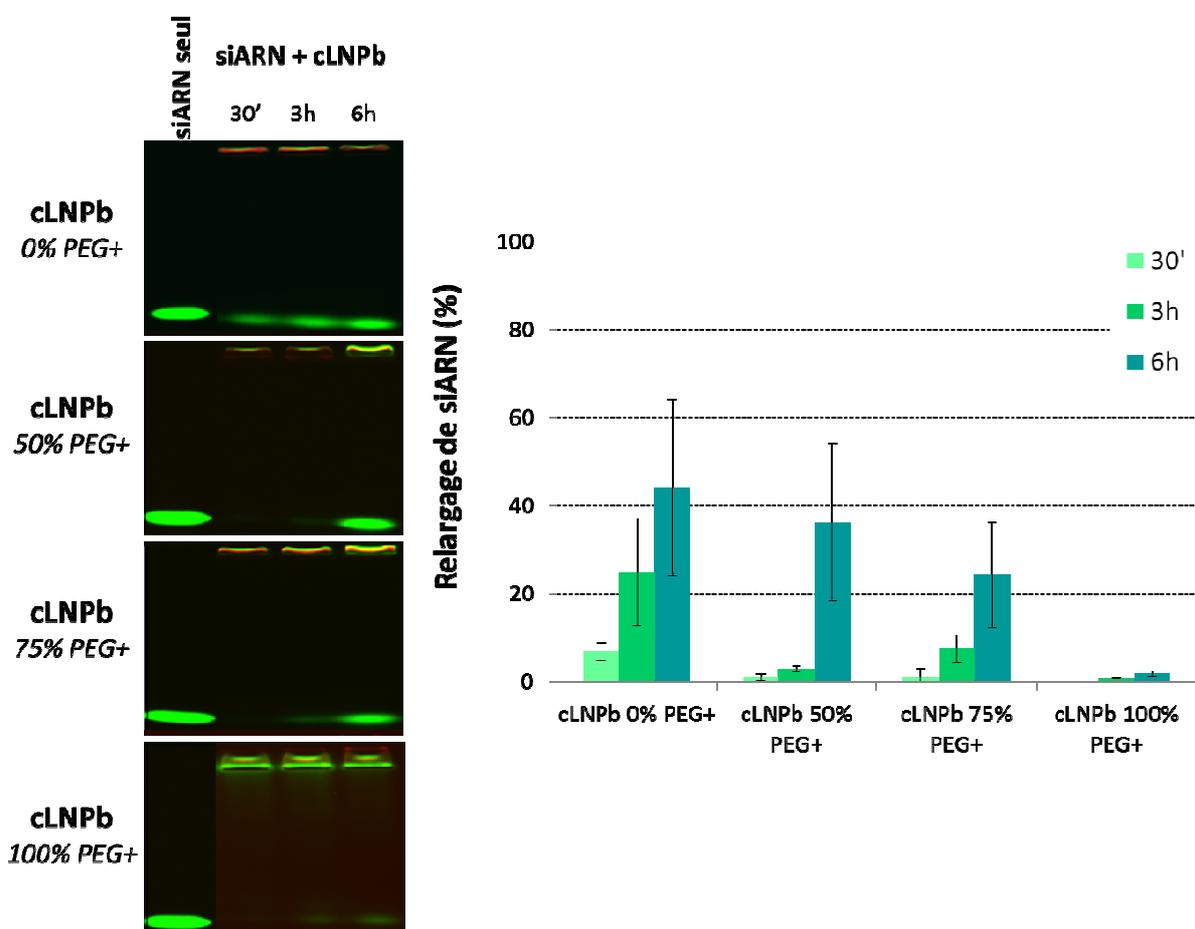


Figure A-8. Amélioration de la rétention des siARN sur cLNPs par une stratégie layer-by-layer : la quantité de siARN relarguée diminue avec l'augmentation de PEG+ dans la formulation de la particule (n=5).

Ces expériences effectuées sur la coquille des nanoparticules cLNPs, afin d'améliorer la rétention des siARN notamment, peut être considérée comme une preuve de concept concernant les possibilités d'ingénierie de surface. Le greffage d'autres molécules à la surface des particules peut être envisagé, telles que des polymères (chitosan [6], dextran [7],...) ou des peptides (polyarginine [8], proline [9], ...), afin d'améliorer les propriétés du nanovecteur. En effet, il a été rapporté au cours du chapitre II que des peptides de type CPP peuvent améliorer les étapes d'internalisation au sein des cellules, tandis que des polymères synthétiques cationiques augmentent les caractéristiques d'échappement endosomal. En outre, des molécules d'adressage telles que des anticorps peuvent également être envisagées dans une stratégie de ciblage actif de cellules spécifiques.

Néanmoins, des tests complémentaires nécessitent d'être effectués afin de vérifier si ces modifications n'entravent pas les efficacités de transfection fonctionnelle, notamment lors de l'internalisation des complexes, des mécanismes d'échappement endosomal et/ou de relargage des siARN dans le compartiment cytoplasmique.

ANNEXE 4. Information complémentaire sur l'imagerie hyperspectrale

1. Principe de l'imagerie hyperspectrale

Tout matériau émet un rayonnement caractéristique qui peut être représenté par sa luminance en fonction de la longueur d'onde. Cette donnée caractéristique du matériau constitue sa signature spectrale. La spectro-imagerie consiste à acquérir simultanément le spectre de chaque pixel de l'image sur un intervalle de longueur d'onde défini. Le but est d'acquérir une pile d'images dans plusieurs bandes spectrales plus ou moins étroites et adjacentes à l'intérieur de l'intervalle spectral d'intérêt. Ainsi, à une image en deux dimensions (x, y) est ajoutée une troisième dimension (x, y, λ) où λ représente la longueur d'onde (nm). On parle alors d'images spectrales cubes (Figure A-3).

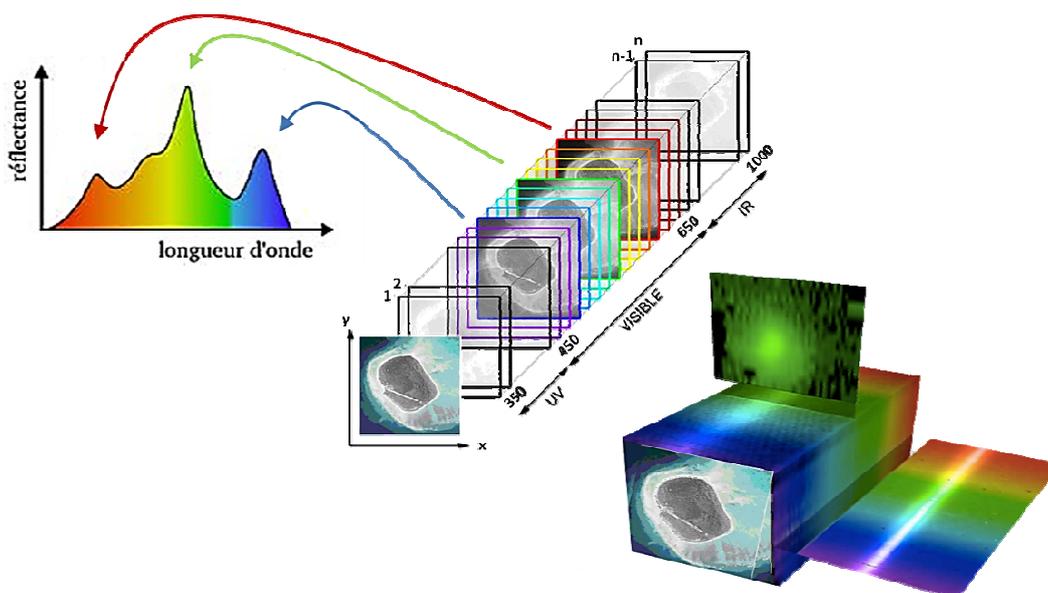


Figure A-9. Principe de l'imagerie hyperspectrale : Chaque pixel d'une image est analysé suivant toutes les longueurs d'onde d'un intervalle défini.

L'image cube est dite « multispectrale » pour un nombre de bandes spectrales mesurées inférieur à dix et « hyperspectrale » pour un nombre de bandes supérieur à dix. Une fois les spectres continus pour chaque pixel de l'image reconstruite, l'identification d'un matériau particulier dans la

zone étudiée peut alors être réalisée si la signature spectrale de ce dernier est connue. Dans le cadre de notre étude, une image a été capturée tous les deux nanomètres sur un intervalle de 400 à 1000 nm, soit une compilation de 300 images monochromatiques permettant de définir le spectre de chaque pixel.

2. Étude de l'internalisation des cLNP

L'objectif est d'étudier une solution de nanoparticules et d'identifier leurs spectres caractéristiques. Ensuite, après une incubation de ces nanoémulsions sur les cellules, les spectres de chaque pixel sont définis et comparés aux spectres caractéristiques des nanoparticules en solution, ceci afin de déterminer la quantité de nanoparticule n'ayant pas été internalisée.

L'identification des spectres caractéristiques des nanoémulsions internalisées est cependant plus complexe : leur nature lipidique induit une modification de leur structure au cours de l'internalisation, en particulier une fois dans les vésicules endosomales où des variations des pH ont lieu. Ainsi, la stratégie la plus logique pour repérer les nanoparticules à l'intérieur des cellules consiste à établir les spectres des cellules non traitées, puis analyser les variabilités spectrales induites par l'incubation des nanoparticules.

2.1. Complément d'information sur l'internalisation de cLNPb

Les nanoparticules de type cLNPb, possédant un diamètre hydrodynamique supérieur (environ 73 nm), permettent une étude plus facile que les cLNPa par ce procédé. En premier lieu, des images des cLNPb en solution ont été prises dans les 300 bandes spectrales prédéfinies afin d'établir un spectre caractéristique à partir des spectres obtenus (Figure A-4). Ces données autorisent une identification des cLNPb non-internalisées lors de l'incubation avec les cellules PC3 (en vert sur les photographies). Ensuite, différents spectres sont issus des images de cellules incubées 30 minutes ou 120 minutes en présence de cLNPb (Figure A-4). Après soustraction des signatures spectrales des cellules seules, il est possible de définir les spectres caractéristiques de cLNPb après 30 minutes (rouge) ou 120 minutes (blanc) d'incubation. Les analyses démontrent d'ailleurs que ces deux signatures spectrales présentent un profil relativement proche l'un de l'autre (Figure A-4). Une fois ces signatures définies, chaque pixel peut être analysé, et ceux présentant un spectre caractéristique des particules incubées sont identifiés (en rouge sur les photographies).

Cette méthode a ainsi pu permettre d'évaluer une internalisation croissante des cLNpb dans les cellules PC3 au cours du temps. Cette information est renforcée par une faible présence de cLNpb en solution sur les photographies étudiées.

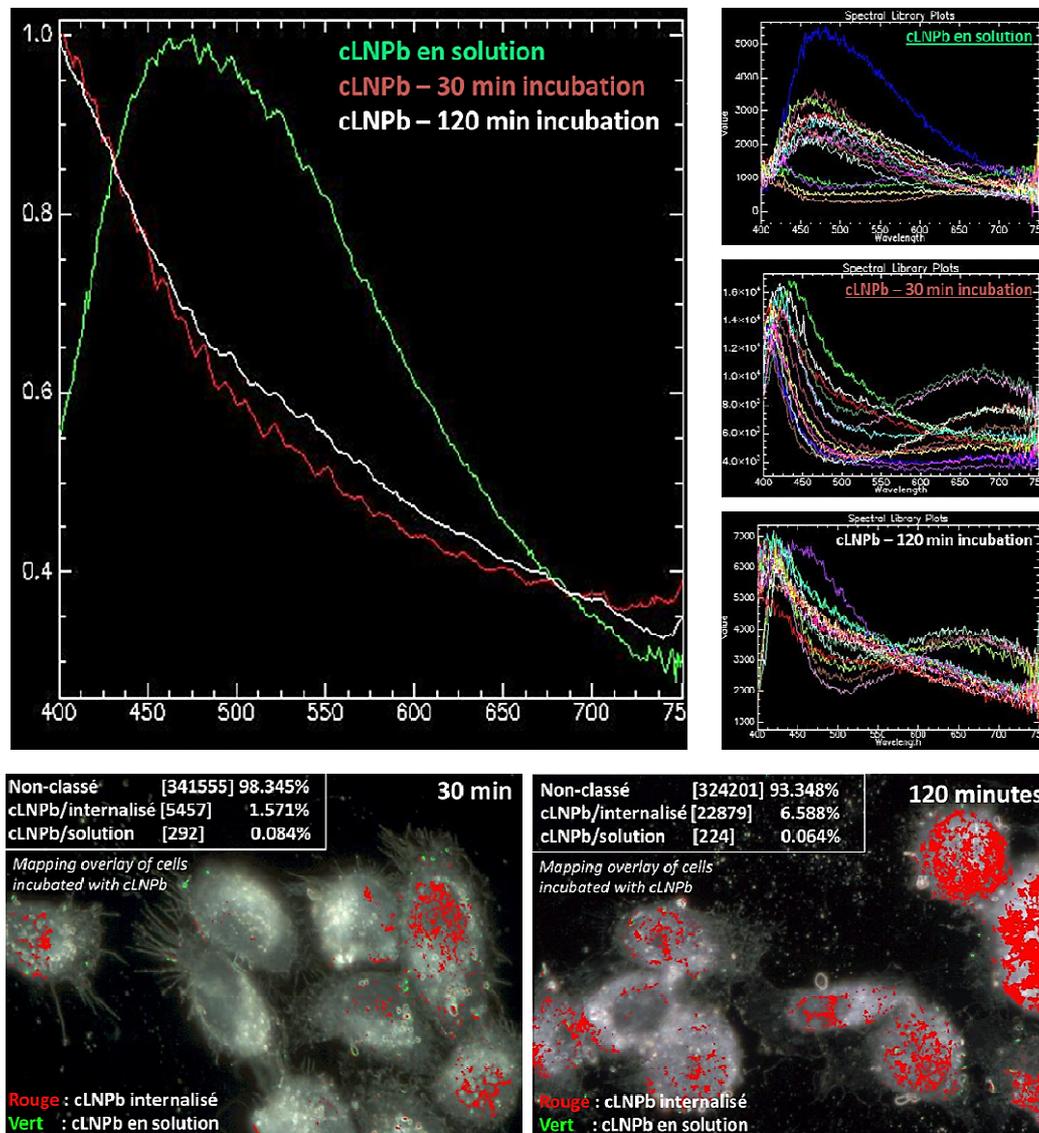


Figure A-10. Internalisation des cLNpb par imagerie hyperspectrale : les signatures spectrales des cLNpb en solution (vert), après 30 minutes (rouge) ou 120 minutes (blanc) d'incubation sont déterminées en haut à gauche. Ces données sont issues de l'analyse des représentations spectrales de plusieurs images prises dans les trois conditions citées précédemment (en haut à droite). L'identification des spectres caractéristiques permet de vérifier la présence de cLNpb au niveau de chaque pixel des photographies étudiées.

2.2. Complément d'information sur l'internalisation de cLNPa

Pour l'étude des cLNPa, l'imagerie hyperspectrale s'avère plus limitée de par le faible diamètre hydrodynamique (environ 43 nm) corrélé à une structure proche de la composition des cellules. Néanmoins, l'expertise offerte par l'entreprise Cytoviva a permis d'obtenir des résultats préliminaires quant à l'identification de cLNPa dans les cellules (Figure A-5).

Le principe est exactement le même que pour cLNPa, avec tout d'abord une identification du spectre caractéristique des nanoparticules cLNPa en solution (vert) à partir des données spectrales issues des photographies de particules seules. Concernant l'identification de cLNPa dans les cellules, des temps d'incubation plus longs ont été effectués en raison de la difficulté de l'extraction de la signature spécifique de cLNPa par rapport aux spectres caractérisant les cellules. Il semble que seule un regroupement de ces particules puissent offrir une luminance suffisante pour leur identification. En dépit de ces difficultés, des spectres caractérisant cLNPa après 120 minutes (jaune) ou 360 minutes (blanc) d'incubation ont pu être isolés comme décrit précédemment. De cette manière, chaque pixel a pu être analysé afin d'attribuer la présence ou non de cLNPa.

Contrairement à cLNPa, les spectres de cLNPa incubés dans les cellules à différents temps présentent un profil très différent, prouvant la nécessité d'autant plus importante de recharacteriser les signatures spectrales avant d'évaluer la présence des cLNPa au niveau de chaque pixel. Néanmoins, le profil spectral de cLNPa dans les cellules observées après 120 minutes d'incubation reste similaire aux profils observés avec cLNPa dans les mêmes conditions. La différence analysée après 360 minutes peut alors être attribuée à un changement majeur de la structure des cLNPa dans la cellule, notamment en raison de leur présence dans les vésicules d'endocytose.

En observant attentivement les photographies (Figure A-5), après 120 minutes d'incubation, les nanoparticules cLNPa semblent être regroupées dans des compartiments au sein des cellules. Cette observation coïncide avec l'hypothèse d'un cloisonnement dans les vésicules d'endocytose. Cependant, après 360 minutes, en plus d'un regroupement particulière dans certaines vésicules, les cellules présentent une distribution des cLNPa dans l'ensemble de la cellule. Ces données pourraient alors indiquer un échappement endosomal des particules cLNPa. Cet échappement dû au pouvoir endosomolytique du DOTAP et/ou à l'activité fusogène du DOPE conduit à un relargage au niveau du compartiment cytoplasmique et à un changement dans la signature spectrale des cLNPa, comme observé précédemment.

Ainsi, l'imagerie hyperspectral permet de déterminer la présence ou non de nanoparticules lipidiques dans les cellules, et ceci sans marquage au préalable. De plus, il est possible d'obtenir un

outil supplémentaire dans l'étude de la cinétique de distribution des nanoparticules, non seulement par l'observation des modifications de la signature spectrale de celles-ci, mais également par l'identification des pixels exprimant cette signature sur la photographie.

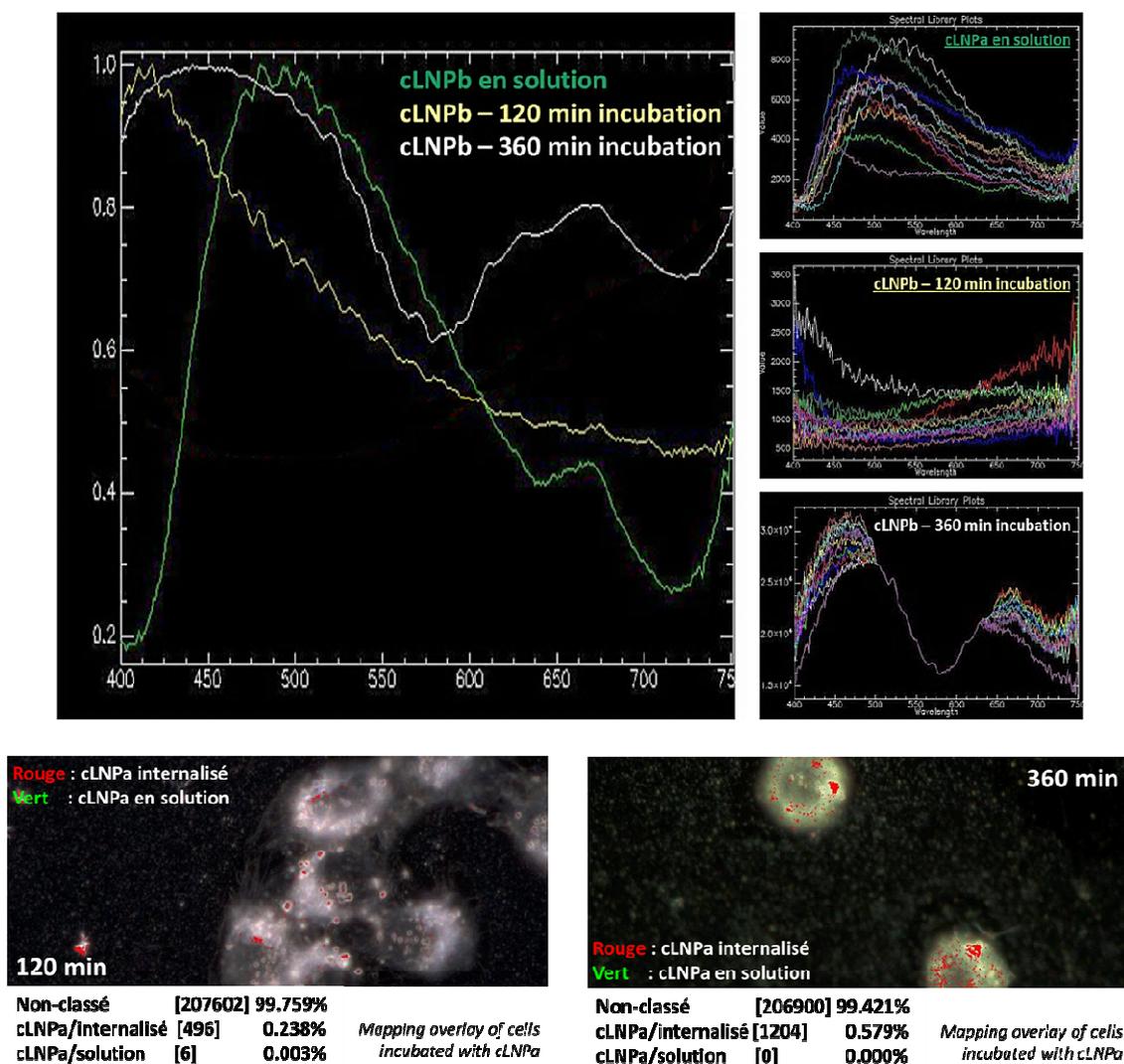


Figure A-11. Internalisation des cLNPa par imagerie hyperspectrale : les signatures spectrales des cLNPa en solution (vert), après 120 minutes (jaune) ou 360 minutes (blanc) d'incubation sont déterminées en haut à gauche. Ces données sont issues de l'analyse des représentations spectrales de plusieurs images prises dans les trois conditions citées précédemment (en haut à droite). L'identification des spectres caractéristiques permet de vérifier la présence de cLNPa au niveau de chaque pixel des photographies étudiées.

Bibliographie

1. Chomczynski P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Research*. 1992;20(14):3791-3792.
2. Barichello JM, Kizuki S, Tagami T, Soares LAL, Ishida T, Kikuchi H, Kiwada H. Agitation during lipoplex formation harmonizes the interaction of siRNA to cationic liposomes. *International journal of pharmaceutics*. 2012 Jul 1;430(1-2):359–65.
3. Hirsjärvi S, Qiao Y, Royere A, Bibette J, Benoit J-P. Layer-by-layer surface modification of lipid nanocapsules. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2010 Oct;76(2):200–7.
4. Deng ZJ, Morton SW, Ben-Akiva E, Dreaden EC, Shopsowitz KE, Hammond PT. Layer-by-layer nanoparticles for systemic codelivery of an anticancer drug and siRNA for potential triple-negative breast cancer treatment. *ACS nano*. 2013 Nov 26;7(11):9571–84.
5. Agency EM. European Medicines Agency. *Reproduction*. 2003;(August):1–20.
6. Wang B, Zhang S, Cui S, Yang B, Zhao Y, Chen H, Hao X, Shen Q, Zhou J. Chitosan enhanced gene delivery of cationic liposome via non-covalent conjugation. *Biotechnology letters*. 2012 Jan;34(1):19–28.
7. Delgado D, Gascón AR, Del Pozo-Rodríguez A, Echevarría E, Ruiz de Garibay AP, Rodríguez JM, Solinis MA. Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: in vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *International journal of pharmaceutics*. 2012 Apr 4;425(1-2):35–43.
8. Kim H-K, Davaa E, Myung C-S, Park J-S. Enhanced siRNA delivery using cationic liposomes with new polyarginine-conjugated PEG-lipid. *International journal of pharmaceutics*. 2010 Jun 15;392(1-2):141–7.
9. del Pozo-Rodríguez A, Pujals S, Delgado D, Solinis M a, Gascón a R, Giralt E, Pedraz JL. A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2009 Jan 5;133(1):52–9.

Valorisations

Publications

Enrichment of nanoparticles and bacteria using electroless and manual actuation modes of a bypass nanofluidic device

K.Aïzel, V.Agache, C.Pudda, F.Bottausci, C.Fraisseix, **J.Bruniaux**, F.P.Navarro and Y.Fouillet.
Lab On Chip, 2013.

Cationic lipid nanoemulsions for RNAi screening

J.Bruniaux, E.Sulpice, F.Mittler, I.Textier, X.Gidrol and F.P.Navarro
Proceedings of the Technical Proceedings of the 2013 NSTI Nanotechnology 2013, vol 3, pp. 323-326

Empirical model-based identification of critical quality attributes in preclinical design of nanostructured lipid carriers

T.Bastogne, **J.Bruniaux**, F.De Crecy, F.P.Navarro.
Proceedings of the 7th CLINAM Conference, Basel, June 2014. European Foundation for Clinical Nanomedicine.

Novel nanostructured lipid carriers dedicated to nucleic acid delivery for RNAi purposes

J.Bruniaux, E.Sulpice, F.Mittler, M.Menneteau, T.Bastogne, I.Textier, X.Gidrol and F.P.Navarro
Proceedings of Nanotech Advanced Materials and Applications, Washington DC, US, June 2014.

Formulation of nanostructured lipid carrier enabling efficient siRNA transfection and down-regulation

J.Bruniaux, E.Sulpice, F.Mittler, T.Bastogne, F.De Crecy, M.Menneteau, C. Fraisseix, I.Textier, X.Gidrol and F.P.Navarro
Biomaterials (soumis)

Lipid-based nanocarriers for functional transfection of siRNA in 3D culture

(en préparation)

Brevets

Brevet n°WO2014032953 A1 – «Formulation pour la délivrance de séquences nucléotidiques susceptibles de moduler des mécanismes endogènes d'ARN interférents»

Inventeur : F.P.Navarro, **J.Bruniaux**, X.Gidrol, E.Sulpice, I.Textier
Rédacteur : F.P.Navarro, **J.Bruniaux**

Brevet n°WO2014083205 A1 – «Méthode de criblage à haut-débit pour l'identification de biomarqueurs, cibles thérapeutiques ou d'agents thérapeutiques»

Inventeur : X.Gidrol, F.P.Navarro, E.Sulpice, **J.Bruniaux**
Rédacteur : X.Gidrol, F.P.Navarro

Brevet (en cours de dépôt) – «Formulation de nanovecteurs lipidiques pour la transfection d'ARN interférents et l'extinction de gènes ciblés sur des cellules cultivées de façon tridimensionnelle»

Inventeur : X.Gidrol, F.P.Navarro, E.Sulpice, **J.Bruniaux**
Rédacteur : F.P.Navarro

Présentations orales

Design of multifunctional cationic lipid for RNAi screening

J.Bruniaux*, E.Sulpice, F.Mittler, I.Textier, X.Gidrol and F.P.Navarro
ImagineNano, Bilbao (Spain), 2013

Cationic nanostructured lipid carriers dedicated to siRNA delivery

J.Bruniaux*, E.Sulpice, M.Menneteau, I.Textier, X.Gidrol and F.P.Navarro
GTRV, Orléans (France), 2013

Présentations de poster

Cationic lipid nanoemulsions for RNAi screening

J.Bruniaux, E.Sulpice, F.Mittler, I.Textier, X.Gidrol, F.P.Navarro*
TechConnect World, Washington D.C. (USA), 2013
Nanobio Europe, Toulouse (France), 2013
GIRC, Grenoble (France), 2013

Lipid nanoparticles (Lipidot®): a multifunctional platform for the controlled delivery of siRNA

J.Bruniaux*, F.P.Navarro, E.Sulpice, I.Textier, X.Gidrol
8^{ème} rencontre annuelle «Technologies pour la santé», Grenoble (France), 2012

Lipid nanoparticles: a multifunctional platform for the controlled delivery of siRNA

J.Bruniaux*, F.P.Navarro, E.Sulpice, I.Textier, F.Vinet, X.Gidrol
Workshop «Nano and Micro-Environments for Cell Biology», Grenoble (France), 2011
Workshop «1^{ère} Journée Scientifique du Médicament», Grenoble (France), 2011