



HAL
open science

Synthèse de nano-vecteurs dérivés des polydiacétylènes pour la co-délivrance d'un ARN interférent et d'un anticancéreux

Manon Ripoll

► **To cite this version:**

Manon Ripoll. Synthèse de nano-vecteurs dérivés des polydiacétylènes pour la co-délivrance d'un ARN interférent et d'un anticancéreux. Autre. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAF076 . tel-01881814

HAL Id: tel-01881814

<https://theses.hal.science/tel-01881814>

Submitted on 26 Sep 2018

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :

Manon RIPOLL

soutenue le : 11 Décembre 2017

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

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Synthèse de nano-vecteurs dérivés des
polydiacétylènes pour la co-délivrance
d'un ARN interférent et d'un
anticancéreux**

THÈSE dirigée par :

M. REMY Jean-Serge

Dr., Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DORIS Éric

Dr., CEA Saclay

M. FATTAL Élias

Pr., Université de Paris-sud

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. COLL Jean-Luc

Dr., Université de Grenoble

M. KICHLER Antoine

Dr., Université de Strasbourg

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives à la faculté de pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden, au sein de l'équipe V-SAT (Vecteurs : Synthèse & Applications Thérapeutique) sous la direction du Dr. Jean-Serge Remy.

Je tiens donc tout d'abord à remercier JS pour m'avoir accueilli dans son équipe. Grâce à toi, j'ai pu découvrir les joies de la biologie qui m'ont conforté dans mon envie de travailler à l'interface entre la chimie et la biologie. La liberté et la confiance que tu m'as accordées pendant ces trois années m'ont permis de gagner en autonomie et je t'en suis reconnaissante.

J'aimerais également exprimer ma gratitude au Dr. Antoine Kichler qui tout au long de ma thèse m'a apporté un soutien sans faille. Ta gentillesse et ta disponibilité ont permis de rendre cette thèse beaucoup plus agréable. Je te remercie également pour les corrections que tu as pu apporter à ce manuscrit.

Merci également au Dr. Alain Wagner pour m'avoir « adopté » dans son équipe. Bien que tu n'aies pas été officiellement mon co-directeur de thèse, tu as toujours été à mon écoute et su trouver les mots pour me remonter le moral dans les moments de doute.

Je souhaite également remercier les différents membres du jury, le Pr. Elias Fattal, Le Dr. Eric Doris et enfin le Dr. Jean-Luc Coll pour avoir accepté de juger ces travaux.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe V-SAT pour leurs conseils et leurs aides précieuses. Un très grand merci surtout à toi Patrick, tu a été tout d'abord un mentor qui m'a tout appris pour ensuite devenir un ami. Tu es quelqu'un d'une gentillesse inconditionnelle toujours prêt à aider les autres. Sans toi cette thèse aurait pris un tout autre tournant. Merci également à Boris pour m'avoir tenu compagnie en salle de culture. Je souhaite également remercier ma stagiaire Fanny pour sa motivation et son travail.

Je remercie ensuite « la team Wagner ». En plus de votre aide scientifique, vous m'avez apporté la bonne humeur et les fous rires dont j'avais besoin au quotidien. Merci à Eric (alias

Rico la cacaille) pour son humour « indéfinissable » (à très vite à Fouchy ☺), à mon petit Igor pour son hyperactivité et son rire communicatif, à Sacha pour ses théories toujours plus farfelues les unes que les autres, à Seb, Fabien (le moulin à parole) et Jérémy pour ces longues parties de Tarot, à Elisabetta (notre mama italienne), à Sergii pour m'avoir initié aux anticorps, à Nut Nut pour m'avoir fait découvrir toutes ces spécialités vietnamiennes, à Jitka pour ses conseils avisés en biologie cellulaire, à Zolo pour m'avoir épargner au ping-pong à de nombreuses reprises, à Julie, à Michel, à Isabelle, à Hélène et enfin à Chloé. Mention spéciale pour Sylvain Jacques, mon copain de pause, de fou rire et de commérage, ne t'inquiète pas on se retrouve bientôt dans notre maison pour nains ☺.

Je n'oublie pas bien évidemment mes copines d'en face, un peu de féminité dans ce monde d'hommes ça fait du bien. Je tiens tout d'abord à remercier Célia pour l'aide que tu m'as apportée en biologie tout au long de cette thèse et surtout pour m'avoir sauvée la mise plus d'une fois à l'animalerie. Merci d'avoir été là pour moi durant ces trois dernières années, nos pauses café vont me manquer. Un immense merci également à May pour son aide, à Florence pour nos fous-rires et surtout pour être une source de motivation pour le sport (fais bien attention aux chasseurs pendant mon absence, ils rodent^^), à Marcella pour tous ces bons moments et ces soirées passés ensemble (promis à ma soutenance, on passera la sardine ☺) et enfin à Alex (l'homme à poil) pour ses blagues vaseuses et sa bonne humeur quotidienne (encore un bon appétit à toi ☺). Merci également à Florent l'expatrié de l'UMR7200, pour m'avoir appris toutes ces choses sur les fonds marins (même si je maintiens que c'est une otarie..^^) et pour ces moments de rire et de partage (Maitre Gims à jamais dans mon cœur^).

Merci à toi Nathalie, notre gestionnaire de choc, pour avoir réussi à toujours tout régler malgré notre désorganisation...

Merci à l'équipe du Dr. Dominique Bagnard et au personnel de l'animalerie pour m'avoir formée et aidée dans la réalisation de ces tests *in vivo*.

Je souhaite également remercier les plateformes d'analyse d'Illkirch et d'Esplanade pour les expériences de RMN effectuées notamment celles de RMN-DOSY, ainsi que la plateforme de microscopie d'Illkirch pour m'avoir formée sur les différents microscopes.

Il est maintenant temps de remercier tous mes amis qui ont eu le courage de me supporter durant cette rédaction mais également durant toutes ces années. Votre soutien et votre présence me sont essentiels. C'est donc chaleureusement que je remercie tous mes amis de Franche-Comté (la région la plus cool de France ☺), Marine, Simon, nono, kakou, Mathieu, John, Mathilde, Charlotte... Mais également mes potes d'ingé (ECPM forever), Charlotte, Sarah, Mathilde, Picoto, Proutix, Camillou, Nanou, Sylvain... Peu importe la distance et le temps qui passe, je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

Je remercie toute ma famille et plus particulièrement ma mère, mon père, mes frères et ma sœur. Vous êtes à mes yeux l'un de mes plus grands bonheurs et c'est donc tout naturellement que je souhaite vous remercier pour tout le soutien et l'amour que vous me portez au quotidien. Je n'aurais pas pu arriver jusqu'ici sans vous à mes côtés.

Mais qu'aurait été ma thèse sans cette rencontre avec toi.. Tu t'es présenté à moi comme une évidence et depuis tu constitues mon bonheur au quotidien. Au delà de l'apport scientifique (non négligeable) que tu m'as apporté (les oligos c'est la vie), tu as été un confident, un soutien et une source de motivation. Merci tout simplement d'être toi... Ps : ne t'inquiète pas, notre secret est bien gardé ☺

Merci encore à tous ceux que j'ai pu croisé durant cette thèse. C'est la tête remplie de souvenirs que je m'en vais pour de nouvelles aventures...

Table des matières

Abréviations et symboles	13
Avant-Propos	19
<i>Chapitre I - Introduction générale : Les micelles comme système de délivrance</i>	23
I. Les nanoparticules comme agents de vectorisation	25
<i>1.1 Définition de la vectorisation</i>	25
<i>1.2 Les différentes générations de nanovecteurs</i>	26
1.2.1 Les nanoparticules de première génération	26
1.2.2 Les nanovecteurs de deuxième génération : ciblage passif des tumeurs	27
1.2.3 Les nanovecteurs de troisième génération : ciblage actif des tumeurs	29
II. Les auto-assemblages d'amphiphiles en milieux aqueux	33
<i>II.1 Nature des amphiphiles</i>	33
<i>II.2 Interactions entre les auto-assemblages</i>	34
<i>II.3 Structures des auto-assemblages</i>	35
II.3.1 La balance hydrophile-lipophile	35
II.3.2 Le paramètre d'assemblage <i>P</i>	36
III. Les micelles sphériques	37
<i>III.1 Généralités sur les micelles</i>	37
<i>III.2 Les micelles polymériques</i>	38
III.2.1 Formation des micelles de copolymères à blocs	38
III.2.2 Structure des copolymères à blocs	39
III.2.3 Stabilisation par la réticulation	40
<i>III.3 Les micelles lipidiques</i>	44
<i>IV. Les micelles polydiacétyléniques</i>	44
IV.1 Mécanisme de la polymérisation	45
IV.2 État de l'art des PDA	46
IV. Applications thérapeutiques des micelles lipidiques & polymériques	49
<i>IV.1 Délivrance de médicaments</i>	50
<i>IV.2 Délivrance d'agent de contraste</i>	51

IV.3 Utilisation en transfert d'acides nucléiques	52
V. Conclusion et objectifs	54
Références	57
Chapitre II - Synthèses et caractérisations des micelles polydiacétyléniques : application à la délivrance d'ARN interférents	65
I. Délivrance de siARN	67
I.1 L'ARN interférence comme outil thérapeutique	67
I.2. Mécanisme de l'ARN interférence: cas des siARN	67
I.3. Obstacles à la délivrance de siARN	69
I.4. Méthodes de délivrance de siARN	70
I.4.1 Modifications chimiques des siARN	70
I.4.2 Les méthodes virales	71
I.4.3 Les méthodes synthétiques	71
II. Synthèses de nouveaux amphiphiles cationiques diacétyléniques	74
III. Formation des micelles cationiques polymérisées	77
III.1 Protocole de formulation	77
III.2 Polymérisation en cuve de quartz	78
III.3 Analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	82
IV. Transfection d'un petit ARN interférent ciblant un gène rapporteur	83
IV.1 Sélection du gène candidat pour la délivrance in vitro de siARN	83
IV.2 Optimisation du composé actif	88
IV.2.1 Optimisation du temps de polymérisation	88
IV.2.2 Evaluation de l'impact de la concentration en siARN	89
IV.2.3 Evaluation de l'impact du sérum	90
IV.2.4 Réduction de la toxicité	91
IV.2.5 Synthèse et évaluation d'un groupement di-histidine	97
IV.3 Caractérisation des complexes siARN/micelle-PDA	98
IV.3.1 Analyse par DLS	98
IV.3.2 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose	100
IV.3.3 Internalisation des complexes micelle/siARN	103
IV.4 Étude du mécanisme de relargage du siARN	104
V. Caractérisation du composé actif	107

V.1	Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)	107
V.2	Caractérisation par Microscopie Electronique à Transmission (MET)	109
V.3	Mesure du potentiel zêta	110
VI.	Conclusion et perspectives	111
	Références	113
	Chapitre III - Co-délivrance d'un siARN et d'un anticancéreux hydrophobe: Evaluation	
	<i>in vitro et in vivo</i>	117
I.	Thérapie combinatoire pour le traitement du cancer	119
I.1	Mécanisme de résistance à la chimiothérapie	119
I.2	Mécanisme d'action des siRNA en thérapie combinatoire	120
I.3	Vecteurs appliqués à la co-délivrance de siARN et d'anticancéreux	121
I.3.1	Les liposomes	122
I.3.2	Les polymères	122
I.3.3	Particules inorganiques	124
I.4	Conclusion et objectifs	124
II.	Vectorisation d'un siARN ayant une cible thérapeutique	125
II.1	siARN ciblant la Polo-like kinase 1 (PLK-1)	125
II.2	Transfection <i>in vitro</i>	126
II.3	Analyse par microscopie à fluorescence	129
III.	Délivrance d'un anticancéreux	130
III.1	Choix et formulation de l'anticancéreux	130
III.2	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose	131
III.2	Détermination du taux d'encapsulation	132
III.3	Délivrance <i>in vitro</i> d'anticancéreux	134
IV.	Co-délivrance siARN/drogue <i>in vitro</i>	135
IV.1	Analyse par DLS	135
IV.2	Etude de l'effet combiné	136
IV.2.1	Détermination de l'effet induit par la combinaison des deux composés	136
IV.2.2	Co-délivrance <i>in vitro</i>	137
V.	Co-délivrance des deux agents thérapeutiques <i>in vivo</i>	144
V.1	Conception du protocole expérimental	145
V.1.1	Choix du modèle murin	145

V.1.2 Composition de la formulation micellaire	145
V.1.2 Protocole expérimental	147
V.2 Résultats <i>in vivo</i>	148
VI. Conclusion et perspectives	154
Références	157

Chapitre IV - Fonctionnalisation des micelles polydiacétyléniques pour un ciblage actif

	161
I. Les anticorps comme molécule d'adressage	163
<i>I.1 Structure des anticorps</i>	163
<i>I.2 Utilisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques</i>	165
<i>I.3 Stratégies de conjugaison pour coupler un anticorps à une nanoparticule</i>	167
I.3.1 Conjugaison par couplage covalent	167
I.3.1.1 Couplage direct	168
I.3.1.2 Couplage indirect	169
I.3.2 Association par couplage non-covalent	170
II. Contexte et objectifs	172
III. Fonctionnalisation des micelles : approche covalente	173
<i>III.1 Couplage entre la micelle PDA fonctionnalisée par un alcyne et un anticorps-azoture par cyclo-addition azoture-alcyne tendu</i>	173
<i>III.2 Couplage entre la micelle PDA fonctionnalisée par un thiol et l'anticorps via l'utilisation d'un espaceur bifonctionnel</i>	177
<i>III.3 Conclusions et perspectives</i>	179
IV. Fonctionnalisation des micelles : approche non covalente	179
<i>IV.1 Conception du système</i>	179
<i>IV.2 Construction de l'immuno-micelle par interaction électrostatique</i>	180
IV.2.2 Construction du conjugué anticorps-oligonucléotide	180
IV.2.2 Formulation des immuno-micelles	184
IV.2.3 Complexation de siARN avec l'immuno-micelle	186
<i>IV.3 Evaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité de l'immuno-micelle</i>	188
IV.3.1 Evaluation <i>in vitro</i> de la délivrance de siPLK1	188
IV.3.2 Analyse par microscopie confocale	196
IV.3.3 Délivrance de la camptothécine	199

<i>IV.4 Conclusions et perspectives</i>	201
Références	203
<i>Conclusion Générale</i>	207
<i>Partie expérimentale</i>	213
<i>Publications acceptées et en cours de soumission</i>	253

Abréviations et symboles

A

ABF	<i>4-azidobenzoylfluoride</i>
Ac	Anticorps
ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobis(isobutyronitrile)
ALAT	Asparate amino-transférase
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
AOT	Bis(2-éthylhexyle) sulfocinate de sodium
APN	3-Arylpropionitrile
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ASAT	Alanine amino-transférase
ATP	Adénosine-triphosphate

B, C

BCA	Acide bicinchoninique
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCN	Bicyclononyne
Boc	Tert-butyloxycarbonyle
BSA	Albumine de sérum bovin
CBTF	4-((4-(cyanoéthynyl)benzoyl)oxy)-2,3,5,6-tétrafluorobenzènesulfonate de sodium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CI	<i>Combinatorial index</i> / Indice de combinaison
CMC	Concentration micellaire critique
CPP	<i>Cell-penetrating peptide</i>
CPT	Camptothécine
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
Cy3	Cyanine 3

Cy5 Cyanine 5

D

D Constante de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
DA Diacétylène
DAB Diaminobutane
DAPI 4',6-diamidino-2-phénylindole
DCM Dichlorométhane
DIPEA N,N-diisopropyléthylamine
DLS Diffusion dynamique de la lumière
DMEM Milieu minimum essentiel de Dulbecco
DMF Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde
DOTMA 1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane
DTT Dithiothréitol
DOSY *Diffusion ordered spectroscopy*
DOX Doxorubicine
dsRNA *Double-stranded RNA*
DTX Docétaxel

E, F

EDC 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA Acide éthylène diamine tétraacétique
éq. Équivalent
EPR *Enhanced permeability and retention*
ESI *Ionisation électrospray*
Et₃N Triéthylamine
EtOH Ethanol
FITC Fluorescéine isothiocyanate
Fmoc 9-Fluorénylméthoxy-carbonyl

G, H

h Constante de Planck
HATU Hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium
HBG HEPES buffered Glucose / Tampon HEPES glucose

HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HEPES	acide N-(2-hydroxyéthyl)- piperazine-N'-(2-éthanesulfonique)
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance / Balance hydrophile-lipophile
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HOMO	Orbitale moléculaire la plus haute occupée
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse haute performance

I, J, K

IAP	Inhibiteur d'Apoptose
IC₅₀	Concentration à 50% d'inhibition
Ig	Immunoglobuline
ILT	Inverse Laplace transform
ip	Intrapéritonéal
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Iv	Intraveineux
J	Constante de couplage

L, M

LCMS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LDH	Lactase déshydrogénase
Luc	Luciférase
LUMO	Orbitale moléculaire la plus basse vacante
m	Multiplet
MDR	<i>Multi-Drug resistance</i>
MeOH	Méthanol
MET	Microscopie électronique à transmission
MNP	Micelle non polymérisée
MP	Micelle polymérisée
MPD	Micelle polymérisée et dialysée
MS	Spectrométrie de masse
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5-diphényltétrazolium
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>

N, O

N/P	Ratio représentant la charge globale d'un complexe
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMRI	<i>Naval medical research institute</i>
NP	Nanoparticule
NTA	Acide nitrilotriacétique
NVP	<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone
OLISA	<i>Oligonucleotide-linked immuosorbent assay</i>
ON	Oligonucléotide

P, Q

PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PANAM	poly(amidoamine)
PBS	Tampon phosphate salin
PDA	Polydiacétylénique
PE	Polyéthylène
PEG	Polyéthylèneglycol
PEI	Polyéthylènimine
PEO	Oxyde de polyéthylène
PFP	Pentafluorophénol
PLA	Acide polylactique
PLGA	Acide polylactique-co-glycolique
PLK-1	Polo-Like Kinase 1
PLL	Poly(L-lysine)
PLX	Paclitaxel
ppm	Partie par million
quant.	Quantitatif

R

R	Rituximab
R-EGF	Récepteur de facteur de croissance épidermique
RES	Système réticulo-endothélial
Rf	Rapport frontal
RGD	<i>Arginylglycylaspartic acid</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLU	Unité relative de lumière

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMPI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> medium
rpm	Rotation par minute

S

siCTL	siARN contrôle
SDS	Dodécylsulfate de sodium
siLuc	siARN dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine de la luciférase
siPLK-1	siARN dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine PLK-1
siARN	<i>small interfering</i> ARN / petit ARN interférent
SM	Spectrométrie de masse
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
SPAAC	<i>Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition</i> / Cycloaddition azoture-alcyne tendu

T

T	Trastuzumab
T-A	Tampon tris-acétate
TA	Température ambiante
TAMRA	Tétraméthylrhodamine
TBE	Tampon tris-borate-EDTA
TCEP	Hydrochlorure de tris-(2-carboxyéthyl)phosphine
THF	Tétrahydrofurane
TFA	Acide trifluoroacétique
TMC	Température micellaire critique
TNBS	Acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U, V

u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> / Facteur de croissance endothéliale vasculaire

Avant-Propos

Au cours des dernières années, l'utilisation d'acides nucléiques et tout particulièrement de petits ARNs interférents (siARN) comme agent thérapeutique s'est révélée très prometteuse. En effet, ils présentent un fort potentiel pour le traitement des maladies dans lesquelles la régulation négative d'un ARN messager spécifique, *gene silencing*, conduit à un effet bénéfique. Ils sont notamment déjà impliqués dans de nombreux essais cliniques pour le traitement du cancer. Cependant, tout comme le traitement avec les anticancéreux classiques, les cellules développent à long terme des résistances aux approches siARNs. Pour pallier ce problème, de récentes recherches ont montré que les effets thérapeutiques des petits ARNs interférents en oncologie peuvent être augmentés en les combinant avec des anticancéreux classiques réduisant ainsi les mécanismes de résistance. Néanmoins, co-délivrer un acide nucléique et un anticancéreux reste encore un défi pour les chercheurs en raison de leurs propriétés physico-chimiques qui sont souvent très différentes.

Dans ce but, le développement de vecteurs tels que les liposomes, les micelles ou encore les nanoparticules, capables de délivrer simultanément dans la cellule un acide nucléique hydrophile et un anticancéreux hydrophobe connaissent un intérêt grandissant.

Au laboratoire, nous avons décidé de nous tourner vers une famille de vecteur en plein essor : les micelles formées à partir d'amphiphiles diacétyléniques photopolymérisables. Très stables, ces structures nanométriques se sont révélées très prometteuses pour la vectorisation de principes actifs ou pour la transfection de gènes.¹⁻⁴ L'exploration de ce système est donc particulièrement pertinent pour des stratégies de co-délivrance.

Les travaux de cette thèse s'articulent autour de trois grandes parties : i- la synthèse et l'étude de ces micelles cationiques en tant qu'agent de vectorisation de siARN, ii- l'étude *in vitro* et *in vivo* de ce vecteur pour une application en thérapie combinatoire et enfin, iii- sa fonctionnalisation pour un ciblage actif des cellules tumorales.

Dans un **premier chapitre**, une étude bibliographique consacrée aux molécules amphiphiles et tout particulièrement aux micelles sphériques sera présentée. Ce chapitre a pour but de comprendre la place des micelles dans la nanomédecine et de présenter plus amplement les structures diacétyléniques utilisées au cours de ces travaux.

Un **second chapitre** sera dédié à la synthèse d'amphiphiles diacétyléniques, à la formulation et à la polymérisation des micelles cationiques associées. L'étude *in vitro* de ces vecteurs en tant qu'agent de transfection de siARN sera également décrite.

Dans **un troisième chapitre**, l'étude de ces composés pour une application en thérapie combinatoire sera développée.

Puis **une quatrième partie** sera dédiée à la synthèse et à l'évaluation *in vitro* d'un système de ciblage de cellules tumorales conçu par association de micelles cationiques et d'anticorps préalablement conjugués à des biopolymères anioniques.

Enfin, l'ensemble des protocoles utilisés au cours de cette thèse pour la réalisation des diverses expériences sera répertorié dans un dernier chapitre rédigé en anglais.

Pour plus de facilité, un résumé des différentes structures ainsi que des abréviations et des symboles les plus utilisés au cours de cette thèse est disponible sur une page dépliante se trouvant à la fin de la thèse.

Ces travaux de thèse ont fait l'objet d'une demande de brevet, d'une publication acceptée et de deux publications ainsi qu'un chapitre de livre en cours de soumission. De plus, plusieurs communications orales ou par affiche ont été réalisées au cours de ces trois années de thèse.

➤ Brevet et publication

- M. Ripoll, P. Neuberg*, A. Kichler, N. Tounsi, A. Wagner and J.-S. Remy*, pH-Responsive Nanometric Polydiacetylenic Micelles Allow for Efficient Intracellular siRNA Delivery, *ACS Applied Materials & interfaces*, **8**, 2016, 30665–30670.
DOI: 10.1021/acsami.6b09365
- M. Ripoll, P. Neuberg, A. Wagner, J.-S. Remy, Amphiphilic monomers based nanovectors and their use for siRNA delivery, PCT/EP2017/057627.

➤ Manuscrits soumis ou en cours de soumission

- M. Ripoll, M. Pierdant, P. Neuberg, A. Wagner, D. Bagnard, A. Kichler and J.-S. Remy*, Co-delivery of anti-PLK-1 siRNA and camptothecin by nanometric polydiacetylenic micelles results in synergistic tumor cell killing. (**En cours de redaction**)
- M. Ripoll, P. Neuberg, J.-S. Remy*, and A. Kichler*, Cationic photopolymerized diacetylenic micelles for siRNA Delivery. *Methods in Molecular Biology*, (**Soumis**).

- P. Neuberg, I. Hamaidi, S. Danilin, M. Ripoll, M. Nothisen, A. Wagner, A. Kichler, T. Massfelder*, J.-S. Remy*, Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery. (**Soumis**).

➤ Communications par affiche

- Manon Ripoll *et al.*, pH responsive nanometric polydiacetylenic micelles allow for *in vitro* and *in vivo* co-delivery of intracellular siRNA and anticancer drug. **RICT 2017**, 5-7 juillet 2017, Toulouse
- Manon Ripoll *et al.* pH responsive nanometric polydiacetylenic micelles allow for synergic co-delivery of intracellular siRNA and anticancer drug. **Journées du Campus d'Illkirch**, 21-22 avril 2016, Illkirch (Prix du meilleur poster)

➤ Communications orales

- Manon Ripoll *et al.* pH responsive polydiacetylenic micelles allow for synergistic co-delivery of intracellular siRNA and anticancer drug. **24th edition YRFM, Young Research Fellow Meeting**, 8-10 Feb 2017, Chatenay-Malabry, France. (Prix de la meilleure communication orale).
- Manon Ripoll *et al.*, Nanostructured carriers for intelligent siRNA-co-delivery with anticancer drugs, **journée Médalis**, Strasbourg 6 décembre 2016.
- Manon Ripoll *et al.*, pH responsive nanometric polydiacetylenic micelles allow for synergic co-delivery of intracellular siRNA and anticancer drug. **Forum BioChem 2016, meeting Academia-Industry**, 2-3 juin 2016, Illkirch. (Prix de la meilleure communication orale).

Chapitre I

-

Introduction générale :

Les micelles comme système de délivrance

Une nanoparticule (NP) est un ensemble d'atomes formant un objet dont au moins une de ces dimensions possède une taille comprise entre 1 et 100 nm. Ces colloïdes sont généralement capables d'interagir avec l'environnement biologique.

Discipline émergente, la nanomédecine est l'application de ces nano-objets au service de la recherche biomédicale. En effet, les propriétés caractéristiques des systèmes nanoparticulaires les rendent très intéressants pour plusieurs domaines d'applications tels que la délivrance de médicaments, la fabrication de biomatériaux, le diagnostic ou encore l'imagerie médicale. Ainsi le développement de particules de taille nanométrique, possédant des propriétés d'encapsulation et de délivrance efficaces a suscité un grand intérêt.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement au développement de nanoparticules pour la vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique.

I. Les nanoparticules comme agents de vectorisation

I.1 Définition de la vectorisation

La plupart des maladies sont traitées grâce à l'utilisation de médicaments qui sont administrés par voie directe chez le patient. Cependant, leurs utilisations provoquent souvent des effets secondaires désagréables, voire douloureux. Ces procédures d'administration doivent donc être améliorées afin de limiter ces effets néfastes tout en conservant ou en améliorant l'effet thérapeutique. Une des stratégies envisagées par les chercheurs est basée sur le principe de la vectorisation.

Le concept de vectorisation a été introduit pour la première fois par Paul Ehrlich avec l'énoncé de sa théorie « magic bullet », des balles magiques capables de transporter des molécules chimiques à l'intérieur d'un organisme et ce à des concentrations biologiquement actives et sans danger pour le patient.⁵ De cet énoncé est né le principe de la vectorisation qui consiste en d'autre terme, à transporter un principe actif en quantité suffisante vers la cible à atteindre au moyen d'un vecteur qui se doit d'être le moins toxique possible pour l'organisme. Si la vectorisation est devenu au fil des années une discipline à part entière, c'est parce qu'elle offre des outils très prometteurs pour améliorer la délivrance de médicaments mais également pour perfectionner le diagnostic des maladies. C'est pourquoi, aujourd'hui le développement des vecteurs connaît un intérêt grandissant.

Le vecteur peut être d'origine naturelle tels que les virus ou d'origine synthétique (liposomes, micelles, polymère..). Il joue un rôle essentiel puisqu'il est conçu dans le but d'améliorer la biodisponibilité de molécules bioactives en prolongeant leur durée de vie et en favorisant un relargage progressif dans l'organisme. D'autre part, il peut aussi permettre d'améliorer le passage des différentes barrières naturelles tout en protégeant les principes actifs des dégradations. Et enfin, en permettant une administration indirecte du médicament par encapsulation de ce dernier à l'intérieur du vecteur, il peut également limiter les effets secondaires liés à la biodistribution du principe actif.

Les nanoparticules ont déjà démontré leur fort potentiel dans le domaine de l'imagerie et en thérapie. En effet, on recense de nombreuses nanoparticules d'oxyde de fer conçues comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), notamment l'Endorem® (imagerie du cancer du foie), le Lumiren® (imagerie du tube digestif) ou encore le Feridex® (détection de lésions du foie). En thérapie, la vectorisation de principes actifs a conduit à la mise sur le marché de plusieurs traitements. Parmi les plus notables, on peut citer le Doxil® (doxorubicine encapsulée dans un liposome PEGylé) médicament utilisé dans le traitement du cancer ovarien ou encore l'Abraxane® (taxol encapsulé dans de l'albumine) préconisé pour le traitement du cancer du sein métastatique.

I.2 Les différentes générations de nanovecteurs

Avec l'expansion du développement des vecteurs synthétiques notamment pour le traitement des cancers, un nouveau concept de classification a été mis au point.⁶ Les vecteurs de taille submicronique peuvent être classés en trois catégories selon leur biodistribution *in vivo*. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux vecteurs développés pour une application anti-tumorale.

I.2.1 Les nanoparticules de première génération

Les vecteurs de première génération sont constitués de vecteurs sphériques tels que les liposomes⁷, les nanosphères⁸ ou encore les nanocapsules⁹ et ont été développés dans un but thérapeutique (Figure 1). Leur surface n'étant pas modifiée, on parle de particules « nues ».

Après injection par voie intraveineuse dans l'organisme, ces vecteurs sont généralement reconnus par les opsonines, protéines plasmatiques qui vont s'adsorber rapidement à la

surface des vecteurs et les conduire directement vers le système réticulo-endothélial (RES), présent dans différents organes tels que le foie et la rate, afin d'être éliminés.^{10,11}

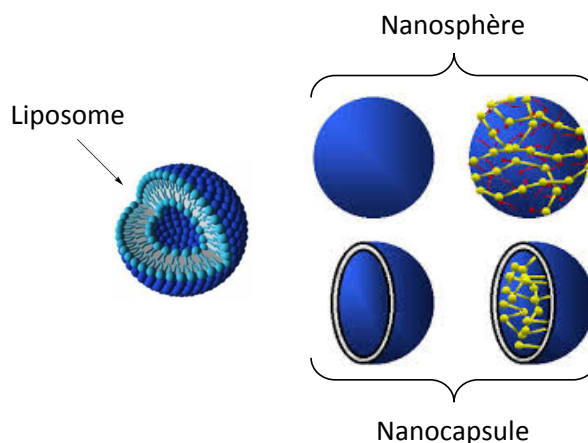


Figure 1 : Structure des principaux vecteurs de première génération ; liposome (bicouche de phospholipide entourant un cœur aqueux), nanosphère (pelote de polymère biodégradable) et nanocapsule (nanoparticule de type réservoir composée d'une enveloppe en polymère biodégradable et d'une cavité huileuse ou aqueuse).

Ces vecteurs présentent en général un temps de circulation dans le sang court qui ne permet pas toujours d'atteindre les tissus souhaités. Afin d'améliorer cet aspect, une seconde génération a donc été développée.

I.2.2 Les nanovecteurs de deuxième génération : ciblage passif des tumeurs

L'adsorption des protéines à la surface des particules joue un rôle primordial dans le devenir des vecteurs *in vivo*. En effet, nous avons vu précédemment que lorsque la particule est « nue » celle-ci est reconnue rapidement comme un corps étranger et de ce fait conduit vers des systèmes provoquant son élimination. Les vecteurs de deuxième génération ont été développés dans le but de prolonger ce temps de circulation dans le sang et de diminuer l'accumulation hépatique.

Deux principaux paramètres sont responsables de l'adsorption des protéines sur les particules : l'hydrophobie et la charge des particules. En effet, des études ont montré que plus la surface de la particule est hydrophobe, plus l'adsorption des protéines plasmatiques est importante. D'autre part, les charges des particules influencent également leur biodistribution. Une étude a notamment montré qu'après injection intraveineuse, les nanoparticules cationiques présentaient une importante rétention au niveau des poumons (premier organe rencontré). Ce phénomène s'explique par les interactions électrostatiques non spécifiques

avec les charges négatives des membranes plasmiques des cellules endothéliales des capillaires pulmonaires.

Parallèlement, les nanoparticules anioniques ne s'accumulent pas dans les poumons mais sont rapidement éliminées par le foie due à une opsonisation rapide.¹²

Pour limiter ces phénomènes, la surface des nanoparticules peut être chimiquement modifiée par des polymères permettant d'introduire un caractère « furtif » à la particule. Pour cela, on utilise principalement des polymères hydrophiles et neutres comme par exemple le polyéthylène glycol (PEG). A titre d'exemple, des liposomes modifiés par greffage de chaînes PEG (PEG 5000) sur les lipides présentent une clairance 30 % plus lente que l'analogue non PEGylé après administration intraveineuse chez la souris.¹³

Ces vecteurs deviennent alors « indétectables » par les macrophages, prolongeant leur temps de circulation dans le sang. Grâce à leur taille nanométrique et leur surface optimisée, ces nanoparticules vont être capables de réaliser un ciblage qu'on caractérise de « passif » en s'appuyant sur les imperfections naturellement produites dans le cas du développement des tumeurs solides. En effet, la croissance rapide de la tumeur nécessite une forte consommation d'oxygène et de nutriment. Afin de l'alimenter, un système vasculaire va donc se développer autour de la tumeur c'est ce qu'on appelle l'angiogenèse. Cependant, les cellules endothéliales constituant ces vaisseaux vont être faiblement alignées avec la création de trous entre celles-ci. Cette architecture désordonnée ainsi que la production de molécules induisant la perméabilité des vaisseaux sanguins tel que le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), vont rendre les vaisseaux sanguins tumoraux très perméables.¹⁴ De plus, la pousse de la tumeur comprime les vaisseaux lymphatiques entraînant un faible drainage au niveau de la tumeur. Ces imperfections vont donc permettre d'une part l'entrée des nanoparticules dans la zone tumorale et d'autre part leur accumulation à cet endroit ; c'est ce qu'on appelle l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*)¹⁵ (Figure 2).

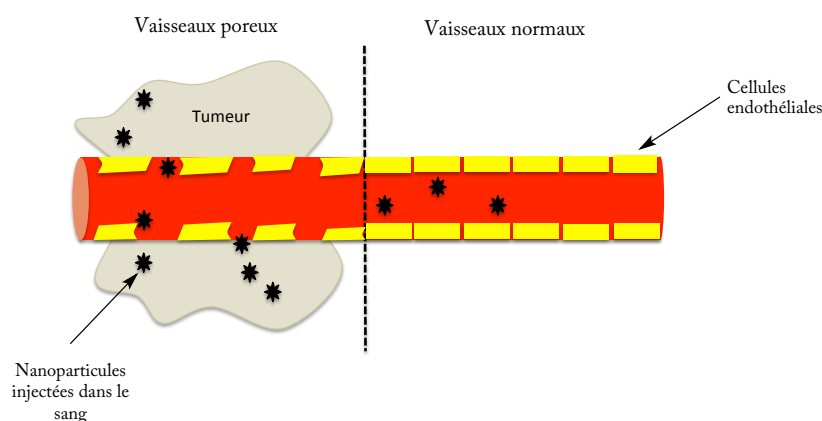


Figure 2 : Schéma représentatif de l'effet EPR.

Ainsi en ayant recours à des vecteurs de tailles appropriées, stables et furtifs, il est possible d'obtenir une accumulation dans les tumeurs des principes actifs vectorisés, 10 à 50 fois supérieure à celle retrouvée dans les tissus sains.¹⁶ De plus, la concentration en principes actifs dans les tissus tumoraux peut être 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue avec la drogue libre.¹⁷

La taille ainsi que les caractéristiques structurales des vecteurs vont donc jouer un rôle crucial pour efficacement cibler de manière passive les tumeurs. Cette génération de vecteur est très prometteuse et est déjà utilisée dans plusieurs essais cliniques pour le traitement de cancers. Quelques exemples sont répertoriés dans le Tableau 1.

Nom du produit	Vecteur	Principes actifs	Indication	Phase clinique	Référence
ALN-VSP	Nanoparticule lipidique	siARN ciblant VEGF	Cancer avancé et métastases dans le foie	Phase I	Tabernero <i>et al.</i> 2013
IHL-305	Liposome PEGylé	Irinotécan	Tumeur solide avancé	Phase I	Infante <i>et al.</i> 2012
IT-101	Cyclodextrine	Camptothécine	Tumeur solide avancé	Phase I/II	Weiss <i>et al.</i> 2013
LE-DT	Liposome	Docetaxel	Tumeur solide	Phase I	Deeken <i>et al.</i> 2013
MBT-0206	Liposome cationique	Paclitaxel	Cancer triple négatif	Phase II	Awada <i>et al.</i> 2014
NKTR-102	Conjugué PEG-médicament	Irinotécan	Cancer du sein	Phase II	Awada <i>et al.</i> 2013

Tableau 1 : Exemples de nanoparticules en clinique s'appuyant sur un ciblage passif. Tableau adapté de la publication de Bar-Zeev *et al.* 2017.¹⁸

Néanmoins, le ciblage passif fait face à certaines limitations.^{19,20} En effet, certaines tumeurs présentent un effet EPR plus ou moins faible en fonction de la taille et de la nature de la tumeur, notamment pour le glioblastome,²¹ ce qui limite considérablement la diffusion des drogues à l'intérieur des tissus cancéreux. De plus, les vecteurs ne sont pas internalisés spécifiquement dans les cellules tumorales. Ce ciblage ne permet donc pas un ciblage cellulaire spécifique mais uniquement une orientation dans l'espace des molécules vers des vaisseaux sanguins présentant une importante perméabilité.

I.2.3 Les nanovecteurs de troisième génération : ciblage actif des tumeurs

La stratégie de ciblage est cruciale pour la thérapie. Afin de maximiser la délivrance des principes actifs pour le traitement des cancers, l'administration des drogues doit permettre de passer les différentes barrières du corps avec une perte minimale d'activité. Après avoir

atteint la région souhaitée, le principe actif doit être capable de sélectivement détruire les cellules tumorales sans affecter les cellules saines.

En étudiant les différences physiologiques et morphologiques qui existent entre les cellules tumorales et saines, des études ont montré que les tumeurs exprimaient de manière importante certains récepteurs ou antigènes, indispensables à leur croissance. L'identification de ces récepteurs surexprimés dans les cellules tumorales a permis d'envisager une reconnaissance ciblée de celles-ci. Ainsi, une fois accumulé au niveau des tissus endommagés, le vecteur devrait être en mesure de rentrer majoritairement par endocytose dans les cellules tumorales de manière à réduire la toxicité sur les cellules saines adjacentes.

Le ciblage actif est réalisé en attachant des ligands ou des molécules d'adressage sur la structure des nanovecteurs. Ces derniers pourront ainsi identifier leur cible par liaison « récepteur-ligand » et être internalisés par endocytose dans les cellules tumorales (Figure 3). Cette stratégie permet donc de favoriser l'internalisation des principes actifs et ainsi d'induire une plus forte cytotoxicité tout en limitant l'apparition de la plupart des effets secondaires puisque les cellules saines sont moins affectées.²²

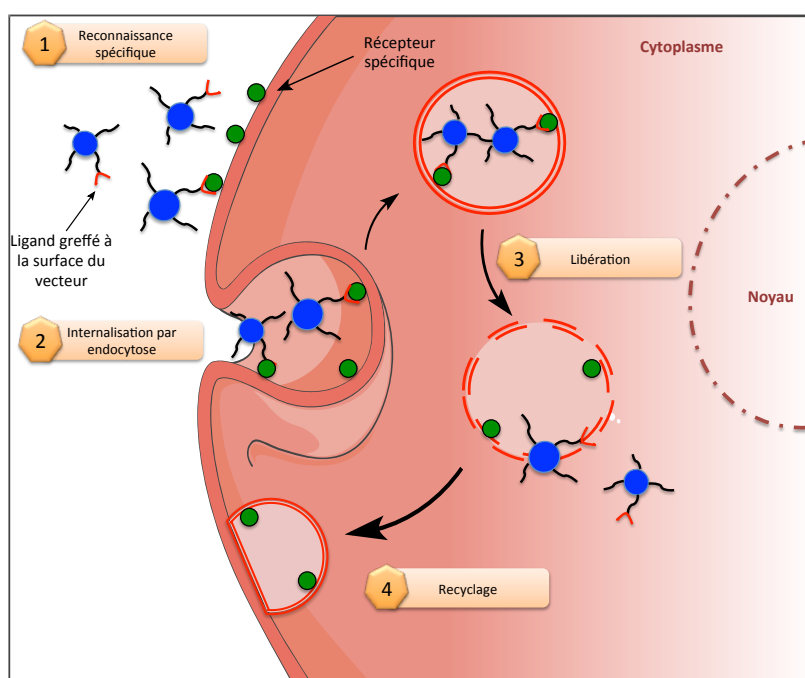


Figure 3 : Mécanisme du ciblage actif.

Dans cette partie, nous allons lister de manière non exhaustive les agents de ciblage les plus prometteurs²³ pour la conception de ces vecteurs de troisième génération :

- **L'acide hyaluronique**, polysaccharide naturel qui se lie spécifiquement au récepteur de la glycoprotéine CD44 surexprimé dans les cellules cancéreuses.^{24,25} Une fois à

l'intérieur des cellules, les polymères sont dégradés dans le cytoplasme par les hyaluronidases.

- **La biotine** ou vitamine H est présente en grande concentration dans les tumeurs car la prolifération des cellules requiert de forte dose en vitamine H. Cette vitamine peut donc être utilisée comme molécule d'adressage dans le but de cibler les récepteurs de la vitamine H surexprimés dans certains cancers.^{26,27}
- **Le folate** ou acide folique, nécessaire à la division cellulaire, est souvent utilisé comme molécule d'adressage car les récepteurs de folates sont fortement surexprimés à la surface de nombreux cancers tels que le cancer du sein, du rein, du poumon ou encore des ovaires.^{28,29} En effet, les cellules tumorales se divisent rapidement et ont donc besoin d'un apport important en vitamine.
- **La transferrine**, protéine assurant le transport du fer est fortement exprimée dans les cellules tumorales. La transferrine se lie de manière spécifique au récepteur de la transferrine qui est donc également surexprimé dans les cellules cancéreuses, notamment dans les cas du cancer du côlon, du sein, du rein ou encore de l'estomac.^{30,31}
- **Le RGD**, un peptide de 3 acides aminés (Arginine-Glycine-Aspartate), montre une affinité importante vis-à-vis des intégrines $\alpha V\beta 3$, fortement exprimées dans les cellules tumorales et impliquées dans l'angiogenèse.^{32,33}
- **Les aptamères**, ligands composés de courts acides nucléiques comme des séquences ARN³⁴ ou ADN³⁵ pouvant se lier spécifiquement à des cibles biomoléculaires allant de petites molécules aux protéines. Comme la transferrine ou le folate, ils peuvent être utilisés comme molécule d'adressage pour un ciblage actif efficace.^{36,37} Plusieurs traitements ayant recours à ces ligands sont notamment en phase clinique ou déjà sur le marché comme Macugen.³⁸
- **Les anticorps monoclonaux**, peuvent également être conjugués à la surface des vecteurs permettant ainsi une reconnaissance avec un antigène ou un récepteur spécifique. Les anticorps ayant une forte affinité avec la famille des récepteurs de facteur de croissance épidermique (R-EGF) sont les plus utilisés. Ces récepteurs sont très fortement exprimés dans plusieurs cancers tels que le cancer de la prostate, du sein, des ovaires ou encore du poumon. La fonctionnalisation des vecteurs avec des anticorps spécifiquement dirigés contre ces récepteurs a permis l'émergence de nombreux traitements ciblés.³⁹⁻⁴¹

Cette stratégie de ciblage sera présentée plus en détail dans le chapitre IV de ce manuscrit.

Le développement de cette génération de vecteur s'appuyant sur un ciblage actif connaît un succès grandissant. Quelques exemples de la littérature sont présentés dans le Tableau 2.

Nanovecteur	Ligand (récepteur)	Principe actif	Tumeur	Étude	Référence
Nano-micelle réticulée	Acide folique (récepteur du folate)	Doxorubicine (DOX)	Cancer du sein résistant à la DOX	In vitro	Wu <i>et al.</i> 2016
Immuno-liposome	Anticorps monoclonal (Intégrine $\beta 6$)	5-Fluorouracil	Cancer du colon	In vivo	Liang <i>et al.</i> 2015
Liposome	Peptide tandem (Intégrine α)	Paclitaxel	Cellules souches du gliome	In vivo	Liu <i>et al.</i> 2015
Nanoparticule PCDA-PEG	Biotine (Récepteur de la biotine)	DOX	Cancer du sein multi-résistant	In vivo	Guo <i>et al.</i> 2016
Micelle mixte PEG-PE	Transferrine (récepteur de la transferrine)	Curcumin et paclitaxel (PLX)	Cancer des ovaires résistant aux PLX	In vitro	Abouzeid <i>et al.</i> 2014
Micelles polymériques Pluronic	Peptide cyclique Arg-Gly-Asp (Intégrine α, β)	Paclitaxel et doxorubicine	Cellules de carcinome épidermoïde oral humaines multi-résistantes	In vitro	Chen <i>et al.</i> 2015
α-TOS-TPGS	Acide hyaluronique (récepteur CD44)	Docetaxel	Cancer du sein multi-résistant	In vivo	Liang <i>et al.</i> 2015

Tableau 2 : Exemples de vecteurs de troisième génération utilisés pour contourner les mécanisme de résistance aux drogues. Tableau adapté de la publication de Bar-Zeev *et al.* 2017.¹⁸

En résumé, trois générations schématisées dans la Figure 4 ont été développées et sont principalement utilisées en oncologie où de nombreux essais cliniques sont en cours. Ces nano-vecteurs alimentent donc de nombreux espoirs quant à la possibilité d'améliorer les traitements actuels.

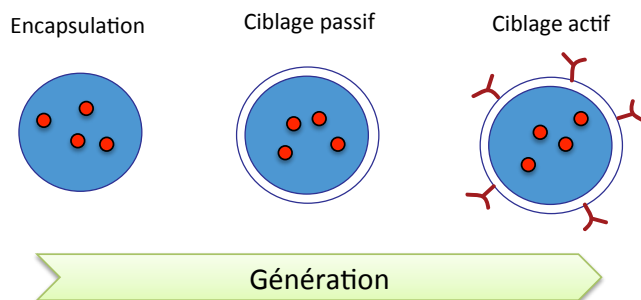


Figure 4 : Trois générations de vecteurs.

Parmi les différents systèmes de vectorisation existants, au laboratoire nous avons fait le choix d'axer notre travail sur le développement de micelles car elles présentent des propriétés intéressantes pour la délivrance d'anticancéreux et d'acides nucléiques. Celles-ci seront décrites en détail dans la deuxième partie de ce chapitre.

II. Les auto-assemblages d'amphiphiles en milieux aqueux

II.1 Nature des amphiphiles

Les amphiphiles sont des molécules naturelles ou synthétiques, constituées à la fois d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. En général, le groupement hydrophobe est constitué d'une longue chaîne hydrocarbonée alors que la tête hydrophile est non-ionique ou ionique (Figure 5).⁴²

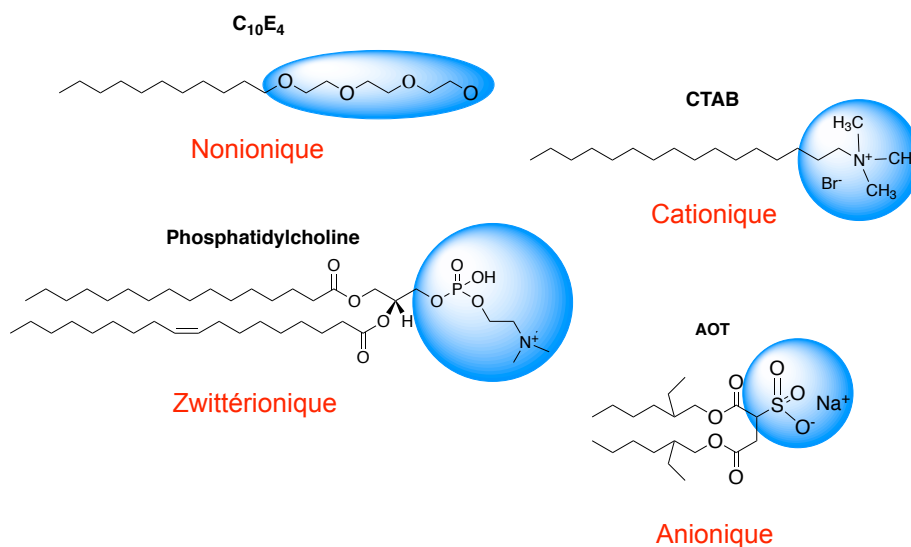


Figure 5 : Structure de différents types d'amphiphiles.

On recense quatre catégories majoritaires d'amphiphiles :

- (i) **Les amphiphiles non ioniques.** Ils sont composés notamment de chaîne de type oxyde de polyéthylène de longueur variable connectée à une chaîne alkyle hydrophobe et sont généralement utilisés dans la conception des produits ménagers et cosmétiques.
- (ii) **Les amphiphiles anioniques** se composent d'une tête chargée négativement et d'un contre-ion (ion sodium, potassium ou ammonium). Les têtes les plus utilisées sont des carboxylates, des sulfates, des sulfonates ou des phosphates.
- (iii) **Les amphiphiles cationiques** possèdent une tête chargée positivement provenant principalement d'ammonium quaternaire. Le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) et le bis(2-éthylhexyle) sulfosuccinate de sodium (AOT) font parti des amphiphiles les plus utilisés.
- (iv) **Les amphiphiles zwitterioniques** sont constitués d'une tête possédant à la fois une charge positive et négative.

En raison de leur capacité à réduire la tension superficielle, ces derniers sont souvent appelés tensio-actifs. C'est notamment pour cette raison qu'ils jouent un rôle important en tant que détergents, dispersants ou encore émulsifiants.⁴³

II.2 Interactions entre les auto-assemblages

L'incompatibilité thermodynamique entre les groupements hydrophiles et hydrophobes permet aux amphiphiles de s'auto-assembler pour former une grande variété d'édifices de structures diverses, de façon à minimiser les contacts des parties hydrophobes avec l'eau. Cette capacité d'auto-assemblage leur confère des propriétés uniques et des tailles allant du nanomètre au micron, ce qui les rend très attractifs pour diverses applications notamment en nanomédecine.

Les forces impliquées dans les auto-assemblages des amphiphiles sont des interactions dites douces. Cependant, le nombre très important d'interactions mises en jeu permet de maintenir les amphiphiles entre eux et ainsi d'assurer leur stabilité en solution.⁴⁴ Ce type d'interaction faible rend la structure plus flexible permettant ainsi une résistance plus importante aux perturbations mineures et une réversibilité des structures.

Parmi les forces motrices non-covalentes, on retrouve :

- (i) Les liaisons hydrogènes, assez fortes pour lier des biomolécules ensemble mais relativement faibles pour se casser lorsque c'est nécessaire.

- (ii) Les interactions hydrophobe, régulateurs de la tendance des molécules non polaires à s'auto-agréger.⁴⁵
- (iii) Les interactions électrostatiques.
- (iv) Les forces de Van der Waals.

II.3 Structures des auto-assemblages

La forme et la taille des micelles dépendent de plusieurs paramètres tels que la géométrie et la concentration de la molécule, la température, le pH et la force ionique. En contrôlant ces paramètres, différentes architectures peuvent être conçues. Dans ce but, plusieurs paramètres permettant de prédire la structure des agrégats ont été développés.

II.3.1 La balance hydrophile-lipophile

Le concept de la balance hydrophile-lipophile (HLB) a été introduit pour la première fois par William Griffin en 1949 pour des tensio-actifs non ioniques. Cette échelle empirique permet la classification des composés amphiphiles en fonction de la masse molaire des segments hydrophiles et hydrophobes.⁴⁶ Elle est calculée à partir de la formule suivante :

$$HLB = 20 * \frac{M_h}{M}$$

Où M_h représente la masse molaire de la partie hydrophobe et M la masse molaire totale du tensio-actif.

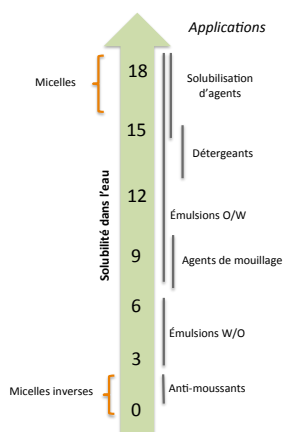


Figure 6 : Prédiction des applications des amphiphiles par la balance hydrophile-lipophile.

Très facile d'utilisation, cette échelle allant de 0 à 20, permet d'indiquer la solubilité globale du complexe, son affinité par rapport à certains solvants et donc potentiellement la nature des

objets formés (Figure 6).⁴⁷ Cependant, cet indice est peu adaptée à la compréhension de la relation entre la structure chimique des composés et la structure des auto-assemblages.

II.3.2 Le paramètre d'assemblage P

Dans les années 1960, Israelachvili⁴⁸, a proposé un paramètre permettant de prédire la structure des auto-assemblages : le paramètre d'assemblage P . Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$P = \frac{V_o}{A_o * l_c}$$

Avec V_o le volume occupé par la chaîne hydrophobe, A_o la surface de la tête polaire et l_c la longueur de la chaîne.

Selon la valeur de ce paramètre, les amphiphiles s'auto-assemblent en micelles sphériques ($P < 1/3$) ou cylindriques ($1/3 < P < 1/2$), en liposomes ($1/2 < P < 1$), en bicouches planes ($P = 1$) ou en micelles inverses ($P > 1$) (Figure 7).

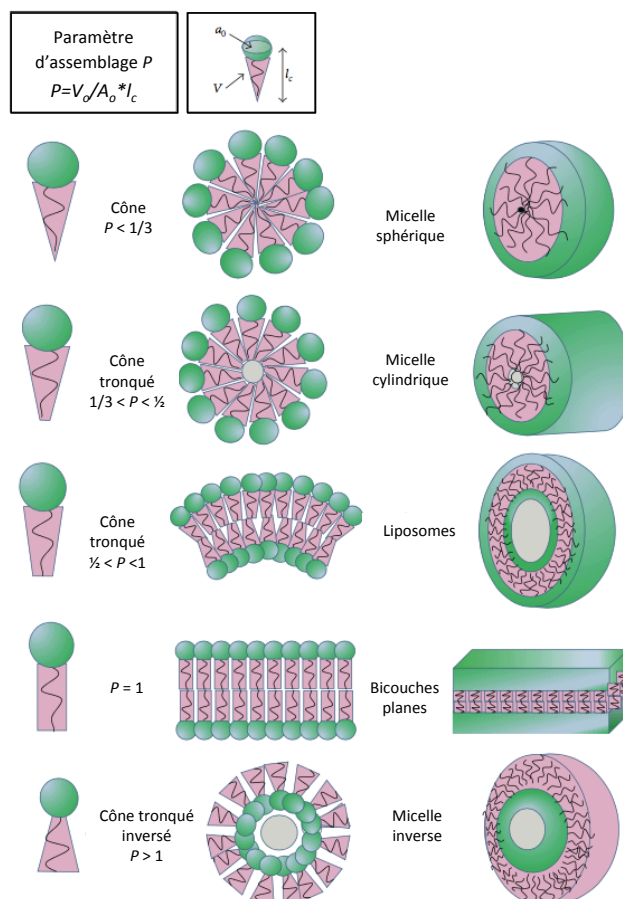


Figure 7 : Résumé des structures obtenues selon le paramètre d'assemblage P .⁴²

Selon la structure des amphiphiles utilisés, il est donc possible d'avoir accès à de nombreux types d'auto-arrangements. Ces particules nanométriques jouent un rôle important notamment comme vecteur de médicaments, de transfert d'ADN ou encore de stabilisateur de protéines. Les études sur ces différents objets étant très exhaustives, nous allons uniquement développer en détail la partie traitant des micelles sphériques, objets étudiés au cours de cette thèse. Les micelles polymériques ainsi que les micelles lipidiques et plus particulièrement les micelles polydiacétyléniques seront abordées dans la suite de ce chapitre.

III. Les micelles sphériques

III.1 Généralités sur les micelles

En 1910, James William McBain en mettant en évidence pour la première fois l'existence d'agrégats auto-arrangés pour expliquer la bonne conductivité électrolytique d'une solution de palmitate de sodium, découvre ce qui est communément appelé micelle.⁴⁹

Par la suite, deux types de micelles seront mis en évidence, les micelles directes formées en milieu aqueux et les micelles inverses formées en milieux organiques. La principale différence entre ces deux structures réside dans l'orientation des queues hydrophobes, elles forment le cœur dans le cas des micelles directes et sont orientées vers l'extérieur pour les micelles inverses (Figure 8).

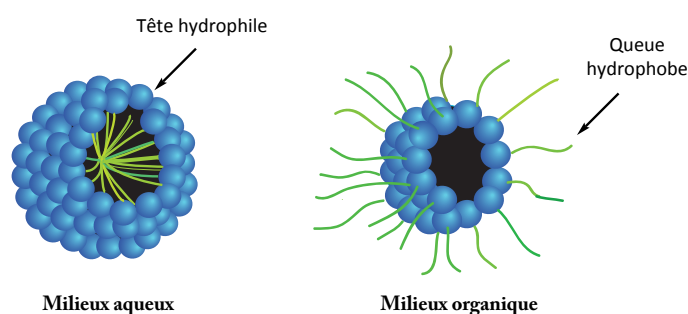


Figure 8 : Représentation des micelles directes obtenues en milieux aqueux et inverses en milieu organique.

Par la suite, seules les micelles directes feront l'objet de cette introduction car les milieux utilisés en nanomédecine sont généralement aqueux.

Pour que les micelles puissent se former, il est primordial de regrouper deux conditions :

- (i) Une concentration en monomère supérieure à la concentration micellaire critique (CMC),

- (ii) Une température supérieure à la température micellaire critique (TMC) ou point de Krafft, en dessous de laquelle les molécules précipitent au lieu de former des micelles.

Si ces deux caractéristiques ne sont pas respectées, les amphiphiles resteront sous forme isolé et aucune micelle ne sera formée.

De plus, la taille des micelles sera comprise entre 5 et 100 nm en fonction de la structure de l'amphiphile. En effet, les forces de répulsions entre les têtes polaires permettent de limiter la taille des objets à l'ordre du nanomètre.

Dans la suite de cette partie, nous allons présenter les deux différentes familles de micelles qui existent à savoir les micelles polymériques et les micelles lipidiques.

III.2 Les micelles polymériques

Les micelles polymériques sont constituées de copolymères à blocs. Ces derniers sont définis comme étant des macromolécules composées de réarrangement linéaire et/ou radial de deux ou plusieurs blocs de compositions variées. Un « bloc » représente un enchaînement d'unités monomériques de même nature.

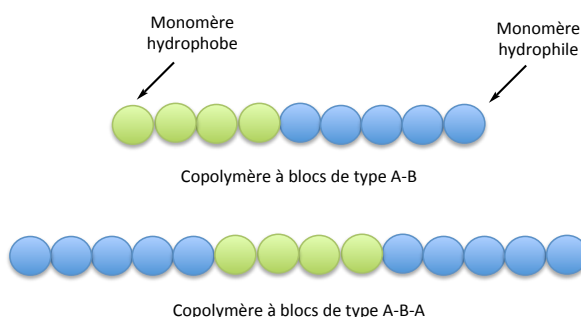


Figure 9 : Schéma représentatif des copolymères à blocs.

En général, les micelles de copolymères contiennent un bloc hydrophobe A et un ou deux blocs hydrophiles B, ainsi on obtient des copolymères à blocs de type A-B (di-blocs) ou A-B-A (tri-blocs) (Figure 9).

III.2.1 Formation des micelles de copolymères à blocs

La méthode la plus simple et la plus utilisée pour formuler les micelles de copolymères consiste à solubiliser l'ensemble des blocs dans un « bon solvant » à une concentration supérieure à la CMC, puis graduellement un solvant capable de solubiliser un seul des blocs va être introduit jusqu'à remplacer totalement le premier solvant par dialyse. Ce processus

permet de former des agrégats contrôlés de forme sphérique. En utilisant comme second solvant l'eau, on obtient des micelles directes possédant un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile.⁵⁰

III.2.2 Structure des copolymères à blocs

Les copolymères sont obtenus par synthèse contrôlée en utilisant des ratios entre les blocs, des poids moléculaires et des structures chimiques variées. En ajustant la structure des amphiphiles, la taille et la morphologie de la micelle peuvent ainsi être facilement contrôlée.

En général, les blocs hydrophiles sont constitués d'oxyde de polyéthylène (PEO), appelé également polyéthylène glycol (PEG) de poids moléculaire allant de 1 à 15 kDa. Plus rare, l'alcool polyvinylique et le poly(*N*-vinylpyrrolidone) peuvent être utilisés.⁵¹ La couronne formée à partir de ces polymères joue un rôle clef puisqu'elle permet d'améliorer la biocompatibilité tout en assurant la protection des molécules encapsulées à l'intérieur du cœur hydrophobe. Biocompatibles et connus pour inhiber les interactions avec les protéines, les polymères de type PEG sont les plus utilisés.

La diversité des chaînes constituant les blocs hydrophobes est beaucoup plus importante. Ainsi, des motifs oxyde de propylène, de caprolactone ou encore d'acide polylactique peuvent être utilisés (Figure 10).^{52,53}

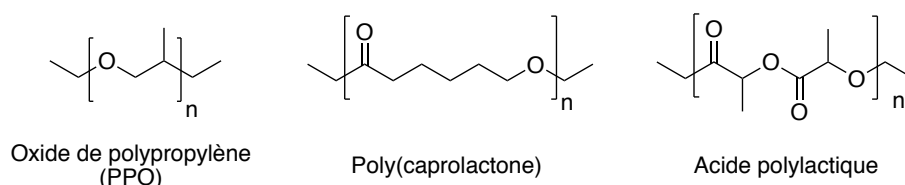


Figure 10 : Exemples de polymères utilisés pour former les blocs hydrophobes.

En raison de cette forte diversité au niveau des blocs, de nombreuses combinaisons ont été envisagées pour la préparation des micelles di ou tri-blocs. Quelques exemples sont regroupés dans le Tableau 3.

Nature des monomères	Exemple de polymères
Di-bloc	<ul style="list-style-type: none"> • Poly(styrène)-b-PEO⁵⁴ • PEO-b-poly(ϵ-caprolactone)⁵⁵
Tri-bloc	<ul style="list-style-type: none"> • PEO-b-PPO-b-PEO⁵⁶ • Poly(ϵ-caprolactone)-b-PEG-b-poly(ϵ-caprolactone)⁵⁷

Tableau 3 : Exemples de polymères utilisés pour la préparation des micelles.

III.2.3 Stabilisation par la réticulation

Un des principaux inconvénients des micelles provient de leur nature dynamique qui conduit à des instabilités à haute température, à basses concentrations et sous certains changements de solvant. Pour contourner cette limitation, il est possible d'introduire des groupements polymérisables sur les polymères afin de réaliser une réticulation covalente entre les différents monomères. Cette réticulation offre ainsi une plus grande stabilité à l'ensemble de la nanostructure en renforçant les faibles interactions à l'origine des auto-arrangements.

Les micelles polymériques peuvent être réticulées à différents niveaux : par le cœur, la couronne et la surface (Figure 11).⁵⁰

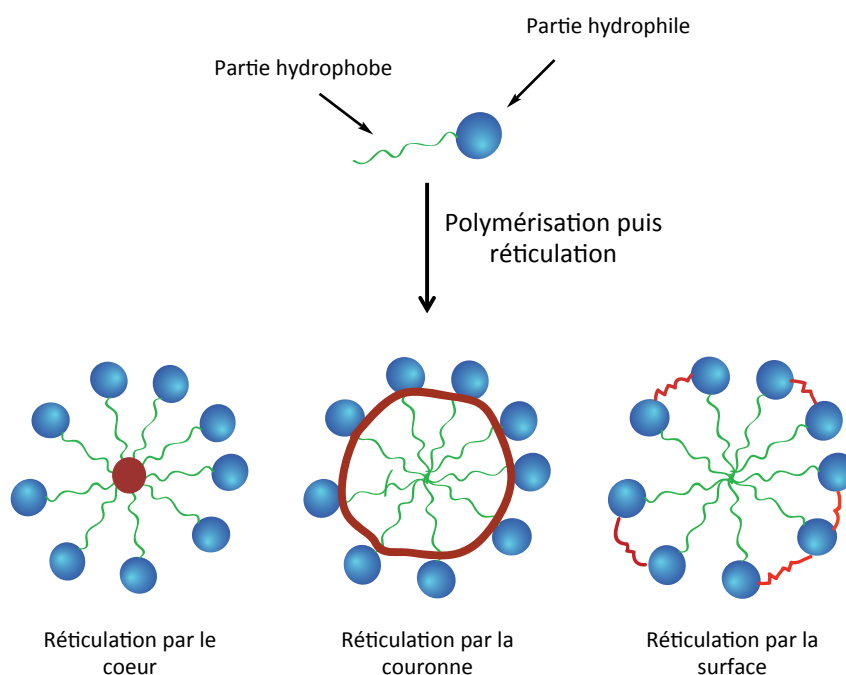


Figure 11 : Type de réticulation des micelles polymériques les plus courantes.

III.2.3.1 Réticulation par le cœur

En 1979, les équipes de Prochaska et Baloch sont les premiers à introduire le concept de stabilisation des micelles de copolymères à blocs par réticulation du cœur. Celle-ci se fait suite à l'activation des groupements polybutadiènes par irradiation photochimique.⁵⁸ Suite à cette découverte, la réticulation a énormément été utilisée pour stabiliser les constructions micellaires.^{59,60} Les méthodes les plus employées pour la préparation des micelles réticulées par le cœur sont :

- (i) **La polymérisation radicalaire**, la plupart du temps des groupements allyliques sont ajoutés sur les blocs et peuvent polymériser en présence d'AIBN. Notamment

l'équipe de Kataoka a développé des micelles polymériques formées à partir de copolymères de type PEG-b-poly lactide, fonctionnalisées avec des groupements méthacrylate sur le bloc hydrophobe.⁶¹

- (ii) **L'addition d'agent bifonctionnel**, utilisé comme agent de réticulation lorsque les blocs formant le cœur contiennent des groupements réactifs. Par exemple, Siegward *et al.* ont utilisé des copolymères à blocs de PEG-méthacrylates contenant des groupements époxydes capables de réagir en présence de diamines pour former des groupements β -hydroxyle.⁶²
- (iii) **La construction de pont disulfure**, souvent utilisée notamment grâce à la réversibilité qu'elle présente *in vivo*. Par exemple, l'addition de résidus lysine a permis d'obtenir des micelles polymériques PEG-Poly(L-lysine) (PEG-PLL) réticulées par le cœur.⁶³ (Figure 12).

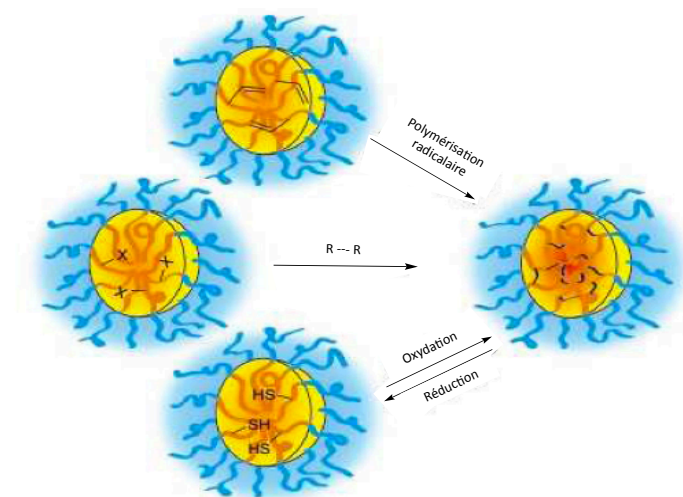


Figure 12 : Principales méthodes utilisées pour réticuler les micelles polymériques par le cœur. Adaptée de la publication de Tatelli *et al.*⁵⁹

III.2.3.2 Réticulation par la couronne

La première réticulation par la couronne a été réalisée par le groupe de Karen Wooley en 1996.^{64,65} Ils ont montré que les micelles pouvaient être réticulées *via* l'utilisation de groupements chimiques qui réagissent entre deux blocs après formulation de la micelle. Dans ce premier exemple, la réticulation se fait donc par polymérisation radicalaire du motif styryl présent sur le copolymère PS-QP4VP (Figure 13) en présence d'acide 4,4'-azobis-4-cynoalérique.

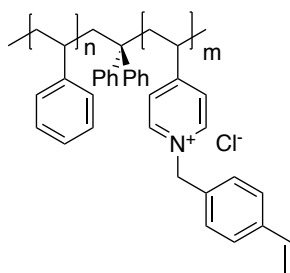


Figure 13 : Structure du PS-QP4VP.

La réticulation par la couronne ou par la surface permet de conserver la capacité d'encapsulation des vecteurs. Cependant, sur des copolymères di-blocs de type A-B, cette réticulation peut provoquer des fusions entre les micelles.⁶⁶ Pour contourner ce problème, l'équipe de Armes a proposé une méthode utilisant des copolymères tri-blocs de type ABC.⁶⁷ Alors que la réticulation se fait sur le bloc intérieur B, le bloc hydrophile A joue le rôle de stabilisateur. Inspirés par ces travaux, de nombreuses micelles réticulées par la couronne ont émergé et une attention particulière a été dédiée à la construction de copolymères non linéaires tels que les copolymères étoilés⁶⁸, branchés⁶⁹ ou encore en Y⁷⁰. Notamment, un copolymère en forme d'Y, mPEG-b-PLG-b-(PLA)₂, biodégradable a été construit et réticulé par la couronne par couplage peptidique en utilisant comme agent de réticulation la cystamine, espaceur clivable en milieu réducteur (Figure 14).⁷¹ Cette étude a montré que le relargage de la doxorubicine (DOX) encapsulée était plus contrôlé qu'avec un analogue non réticulé.

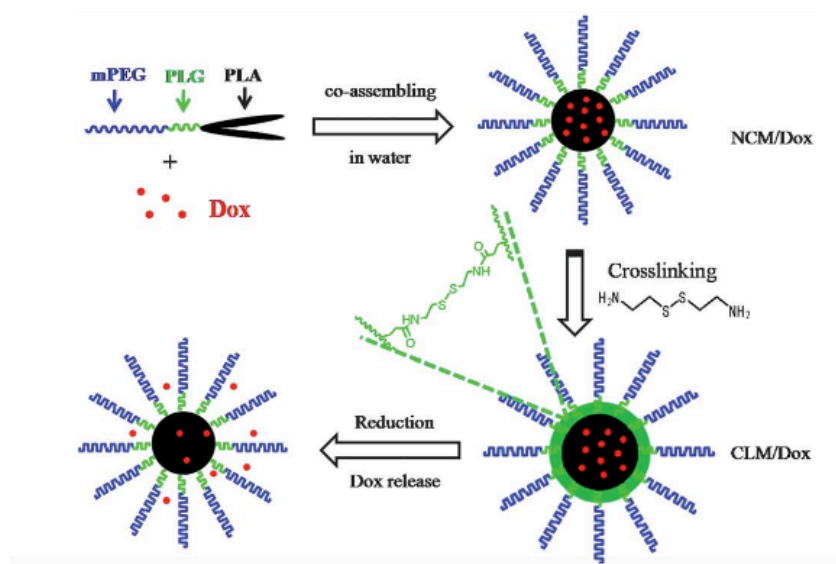


Figure 14 : Formation des micelles de copolymères mPEG-PLG-(PLA)₂ réticulées par la couronne (d'après la publication de Yue et al. *Biomacromolecules*, 2010).⁷¹

III.2.3.3 Réticulation par la surface

Il existe deux stratégies couramment utilisées pour réticuler les micelles polymériques par la surface. Comme pour la réticulation par le cœur, cette dernière peut se faire en ajoutant un motif polymérisable à l'extrémité du bloc hydrophile. Par exemple, le groupe du Dr. Tae Gwan Park a développé des micelles basées sur un polymère diblocs PEG-PLGA comportant des groupements allyliques disponibles à la surface qui peuvent être polymérisés en présence de *N*-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) (Figure 15).⁷²

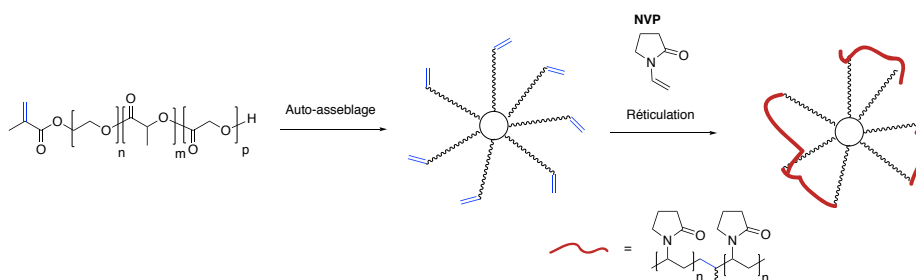


Figure 15 : Formation des micelles PEG-PLGA stabilisées par polymérisation entre les groupements allyliques et la NVP.

Une autre approche consiste à introduire des groupements fonctionnels en surface de la micelle, pouvant être reliés par l'intermédiaire d'un composé extérieur. Cette méthode a permis notamment la conception de micelles Pluronic PEO-PPO-PEO réticulées par la surface (Figure 16).⁷³

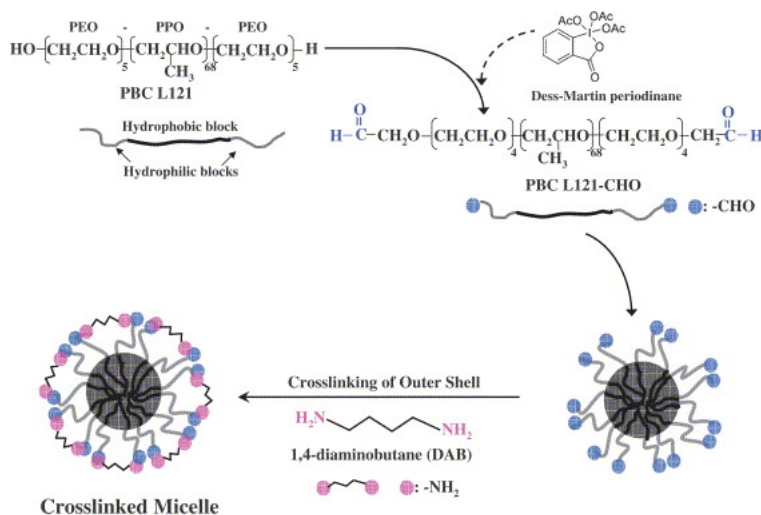


Figure 16 : Formation des micelles PEO-PPO-PEO réticulées par la surface par oxydation des fonctions alcools en aldéhyde puis couplage des composés aminés par des bases de Schiff (d'après Yang et al. Biomaterials, 2007).⁷³

Les fonctions alcool terminales sont dans un premier temps oxydées en aldéhydes par le réactif de Dess-Martin, puis mis en présence de diaminobutane (DAB) afin de créer la réticulation grâce à la formation de liaison imines.

III.3 Les micelles lipidiques

Au cours des dernières années, les résidus phospholipidiques ont connu un intérêt grandissant notamment pour la formation des cœurs hydrophobes des micelles. Ces composés, grâce à la présence des deux chaînes grasses acyles, apportent une stabilité plus importante aux particules que les amphiphiles polymériques habituellement utilisés. En effet, elles permettent d'augmenter considérablement les interactions hydrophobes entre les chaînes formant le cœur de la micelle. Ces lipides, combinés à des polymères hydrosolubles tels que PEG permettent de former des micelles très stables possédant de faibles CMC. La structure de ces particules est similaire à celle obtenue avec les copolymères di-blocs de type A-B, à l'exception que le cœur est constitué de courts phospholipides.

Par exemple, des micelles formulées à partir de polyéthylène glycol-phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) ont été développées (Figure 17).⁷⁴

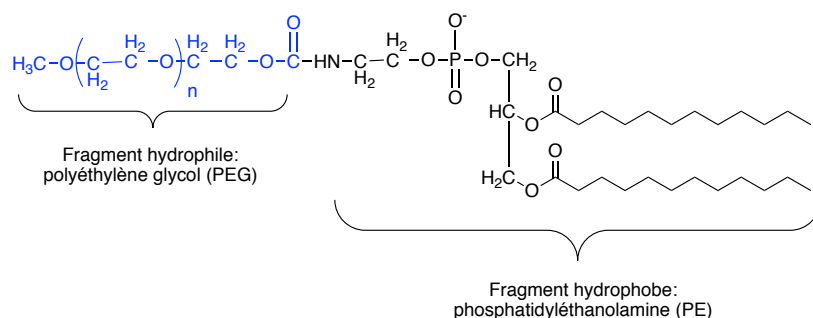


Figure 17 : Structure du composé PEG-PE.

Les micelles formulées à partir de ces lipides possèdent la capacité d'encapsuler divers anticancéreux hydrophobes tels que le paclitaxel et la camptothécine et se sont révélées très stables. Elles sont ainsi capables de s'accumuler *via* l'effet EPR dans les tissus présentant une vascularisation perméabilisée.

IV. Les micelles polydiacétyléniques

Les monomères diacétylènes (DA) sont des amphiphiles constitués d'un motif di-yne inséré dans une chaîne carboné hydrophobe relié *via* un espaceur à une tête polaire. Les

polydiacétylènes (PDA) sont des polymères conjugués linéaires résultant de la polymérisation de ces monomères DA.

Depuis la découverte de cette famille d'amphiphiles par l'équipe du Dr. Wegner dans les années 1960, ces composés ont suscité un intérêt particulier en raison de leurs propriétés chromatique et fluorescente uniques.⁷⁵⁻⁷⁷

IV.1 Mécanisme de la polymérisation

Les polydiacétylènes sont obtenus à partir d'une addition 1,4 entre les alcynes des différents monomères suite à une irradiation UV ou γ (Figure 18). Pour que cette réaction ait lieu, certaines contraintes géométriques doivent être respectées : les monomères doivent être distants deux à deux d'environ 5 Å et former un angle de 45 °C.⁷⁸ Cette polymérisation est donc favorisée en présence de structures organisées tel que les auto-assemblages d'amphiphiles. Si l'assemblage moléculaire des monomères ne remplit pas ce cahier des charges, des additions 1,2, 1,6 ou des réactions d'hydrolyse sont favorisées n'entraînant pas la formation des PDA.⁷⁹

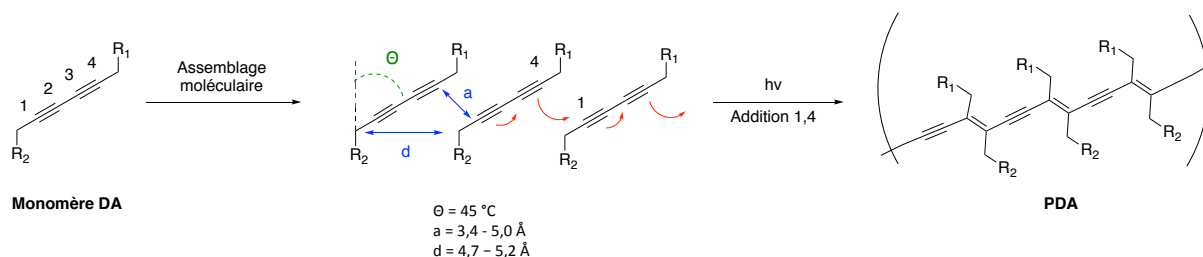


Figure 18 : Mécanisme de polymérisation des PDA.

Le mécanisme radicalaire impliqué se déroule en quatre étapes. Tout d'abord, l'étape d'initiation réalisée par irradiation UV ou γ permet de produire un intermédiaire biradical qui va rapidement se réarranger en carbènes, puis il y a excitation vibrationnelle des motifs polydiacétylènes et addition sur un monomère voisin pour former un dimère diradical. Enfin, une étape de propagation permet de propager la réaction entre les chaînes donnant naissance à un polymère conjugué constitué d'un enchaînement de doubles et triples liaisons.⁸⁰

La formation de ce réseau ène-yne hautement conjugué va permettre une forte délocalisation des électrons π à l'origine des propriétés spectrales particulières des PDA.⁸¹

En effet, plus la conjugaison dans le polymère est forte, plus les orbitales moléculaires HOMO (orbitale moléculaire la plus haute occupée) et LUMO (orbitale moléculaire la plus basse vacante) possèdent des niveaux d'énergie proches. Ainsi, pour passer d'une orbitale à

l'autre, moins d'énergie sera nécessaire. Or, d'après la relation de Planck ($E = h/\lambda$), l'énergie associée à une transition est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de cette transition. En conséquence, plus l'énergie de la transition est faible, plus la longueur d'onde d'absorption est grande : c'est l'effet bathochrome.

Ce phénomène est à l'origine des différences colorimétriques qui existent entre les diverses structures formées avec ces monomères DA. Les PDA fortement conjugués présenteront ainsi un maximum d'absorption dans le rouge (600-700 nm) alors que des PDA plus faiblement conjugués absorberont dans le bleu. Dans le cas des micelles sphériques, un maximum d'absorption situé dans le violet (400 nm) a été observé, ceci est dû aux fortes contraintes de courbures qui permettent seulement une très faible conjugaison.

En raison de ces propriétés physiques, les composés diacétyléniques sont devenus incontournables notamment pour la fabrication de bio- ou chemo-senseurs utilisés pour la détection de molécules chimiques ou biologiques.^{82,83}

IV.2 État de l'art des PDA

Des études ont montré que les systèmes PDA étaient capables de s'organiser en vésicules^{84,85}, en monocouche de Langmuir⁸⁶, en film^{87,88} ou encore en cristal⁸⁹. Mais dans cette partie nous allons uniquement nous intéresser à leur réarrangement en micelle, objets étudiés au cours de cette thèse.

Alors que les vésicules constituées de PDA ont été largement étudiées pour diverses applications, la littérature concernant les micelles-PDA est beaucoup plus restreinte.

Ainsi, l'équipe d'Éric Doris a développé des micelles-PDA comportant une tête polaire de type acide nitrilotriacétique (PDA-NTA) ou polyéthylène glycol (PDA-PEG). En raison de leur forte accumulation dans les tumeurs, ces nanoparticules se sont révélées être de bons candidats pour l'imagerie médicale et la délivrance de médicament (Figure 19).^{90,91}

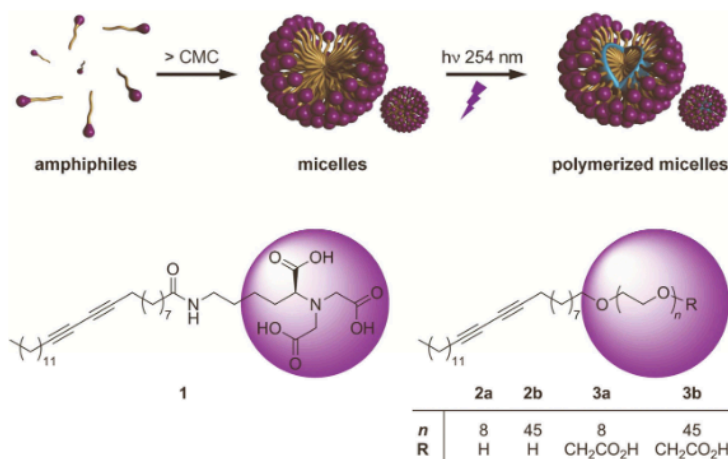


Figure 19 : Formulation des micelles PDA-NTA et PDA-PEG (d'après Mackiewicz et al. 2011).⁹¹

Des micelles-PDA possédant une surface zwitterionique « furtive » ont également été testées sur un modèle de xénogreffe murin du cancer du sein. L'étude a démontré que celles-ci s'accumulaient à la surface de la tumeur permettant ainsi leur délimitation. Ce système est donc prometteur pour l'imagerie des tumeurs.⁹²

Récemment, cette même équipe a développé un nouveau catalyseur *via* l'encapsulation de cuivre à l'intérieur des micelles PEGylées polydiacétyléniques. Ce catalyseur colloïdal original a permis de réaliser une réaction de cycloaddition de Huisgen dans l'eau dans laquelle la micelle joue le rôle d'un nanoréacteur.⁹³

En 2008, le groupe de Joon Sig Choi a synthétisé des micelles polydiacétyléniques de type methoxypolyéthylèneglycol (PDA-mPEG) possédant des caractéristiques chromiques très intéressantes.⁹⁴ Ces micelles PEGylées ont également permis d'encapsuler et de stabiliser des boîtes quantiques (*quantum dot*) CdSe/ZnS luminescentes.⁹⁵

De plus, en 2014 une stratégie élégante permettant de lier de manière covalente un peptide cytotoxique (magainine II) à la surface des micelles-PDA a été développée. Ces objets possèdent une forte toxicité sur les cellules cancéreuses et ont permis la réduction de la taille de tumeurs implantées dans les souris (Figure 20).⁹⁶

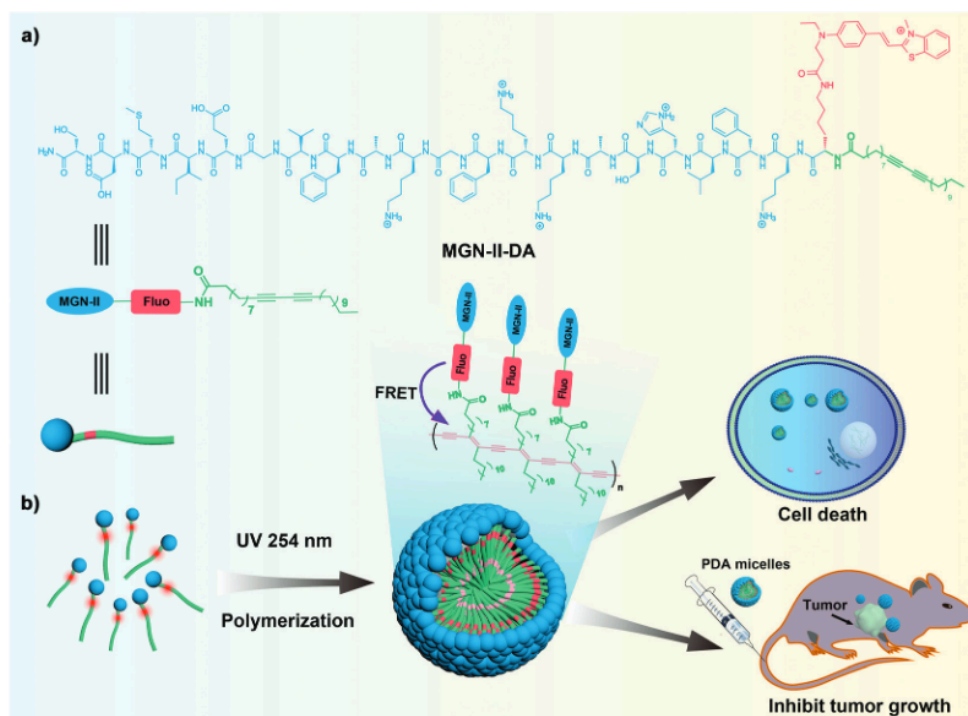


Figure 20 : Structure (a) et applications (b) des micelles MGN-II-PDA (d'après Yang et al. 2014).⁹⁶

Ces objets ont également été étudiés pour une technique de détection de biomarqueurs et d'agents biologiques pathogènes : OLISA (*oligonucleotide-linked immunosorbent assay*). Cette technique permet de détecter la présence d'une protéine grâce à un signal fluorescent produit par le clivage d'une sonde ARN pro-fluorescente. Après capture de la cible par un premier anticorps, la révélation est réalisée par un anticorps de détection comportant une séquence ADN complémentaire de la sonde ARN pro-fluorescente (Figure 21). Après appariement des deux brins complémentaires, la RNase H dégrade le duplex ainsi formé libérant la fluorescence. L'utilisation des micelles-PDA modifiées par de multiples brins d'ADN a ainsi permis d'améliorer la sensibilité du système.⁹⁷

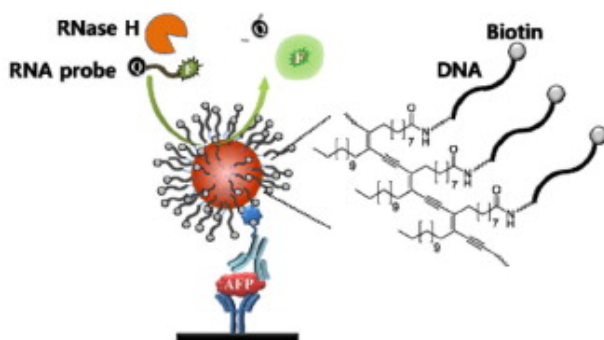


Figure 21 : Présentation du système micelles-PDA pour la réalisation d'un test OLISA (d'après Hoa Thi Hoang et al. 2013).⁹⁷

Une étude poussée des micelles PDA-NTA a également été menée par l'équipe d'Alain Wagner afin de mieux comprendre l'impact de la polymérisation sur la structure, la stabilité et les propriétés d'encapsulation de ces auto-assemblages.⁹⁸ Celle-ci a montré que la polymérisation permettait de réduire fortement la CMC indiquant une stabilisation du système tout en conservant les propriétés de solubilisation de molécules hydrophobes. Des études similaires ont également été réalisées par notre laboratoire sur des micelles polydiacétyléniques PEGylées.² Il a été démontré qu'ajuster le temps de polymérisation des micelles permettait d'optimiser le ratio entre la délivrance intracellulaire et la cytotoxicité. Par la suite, la fonctionnalisation du cœur de structures polydiacétyléniques a été réalisée *via* une réaction de « click ».⁹⁹

Au laboratoire, les travaux d'Emmanuelle Morin-Picardat ont permis notamment la synthèse de plusieurs amphiphiles polydiacétylènes originaux (Figure 22). Leur auto-assemblage en micelles cationiques a permis d'obtenir des vecteurs efficaces pour la délivrance de gènes.³

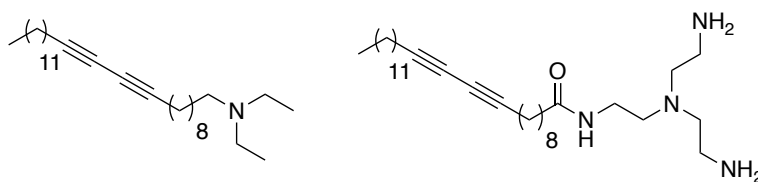


Figure 22 : Structures des composés (11,8)-NEt₂ (gauche) et (11,8)-N(NH₂)₂ (droite) actifs en transfert de gène.

IV. Applications thérapeutiques des micelles lipidiques & polymériques

En raison de leur dualité hydrophobe/hydrophile, les micelles sont des candidats prometteurs pour la délivrance de composés d'intérêt biologique. D'une part, le cœur micellaire constitue un microenvironnement permettant d'incorporer et donc de solubiliser des molécules hydrophobes. D'autre part, leur surface hydrophile peut facilement être fonctionnalisée ouvrant la voie à un ciblage thérapeutique. Combinée à leur taille nanométrique, ces objets possèdent donc des propriétés très intéressantes pour la délivrance de médicament, d'agent de contraste ou encore d'acides nucléiques.

IV.1 Délivrance de médicaments

La solubilisation des anticancéreux est une priorité cruciale. La plupart des cytotoxiques sont connus pour avoir une très faible solubilité dans l'eau, c'est le cas notamment du paclitaxel ($< 0,1 \mu\text{g/mL}$), du méthotrexate ($0,17 \text{ mg/mL}$) ou encore du docétaxel ($0,025 \mu\text{g/mL}$). Cette caractéristique a pour conséquence une faible distribution dans le corps et la formation d'agrégat conduisant à des concentrations locales très élevées responsables de nombreuses lésions. Néanmoins, ce caractère hydrophobe permet aux molécules de pénétrer les membranes des cellules et ainsi d'atteindre leur cible.

La stratégie couramment utilisée pour pallier les problèmes de faible biodistribution est d'utiliser certains excipients acceptés cliniquement tels que l'éthanol ou le Cremophor El (*polyethoxylated castor oil*). Cependant, ces derniers sont toxiques et donc à l'origine de nombreux effets secondaires. De plus, la précipitation possible de la drogue après dilution en milieux aqueux reste un danger majeur. Une alternative à cette stratégie repose sur l'utilisation des nanovecteurs. En tant que vecteurs, les micelles possèdent de nombreuses propriétés attractives :

- (i) Solubilisation des drogues augmentant ainsi la biodisponibilité
- (ii) Capacité d'encapsulation importante
- (iii) Protection du principe actif
- (iv) Réduction de la toxicité et d'autres effets secondaires
- (v) Amélioration de la diffusion de la drogue à travers les barrières physiologiques
- (vi) Taille nanométrique compatible avec un effet EPR
- (vii) Fonctionnalisation par des molécules d'adressage

En raison de ces nombreux avantages, la communauté scientifique cherche à les exploiter pour la vectorisation de molécules thérapeutiques.¹⁰⁰

Par exemple, on retrouve le Pluronic® (commercialisé par BASF), micelle polymérique tri-bloc composée d'une chaîne hydrophobe de polyoxyde de propylène et de deux chaînes hydrophiles PEG. Il permet une encapsulation efficace de principes actifs et est capable d'induire une chimio-sensibilisation des cellules cancéreuses multi-résistantes.¹⁰¹ En clinique, cette plateforme a permis d'augmenter de manière significative l'efficacité du traitement avec la doxorubicine encapsulée dans le Pluronic® comparée à l'action de la drogue seule.¹⁰² On retrouve également le Genexol™-PM, formulation micellaire constituée d'un copolymère à bloc PEG-PLA capable de solubiliser le paclitaxel en absence du Cremophor El. Cette

formulation a permis notamment d'augmenter les doses administrées tout en abaissant l'hypersensibilité.¹⁰³

IV.2 Délivrance d'agent de contraste

L'imagerie médicale est un élément essentiel pour le diagnostique et le suivi des maladies. Elle recouvre une variété de technologies s'appuyant sur l'exploitation des rayons X, de la radioactivité de certains éléments ou des champs magnétiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont la scintigraphie γ , l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) et la tomographie aux rayons X couramment appelé scanner.

La scintigraphie γ consiste à injecter des produits radioactifs tels que l'indium (^{111}In), le technétium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ou le galium (^{67}Ga) qui vont venir se fixer de manière non permanente sur certains tissus ou organes.

L'IRM est basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire. Elle détecte les signaux émis par les protons qui se relaxent après une excitation électromagnétique. L'agent de contraste paramagnétique du gadolinium est l'un des plus utilisés.

La tomographie aux rayons X repose quant à elle sur la mesure de l'absorption des rayons X par les tissus. En ce qui concerne cette technique, on injecte des éléments lourds tels que l'iode, le brome ou encore le baryum.

Ces différentes techniques d'imagerie nécessitent la délivrance d'une quantité suffisante d'agents de contraste afin d'avoir une bonne sensibilité ainsi qu'un bon contraste. Si les micelles sont utilisées en tant qu'agent d'imagerie c'est parce qu'elles possèdent la capacité de concentrer une grande quantité d'agent de contraste au sein d'un petit volume.

Concernant la scintigraphie γ et la résonance magnétique, les atomes radioactifs ou paramagnétiques sont généralement fixés grâce à des chélatants introduits sur les polymères. La plupart des chélatants contiennent des fonctions acides carboxyliques permettant d'emprisonner l'agent de contraste. On retrouve par exemple le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique), l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) ou encore le DOTA (acide tétracyclododécane tétraacétique). Divers études menées ont montré que l'utilisation des micelles notamment de copolymère en tant que transporteur d'agent de contraste était très prometteuse. Par exemple, Shiraishi *et al.* ont étudié la chélation des ions Gd^{3+} par les micelles de copolymère PEG-b-poly(L-lysine-DOTA) pour une utilisation en IRM. Les études de biodistribution ont montré que ces micelles étaient capables de s'accumuler fortement dans la tumeur, bien qu'après 24h la majorité se retrouve dans le foie

et la rate.¹⁰⁴ L'équipe de Vladimir Torchilin a réussi à complexer de l'¹¹¹Indium à des micelles DTPA-Phosphatidyléthanolamine pour une utilisation en scintigraphie γ .¹⁰⁵

Enfin, des micelles pluronic[®]/PEG ont été utilisées pour encapsuler un dérivé iodé, le lipiodol[®]. Leur injection chez la souris a permis d'observer un fort contraste jusqu'à 72h après injection.¹⁰⁶ Malgré leur grand avenir dans ce domaine, à notre connaissance elles ne sont pas encore en essais cliniques.¹⁰⁷

IV.3 Utilisation en transfert d'acides nucléiques

Le concept de thérapie génique est né suite aux nombreuses découvertes réalisées en biologie moléculaire et en génétique. Celle-ci consiste à soigner ou à prévenir des maladies en utilisant des acides nucléiques (ADN ou ARN) comme médicament. Ainsi, selon la maladie visée, la thérapie par les gènes permet de transférer dans les cellules une copie d'un gène fonctionnel remplaçant le gène altéré à l'origine de la maladie, un gène à action thérapeutique ou encore de l'ARN permettant de réguler ou d'inhiber l'expression d'un gène défectueux. Elle peut donc être mis à profit pour le traitement des maladies génétiques mais également pour les maladies acquises tels que le cancer, les pathologies infectieuses (hépatites et SIDA) ou les maladies neurodégénératives. Cependant, le caractère hydrophile et la nature polyanionique des acides nucléiques les empêchent de franchir les barrières cellulaires et les rendent sensibles à la biodégradabilité. Le recours à des vecteurs assurant leur transport jusqu'à leur cible est donc primordial.

Le premier vecteur synthétique (si l'on excepte les précipités de phosphate de calcium) décrit pour la transfection de gène a été un lipide cationique, le DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane).¹⁰⁸ Très vite, d'autres vecteurs inspirés de la structure du DOTMA ont été synthétisés tels que le DOTAP¹⁰⁹ et le DOGS¹¹⁰ (Figure 23).

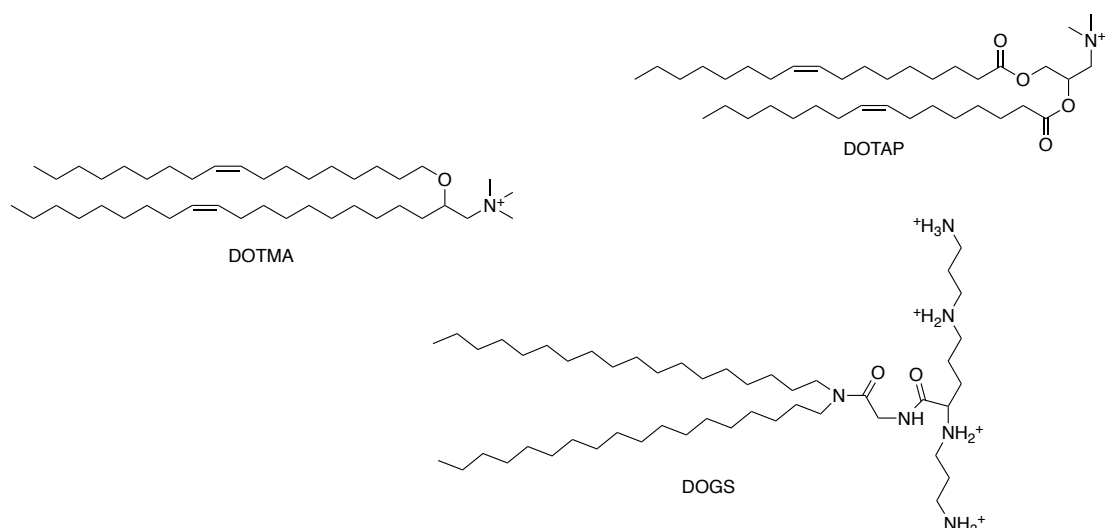


Figure 23: structures de lipides cationiques utilisés pour le transfert de gènes.

Ces lipides cationiques sont capables d'interagir avec l'ADN par interactions électrostatiques. Les complexes ainsi formés ont une charge de surface globale généralement positive – ce qui leur permet de passer la barrière cytoplasmique par endocytose (dans 98 % des cas) ou par fusion des lipoplexes avec la membrane plasmique (2 %).¹¹¹

Par la suite, les micelles ont également été utilisées pour le transfert d'acides nucléiques. Par exemple, des micelles polymériques formées à partir d'un copolymère tri-blocs poly(éthylène glycol)-*b*-(poly(propylène sulfide))-*b*-poly(éthylène imine) ont été étudiées en tant que vecteur non-viral pour la délivrance d'ADN *in vitro* et *in vivo* dans des cellules de mélanome.¹¹² La réduction de la croissance tumorale ainsi que la quantification de la protéine associée au gène délivré a montré que ce dernier avait été transfecté de manière efficace.

L'exemple ci-dessus illustre le potentiel des micelles à délivrer des gènes mais celles-ci ont également démontré leur potentiel pour la délivrance d'ARN interférent. Ce point sera développé en détail dans le chapitre II.

Ces auto-assemblages micellaires ont donc démontré un fort potentiel pour la délivrance d'agents thérapeutiques incluant les anticancéreux et les acides nucléiques dans les cellules tumorales. Au fil des années, des études ont également montré que ces objets pouvaient être utilisés pour co-délivrer plusieurs principes actifs simultanément. Le principe et l'intérêt de cette nouvelle approche seront développés dans le chapitre III.

V. Conclusion et objectifs

À travers cette introduction générale, nous avons pu comprendre l'intérêt de développer des nanovecteurs à des fins médicales que ce soit pour le diagnostique ou la thérapie. Il existe de nombreuses familles de nanoparticules mais nous avons souhaité nous concentrer sur les auto-assemblages d'amphiphiles en micelles sphériques. En effet, ces objets présentent de nombreuses propriétés intéressantes telles que leur taille, leur capacité d'encapsulation ou encore la possibilité de les fonctionnaliser pour réaliser un ciblage passif ou actif.

En s'appuyant sur les travaux précédemment réalisés au laboratoire, nous avons souhaité développer des vecteurs conçus à partir d'auto-arrangement d'amphiphiles diacétyléniques qui seraient capables de co-délivrer un siARN (*small-interfering* ARN) et un anticancéreux dans des cellules tumorales.

Dans ce but, le premier objectif de cette thèse consistait à synthétiser un panel de molécules amphiphiles comportant un corps hydrophobe identique mais des têtes hydrophiles variées, efficaces pour la délivrance de siARN (Figure 24, objectif 1 et 2). Après une courte introduction sur le principe et l'utilisation des siARN en thérapie, les résultats concernant ces premiers travaux seront décrits dans le chapitre II.

Après la conception d'un vecteur efficace pour la délivrance de siARN, celui-ci a été optimisé pour la délivrance d'anticancéreux dans l'optique de pouvoir co-délivrer par la suite ces deux agents thérapeutiques, possédant des propriétés physico-chimiques très différents (Figure 24, objectif 3). L'évaluation de ce système a pu être réalisée *in vitro* et *in vivo*. De même, après une courte introduction sur les enjeux de la thérapie combinatoire, les résultats concernant la réalisation de ce deuxième objectif seront présentés dans le chapitre III.

Enfin, le sujet a pu évoluer vers l'étude d'un système de ciblage cellulaire original et versatile basé sur la fonctionnalisation des micelles-PDA avec des anticorps d'intérêt thérapeutique (Figure 24, objectif 4). Ces résultats seront détaillés dans le chapitre IV.

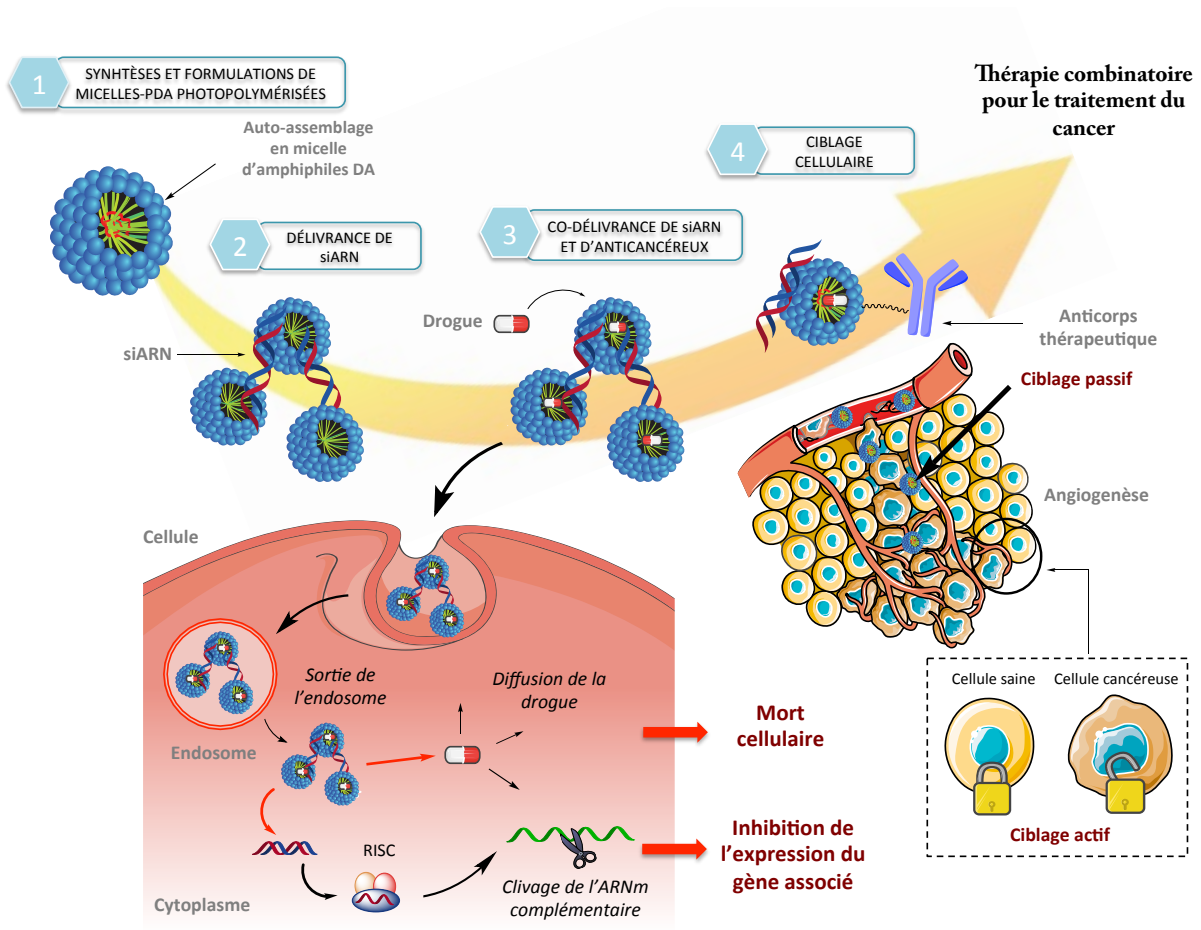


Figure 24 : Présentation des différents objectifs de la thèse : (1) Synthèses et formulations de micelles-PDA, (2) Les micelles comme vecteurs de siARN, (3) Les micelles pour la thérapie combinatoire, (4) Fonctionnalisation des micelles pour un ciblage actif.

Références

- (1) Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. Drug Delivery and Imaging with Polydiacetylene Micelles. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (2), 400–408.
- (2) Neuberg, P.; Perino, A.; Morin-Picardat, E.; Anton, N.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S.; Remy, J.-S.; Wagner, A. Photopolymerized Micelles of Diacetylene Amphiphile: Physical Characterization and Cell Delivery Properties. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (58), 11595–11598.
- (3) Morin, E.; Nothisen, M.; Wagner, A.; Remy, J.-S. Cationic Polydiacetylene Micelles for Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1916–1923.
- (4) Yao, D.; Li, S.; Zhu, X.; Wu, J.; Tian, H. Tumor-Cell Targeting Polydiacetylene Micelles Encapsulated with an Antitumor Drug for the Treatment of Ovarian Cancer. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2017**, *53* (7), 1233–1236.
- (5) Winau, F.; Westphal, O.; Winau, R. Paul Ehrlich--in Search of the Magic Bullet. *Microbes Infect.* **2004**, *6* (8), 786–789.
- (6) Andrieux, K.; DESMAËLE, D.; D'angelo, J.; Couvreur, P. Nanotechnologies et nouveaux médicaments. *Actual. Chim.* **2003**, No. 11–12, 135–139.
- (7) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 238–252.
- (8) Birrenbach, G.; Speiser, P. P. Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (12), 1763–1766.
- (9) Couvreur, P.; Tulkenst, P.; Roland, M.; Trouet, A.; Speiser, P. Nanocapsules: A New Type of Lysosomotropic Carrier. *FEBS Lett.* **1977**, *84* (2), 323–326.
- (10) Owens, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307* (1), 93–102.
- (11) Karmali, P. P.; Simberg, D. Interactions of Nanoparticles with Plasma Proteins: Implication on Clearance and Toxicity of Drug Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8* (3), 343–357.
- (12) Chermont, Q. le M. de; Chanéac, C.; Seguin, J.; Pellé, F.; Maîtrejean, S.; Jolivet, J.-P.; Gourier, D.; Bessodes, M.; Scherman, D. Nanoprobes with Near-Infrared Persistent Luminescence for in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (22), 9266.
- (13) Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.; Gregoriadis, G. Influence of Surface Hydrophilicity of Liposomes on Their Interaction with Plasma Protein and Clearance from the Circulation: Studies with Poly(Ethylene Glycol)-Coated Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1062* (1), 77–82.
- (14) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **2000**, *407* (6801), 249–257.
- (15) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (5), 1310–1316.
- (16) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Part 1), 6387–6392.
- (17) Sinha, R.; Kim, G. J.; Nie, S.; Shin, D. M. Nanotechnology in Cancer Therapeutics: Bioconjugated Nanoparticles for Drug Delivery. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5* (8), 1909–1917.

- (18) Bar-Zeev, M.; Livney, Y. D.; Assaraf, Y. G. Targeted Nanomedicine for Cancer Therapeutics: Towards Precision Medicine Overcoming Drug Resistance. *Drug Resist. Updat.* **2017**, *31* (Supplement C), 15–30.
- (19) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (3), 136–151.
- (20) Prabhakar, U.; Maeda, H.; Jain, R. K.; Sevick-Muraca, E. M.; Zamboni, W.; Farokhzad, O. C.; Barry, S. T.; Gabizon, A.; Grodzinski, P.; Blakey, D. C. Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology. *Cancer Res.* **2013**, *73* (8), 2412–2417.
- (21) Miranda, A.; Blanco-Prieto, M.; Sousa, J.; Pais, A.; Vitorino, C. Breaching Barriers in Glioblastoma. Part II: Targeted Drug Delivery and Lipid Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2017**.
- (22) Steichen, S. D.; Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. A Review of Current Nanoparticle and Targeting Moieties for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 416–427.
- (23) Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 52–79.
- (24) Wickens, J. M.; Alsaab, H. O.; Kesharwani, P.; Bhise, K.; Amin, M. C. I. M.; Tekade, R. K.; Gupta, U.; Iyer, A. K. Recent Advances in Hyaluronic Acid-Decorated Nanocarriers for Targeted Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (4), 665–680.
- (25) Choi, K. Y.; Saravanakumar, G.; Park, J. H.; Park, K. Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Intracellular Targeting: Interfacial Interactions with Proteins in Cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *99*, 82–94.
- (26) Taheri, A.; Dinarvand, R.; Nouri, F. S.; Khorramizadeh, M. R.; Borougeni, A. T.; Mansoori, P.; Atyabi, F. Use of Biotin Targeted Methotrexate-Human Serum Albumin Conjugated Nanoparticles to Enhance Methotrexate Antitumor Efficacy. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1863–1874.
- (27) Na, K.; Bum Lee, T.; Park, K.-H.; Shin, E.-K.; Lee, Y.-B.; Choi, H.-K. Self-Assembled Nanoparticles of Hydrophobically-Modified Polysaccharide Bearing Vitamin H as a Targeted Anti-Cancer Drug Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18* (2), 165–173.
- (28) Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41* (2), 147–162.
- (29) Parveen, S.; Sahoo, S. K. Evaluation of Cytotoxicity and Mechanism of Apoptosis of Doxorubicin Using Folate-Decorated Chitosan Nanoparticles for Targeted Delivery to Retinoblastoma. *Cancer Nanotechnol.* **2010**, *1* (1–6), 47–62.
- (30) Nogueira-Librelotto, D. R.; Codevilla, C. F.; Farooqi, A.; Rolim, C. M. B. Transferrin-Conjugated Nanocarriers as Active-Targeted Drug Delivery Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (3), 454–466.
- (31) Ponka, P.; Lok, C. N. The Transferrin Receptor: Role in Health and Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31* (10), 1111–1137.
- (32) Garanger, E.; Boturyn, D.; Dumy, P. Tumor Targeting with RGD Peptide Ligands- Design of New Molecular Conjugates for Imaging and Therapy of Cancers. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7* (5), 552–558.
- (33) Mohammed-Saeid, W.; Chitanda, J.; Al-Dulaymi, M.; Verrall, R.; Badea, I. Design and Evaluation of RGD-Modified Gemini Surfactant-Based Lipoplexes for Targeted Gene Therapy in Melanoma Model. *Pharm. Res.* **2017**, *34* (9), 1886–1896.

- (34) Lee, S. K.; Park, M. W.; Yang, E. G.; Yu, J.; Jeong, S. An RNA Aptamer That Binds to the Beta-Catenin Interaction Domain of TCF-1 Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327* (1), 294–299.
- (35) An, Y.; Wu, J.; Yang, B.; Zhu, Z.; Gao, M.; Yu, C.; Yang, C. J. Selection and Application of DNA Aptamer Against Oncogene Amplified in Breast Cancer 1. *J. Mol. Evol.* **2015**, *81* (5–6), 179–185.
- (36) Farokhzad, O. C.; Jon, S.; Khademhosseini, A.; Tran, T.-N. T.; Lavan, D. A.; Langer, R. Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64* (21), 7668–7672.
- (37) Poolsup, S.; Kim, C.-Y. Therapeutic Applications of Synthetic Nucleic Acid Aptamers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *48*, 180–186.
- (38) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (3), 181–202.
- (39) Nahta, R.; Esteva, F. J. Herceptin: Mechanisms of Action and Resistance. *Cancer Lett.* **2006**, *232* (2), 123–138.
- (40) Parakh, S.; Gan, H. K.; Parslow, A. C.; Burvenich, I. J. G.; Burgess, A. W.; Scott, A. M. Evolution of Anti-HER2 Therapies for Cancer Treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *59*, 1–21.
- (41) Singla, H.; Ludhiadch, A.; Kaur, R. P.; Chander, H.; Kumar, V.; Munshi, A. Recent Advances in HER2 Positive Breast Cancer Epigenetics: Susceptibility and Therapeutic Strategies. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**.
- (42) Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Salvatore; Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches.
- (43) Rosen, M. J.; Kunjappu, J. T. Micelle Formation by Surfactants. In *Surfactants and Interfacial Phenomena*; John Wiley & Sons, Inc., 2012; pp 123–201.
- (44) Cui, X.; Mao, S.; Liu, M.; Yuan, H.; Du, Y. Mechanism of Surfactant Micelle Formation. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2008**, *24* (19), 10771–10775.
- (45) Krimm, S. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 Pp. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **1980**, *18* (10), 687–687.
- (46) Griffin, W. C., Classification of surface-active agent by ‘HLB’. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, *1*, 311
- (47) Griffin, W. C. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1954**, 249–256
- (48) Israelachvili, J. Intermolecular and Surface Forces; Academic Press: London, 1991.
- (49) Vincent, B. McBain and the Centenary of the Micelle. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *203*, 51–54.
- (50) O’Reilly, R. K.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. Cross-Linked Block Copolymer Micelles: Functional Nanostructures of Great Potential and Versatility. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (11), 1068–1083.
- (51) Adams, M. L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G. S. Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (7), 1343–1355.
- (52) Torchilin, V. P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (1), 1–16.
- (53) Sutton, D.; Nasongkla, N.; Blanco, E.; Gao, J. Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (6), 1029–1046.
- (54) Bronstein, L. M.; Chernyshov, D. M.; Timofeeva, G. I.; Dubrovina, L. V.; Valetsky, P. M.; Obolonkova, E. S.; Khokhlov, A. R. Interaction of Polystyrene-Block-Poly(Ethylene Oxide) Micelles with Cationic Surfactant in Aqueous Solutions. Metal Colloid Formation in Hybrid Systems. *Langmuir* **2000**, *16* (8), 3626–3632.

- (55) Geng, Y.; Discher, D. E. Hydrolytic Degradation of Poly(Ethylene Oxide)-Block-Polycaprolactone Worm Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (37), 12780–12781.
- (56) Michels, B.; Waton, G.; Zana, R. Dynamics of Micelles of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Block Copolymers in Aqueous Solutions. *Langmuir* **1997**, *13* (12), 3111–3118.
- (57) Xu, B.; Yuan, J.; Ding, T.; Gao, Q. Amphiphilic Biodegradable Poly(ϵ -Caprolactone)-Poly(Ethylene Glycol)-Poly(ϵ -Caprolactone) Triblock Copolymers: Synthesis, Characterization and Their Use as Drug Carriers for Folic Acid. *Polym. Bull.* **2010**, *64* (6), 537–551.
- (58) Prochaska, K.; Wypych, J. Basic Principles of Thermal Degradation and Thermal Stabilization of Poly(Vinyl Chloride). Synergism of Stabilizer Action. *J. Appl. Polym. Sci.* **1979**, *23* (7), 2031–2042.
- (59) Talelli, M.; Barz, M.; Rijcken, C. J.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Lammers, T. Core-Crosslinked Polymeric Micelles: Principles, Preparation, Biomedical Applications and Clinical Translation. *Nano Today* **2015**, *10* (1), 93–117.
- (60) Guo, A.; Liu, G.; Tao, J. Star Polymers and Nanospheres from Cross-Linkable Diblock Copolymers. *Macromolecules* **1996**, *29* (7), 2487–2493.
- (61) Iijima, M.; Nagasaki, Y.; Okada, T.; Kato, M.; Kataoka, K. Core-Polymerized Reactive Micelles from Heterotelechelic Amphiphilic Block Copolymers. *Macromolecules* **1999**, *32* (4), 1140–1146.
- (62) Siegwart, D. J.; Whitehead, K. A.; Nuhn, L.; Sahay, G.; Cheng, H.; Jiang, S.; Ma, M.; Lytton-Jean, A.; Vegas, A.; Fenton, P.; Levins, C. G.; Love, K. T.; Lee, H.; Cortez, C.; Collins, S. P.; Li, Y. F.; Jang, J.; Querbes, W.; Zurenko, C.; Novobrantseva, T.; Langer, R.; Anderson, D. G. Combinatorial Synthesis of Chemically Diverse Core-Shell Nanoparticles for Intracellular Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (32), 12996–13001.
- (63) Kakizawa, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. Environment-Sensitive Stabilization of Core-Shell Structured Polyion Complex Micelle by Reversible Cross-Linking of the Core through Disulfide Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (48), 11247–11248.
- (64) Wooley, K. L. Shell Crosslinked Polymer Assemblies: Nanoscale Constructs Inspired from Biological Systems. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2000**, *38* (9), 1397–1407.
- (65) Thurmond, K. B.; Kowalewski, T.; Wooley, K. L. Water-Soluble Knedel-like Structures: The Preparation of Shell-Cross-Linked Small Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (30), 7239–7240.
- (66) Read, E. S.; Armes, S. P. Recent Advances in Shell Cross-Linked Micelles. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2007**, No. 29, 3021–3035.
- (67) Bütün, V.; Wang, X.-S.; de Paz Báñez, M. V.; Robinson, K. L.; Billingham, N. C.; Armes, S. P.; Tuzar, Z. Synthesis of Shell Cross-Linked Micelles at High Solids in Aqueous Media. *Macromolecules* **2000**, *33* (1), 1–3.
- (68) Liu, X.; Jin, X.; Ma, P. X. Nanofibrous Hollow Microspheres Self-Assembled from Star-Shaped Polymers as Injectable Cell Carriers for Knee Repair. *Nat. Mater.* **2011**, *10* (5), 398–406.
- (69) Panja, S.; Nayak, S.; Ghosh, S. K.; Selvakumar, M.; Chattopadhyay, S. Self-Assembly of a Biodegradable Branched PE-PCL-b-PEC Amphiphilic Polymer: Synthesis, Characterization and Targeted Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. *RSC Adv.* **2014**, *4* (93), 51766–51775.
- (70) Li, L.-Y.; He, W.-D.; Li, J.; Zhang, B.-Y.; Pan, T.-T.; Sun, X.-L.; Ding, Z.-L. Shell-Cross-Linked Micelles from PNIPAM-b-(PLL)₂ Y-Shaped Miktoarm Star Copolymer as Drug Carriers. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (7), 1882–1890.

- (71) Yue, J.; Wang, R.; Liu, S.; Wu, S.; Xie, Z.; Huang, Y.; Jing, X. Reduction-Responsive Shell-Crosslinked Micelles Prepared from Y-Shaped Amphiphilic Block Copolymers as a Drug Carrier. *Soft Matter* **2012**, *8* (28), 7426–7435.
- (72) Kim, H. K.; Park, T. G. Surface Stabilization of Diblock PEG-PLGA Micelles by Polymerization of N-Vinyl-2-pyrrolidone. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23* (1), 26–31.
- (73) Yang, T.-F.; Chen, C.-N.; Chen, M.-C.; Lai, C.-H.; Liang, H.-F.; Sung, H.-W. Shell-Crosslinked Pluronic L121 Micelles as a Drug Delivery Vehicle. *Biomaterials* **2007**, *28* (4), 725–734.
- (74) Sawant, R. R.; Torchilin, V. P. Multifunctionality of Lipid-Core Micelles for Drug Delivery and Tumour Targeting. *Mol. Membr. Biol.* **2010**, *27* (7), 232–246.
- (75) Wegner, G. Topochemical Reactions of Monomers with Conjugated Triple-bonds. IV. Polymerization of Bis-(P-toluene Sulfonate) of 2,4-hexadiin-1,6-diol. *Makromol. Chem.* **1971**, 145.
- (76) Wegner, G. Topochemical Reactions of Monomers with Conjugated Triple Bonds. III. Solid-State Reactivity of Derivatives of Diphenyldiacetylene. *J. Polym. Sci. [B]* **1971**, *9* (2), 133–144.
- (77) Wegner, G. Topochemische Reaktionen von Monomeren Mit Konjugierten Dreifachbindungen / Topochemical Reactions of Monomers with Conjugated Triple Bonds. *Z. Für Naturforschung B* **2014**, *24* (7), 824–832.
- (78) Md, M.; M, C.; H, M.; Ce, E. Nanometer-Scale Design and Fabrication of Polymer Interfaces Using Polydiacetylene Monolayers. *J. Vac. Sci. Technol. A* **1999**, *17* (4), 2136–2141.
- (79) Diegelmann, S. R.; Tovar, J. D. Polydiacetylene-Peptide 1D Nanomaterials. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34* (17), 1343–1350.
- (80) Sixl, H.; Kollmar, C.; Huber, R.; Sigmund, E. Theory of the Radical-Electron Configurations and Optical Excitations in Short-Chain Polydiacetylene Oligomers. *Phys. Rev. B* **1987**, *36* (5), 2747–2756.
- (81) Michinobu, T.; Osako, H.; Shigehara, K. Alkyne-Linked Poly(1,8-Carbazole)s: A Novel Class of Conjugated Carbazole Polymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29* (2), 111–116.
- (82) Yoon, B.; Lee, S.; Kim, J.-M. Recent Conceptual and Technological Advances in Polydiacetylene-Based Supramolecular Chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (7), 1958–1968.
- (83) Jelinek, R.; Ritenberg, M. Polydiacetylenes – Recent Molecular Advances and Applications. *RSC Adv.* **2013**, *3* (44), 21192–21201.
- (84) Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J. Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27* (1), 113–158.
- (85) Charych, D. H.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Bednarski, M. D. Direct Colorimetric Detection of a Receptor-Ligand Interaction by a Polymerized Bilayer Assembly. *Science* **1993**, *261* (5121), 585–588.
- (86) Carpick, R. W.; Sasaki, D. Y.; Marcus, M. S.; Eriksson, M. A.; Burns, A. R. Polydiacetylene Films: A Review of Recent Investigations into Chromogenic Transitions and Nanomechanical Properties. *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16* (23), R679.
- (87) Spevak, W.; Nagy, J. O.; Charych, D. H. Molecular Assemblies of Functionalized Polydiacetylenes. *Adv. Mater.* **1995**, *7* (1), 85–89.

- (88) Chance, R. R.; Patel, G. N.; Witt, J. D. Thermal Effects on the Optical Properties of Single Crystals and Solution-cast Films of Urethane Substituted Polydiacetylenes. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (1), 206–211.
- (89) Filhol, J.-S.; Deschamps, J.; Dutremez, S. G.; Boury, B.; Barisien, T.; Legrand, L.; Schott, M. Polymorphs and Colors of Polydiacetylenes: A First Principles Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (20), 6976–6988.
- (90) Ogier, J.; Arnauld, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J.-M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E. Enhanced Drug Loading in Polymerized Micellar Cargo. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (17), 3902–3907.
- (91) Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. Tumor-Targeted Polydiacetylene Micelles for In Vivo Imaging and Drug Delivery. *Small* **2011**, *7* (19), 2786–2792.
- (92) Theodorou, I.; Anilkumar, P.; Lelandais, B.; Clarisse, D.; Doerflinger, A.; Gravel, E.; Ducongé, F.; Doris, E. Stable and Compact Zwitterionic Polydiacetylene Micelles with Tumor-Targeting Properties. *Chem. Commun.* **2015**.
- (93) Clarisse, D.; Prakash, P.; Geertsen, V.; Miserque, F.; Gravel, E.; Doris, E. Aqueous 1,3-Dipolar Cycloadditions Promoted by Copper Nanoparticles in Polydiacetylene Micelles. *Green Chem.* **2017**, *19*, 3112–3115.
- (94) Choi, H.; Bae, Y. M.; Yu, G. S.; Huh, K. M.; Choi, J. S. Synthesis of Poly(Ethylene Glycol)-Polydiacetylene Conjugates and Their Micellar and Chromic Characteristics. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8* (10), 5104–5108.
- (95) Kim, Y.-H.; Subramanyam, E.; Im, J. H.; Huh, K. M.; Choi, H.; Choi, J. S.; Lee, Y.-K.; Park, S.-W. A New PEG-Lipid Conjugate Micelle for Encapsulation of CdSe/ZnS Quantum Dots. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10* (5), 3275–3279.
- (96) Yang, D.; Zou, R.; Zhu, Y.; Liu, B.; Yao, D.; Jiang, J.; Wu, J.; Tian, H. Magainin II Modified Polydiacetylene Micelles for Cancer Therapy. *Nanoscale* **2014**, *6* (24), 14772–14783.
- (97) Hoang, H. T.; Lee, T.; Kim, B.-S.; Han, K.-C.; Ahn, D.-R. An Immunoassay Utilizing the DNA-Coated Polydiacetylene Micelles as a Signal Generator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (9), 2675–2678.
- (98) Perino, A.; Klymchenko, A.; Morere, A.; Contal, E.; Rameau, A.; Guenet, J.-M.; Mély, Y.; Wagner, A. Structure and Behavior of Polydiacetylene-Based Micelles. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 111.
- (99) Contal, E.; Klymchenko, A. S.; Mély, Y.; Meunier, S.; Wagner, A. Core Functionalization of Polydiacetylene Micelles by a “Click” Reaction. *Soft Matter* **2011**, *7* (5), 1648–1650.
- (100) Varela-Moreira, A.; Shi, Y.; M. Fens, M. H. A.; Lammers, T.; E. Hennink, W.; M. Schiffelers, R. Clinical Application of Polymeric Micelles for the Treatment of Cancer. *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1* (8), 1485–1501.
- (101) Batrakova, E. V.; Li, S.; Elmquist, W. F.; Miller, D. W.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V. Mechanism of Sensitization of MDR Cancer Cells by Pluronic Block Copolymers: Selective Energy Depletion. *Br. J. Cancer* **2001**, *85* (12), 1987–1997.
- (102) Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y. Pluronic Block Copolymers as Novel Polymer Therapeutics for Drug and Gene Delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2002**, *82* (2–3), 189–212.
- (103) Ahn, H. K.; Jung, M.; Sym, S. J.; Shin, D. B.; Kang, S. M.; Kyung, S. Y.; Park, J.-W.; Jeong, S. H.; Cho, E. K. A Phase II Trial of Cremophor EL-Free Paclitaxel (Genexol-PM) and Gemcitabine in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74* (2), 277–282.

- (104) Shiraishi, K.; Kawano, K.; Minowa, T.; Maitani, Y.; Yokoyama, M. Preparation and in Vivo Imaging of PEG-Poly(L-Lysine)-Based Polymeric Micelle MRI Contrast Agents. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2009**, *136* (1), 14–20.
- (105) Trubetskoy, V. S.; Frank-Kamenetsky, M. D.; Whiteman, K. R.; Wolf, G. L.; Torchilin, V. P. Stable Polymeric Micelles: Lymphangiographic Contrast Media for Gamma Scintigraphy and Magnetic Resonance Imaging. *Acad. Radiol.* **1996**, *3* (3), 232–238.
- (106) Kong, W. H.; Lee, W. J.; Cui, Z. Y.; Bae, K. H.; Park, T. G.; Kim, J. H.; Park, K.; Seo, S. W. Nanoparticulate Carrier Containing Water-Insoluble Iodinated Oil as a Multifunctional Contrast Agent for Computed Tomography Imaging. *Biomaterials* **2007**, *28* (36), 5555–5561.
- (107) Cabral, H.; Kataoka, K. Progress of Drug-Loaded Polymeric Micelles into Clinical Studies. *J. Controlled Release* **2014**, *190* (Supplement C), 465–476.
- (108) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (21), 7413–7417.
- (109) Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C.; Wagner, E. Activation of the Complement System by Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier for Intravenous Gene Delivery. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7* (12), 1437–1446.
- (110) Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. Efficient Gene Transfer into Mammalian Primary Endocrine Cells with Lipopolyamine-Coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86* (18), 6982–6986.
- (111) Cationic Lipid–DNA Complexes—lipoplexes—for Gene Transfer and Therapy. *Bioelectrochemistry* **2002**, *58* (1), 53–64.
- (112) Velluto, D.; Thomas, S. N.; Simeoni, E.; Swartz, M. A.; Hubbell, J. A. PEG-b-PPS-b-PEI Micelles and PEG-b-PPS/PEG-b-PPS-b-PEI Mixed Micelles as Non-Viral Vectors for Plasmid DNA: Tumor Immunotoxicity in B16F10 Melanoma. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9839–9847.

Chapitre II

-

*Synthèses et caractérisations des micelles
polydiacétyléniques : application à la délivrance
d'ARN interférents*

I. Délivrance de siARN

I.1 L'ARN interférence comme outil thérapeutique

Au cours des dernières années, la thérapie génique, consistant à prévenir ou à soigner une maladie par introduction de matériel génétique dans les cellules, a connu un intérêt grandissant. En effet, l'utilisation d'acides nucléiques tels que l'ADN ou l'ARN comme agents thérapeutiques a permis d'introduire des copies saines de gènes déficients ou encore d'inhiber certains gènes mutés responsables du développement d'une pathologie. Elle représente donc une méthode de choix pour étudier la fonction des gènes, valider des cibles thérapeutiques ou encore développer de nouvelles thérapies, notamment dans le domaine de l'oncologie.

Aujourd'hui, une nouvelle approche, plus efficace que les méthodes précédemment développées telles que les stratégies antigène¹ et antisens², vise à utiliser le mécanisme naturel d'inhibition post-transcriptionnelle : l'ARN interférence (ARNi).

L'ARN interférence est un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, mettant en jeu de petits ARN double brin (siARN, *small-interfering* ARN) possédant une séquence complémentaire de l'ARN messenger (ARNm) cible.

La première expérience faisant intervenir le mécanisme d'ARN interférence a été réalisée sur le ver nématode *Caenorhabditis elegans* par Fire *et al.* en 1998.³ Trois ans plus tard, l'équipe de Tuschl a publié une preuve de concept démontrant que des petits ARN double brin permettaient une régulation négative d'un gène spécifique dans des cellules de mammifères.⁴ Peu de temps après, on observait le premier succès *in vivo* de l'utilisation d'un siARN nu, capable d'éteindre le gène de la luciférase à hauteur de 98%.⁵ Suite à ces résultats et à l'émergence de cette stratégie, les chercheurs se sont penchés sur le mécanisme de l'interférence ainsi que sur la structure du principal acteur : le siARN.

I.2. Mécanisme de l'ARN interférence: cas des siARN

L'ARN interférence est un mécanisme biologique naturel dans lequel la formation de petit dsRNA (*double-stranded RNA*) provoque une inhibition séquence spécifique d'un gène, avec l'aide d'un complexe protéique nommé RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce mécanisme se déroule en deux étapes clefs.

Phase d'initiation

Tout d'abord, une étape d'initiation permet la rupture de longs dsARN en petits ARN interférents par l'intermédiaire de l'enzyme DICER. Les siARN ainsi formés conservent une structure en double brin. Ils présentent à leurs extrémités 3', deux nucléotides non appariés et sont phosphorylés en position 5'. Ils contiennent entre 21 et 23 nucléotides qui vont permettre de cibler de manière spécifique la séquence d'un ARN messager et ainsi empêcher la traduction de l'ARNm en protéine (Figure 25). Un des avantages des siARN comparé à l'utilisation de constructions plasmidiques est qu'ils agissent dans le cytoplasme et non dans le noyau, évitant ainsi la nécessité de passer la barrière nucléaire.⁶

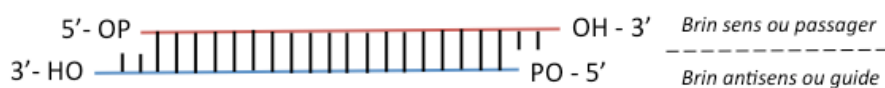


Figure 25 : Structure d'un petit ARN interférent (siARN).

Phase effectrice

Le complexe multiprotéique RISC va venir se lier au siARN. Le brin passager ou sens est séparé du brin antisens puis éjecté du complexe avant d'être dégradé par la protéine Argonaute 2 contenu dans le complexe RISC. Le brin guide va ensuite pouvoir s'apparier *via* des liaisons de type Watson-Crick avec la séquence complémentaire de l'ARNm dont il est spécifique, afin de provoquer son clivage. L'ARNm étant dégradé, la traduction en protéine ne peut plus avoir lieu entraînant ainsi l'inhibition de l'expression du gène (Figure 26).⁷

Le complexe RISC activé peut ensuite être recyclé afin de détruire de nouveaux ARNm comportant la même séquence spécifique. Contrairement à une stratégie antisens qui consiste à inhiber l'expression d'un gène en bloquant la traduction de l'ARNm *via* l'hybridation d'un brin d'ADN synthétiques sur l'ARNm qui sera ensuite coupé, l'utilisation du siARN se révèle être catalytique.

Afin de transformer ce mécanisme naturel en outil biologique, des siARN synthétiques ont été développés par voies chimique ou enzymatique.⁸ Une fois ces derniers synthétisés, ils peuvent être introduits directement à l'intérieur de la cellule et utiliser la machinerie interférence de la cellule.

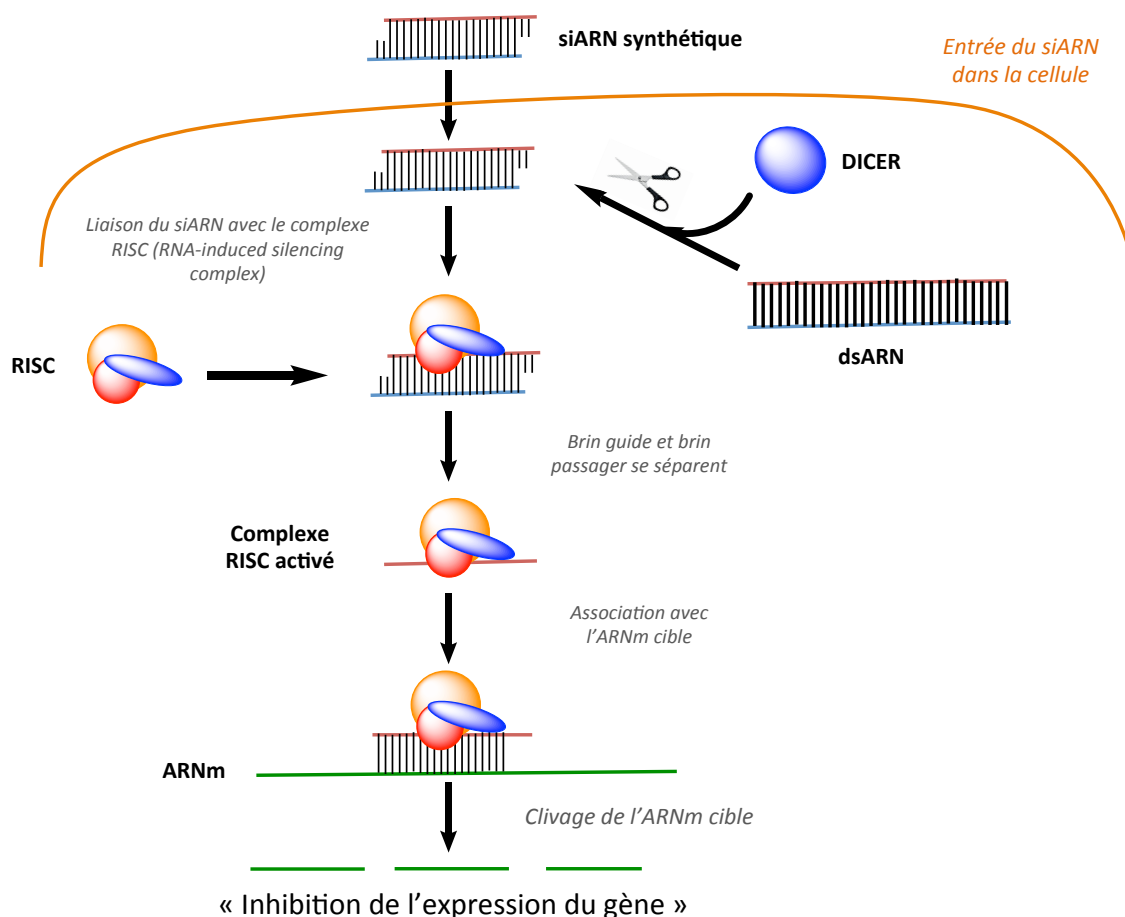


Figure 26 : Mécanisme d'action des siARN.

I.3. Obstacles à la délivrance de siARN

Malgré le fort potentiel thérapeutique des siARN synthétiques, leur délivrance pose encore de nombreuses difficultés. Tout d'abord, il existe des problèmes de stabilité. En effet, malgré le fait que les siARN soient plus stables que des simples brins d'ADN ou encore que l'ARNm, ils sont néanmoins rapidement dégradés par les nucléases présentes dans le milieu biologique.⁹ De plus, ils présentent également des problèmes de bio-distribution et un temps de circulation court dû à une clairance rénale rapide. Enfin, ils possèdent de nombreux groupements phosphates qui leur confèrent une charge nette anionique ne leur permettant pas d'interagir avec les membranes cellulaires, qui sont elles mêmes anioniques ce qui empêche ainsi une internalisation efficace.¹⁰

Afin de palier ces problèmes, il est possible de modifier chimiquement la structure des siARN afin de les rendre plus résistants sans altérer leurs efficacités ou/et bien d'avoir recours à des vecteurs qui les protègent des dégradations tout en masquant leurs charges négatives.

I.4. Méthodes de délivrance de siARN

Dans le but d'améliorer l'efficacité des siARN et de contourner les limites de délivrance dues à la nature du siARN, de nombreux chercheurs se sont intéressés au développement de techniques de vectorisation spécifiques à ces outils. Parmi elles, on retrouve entre autres, les modifications chimiques du siARN et l'utilisation de vecteurs viraux et synthétiques.

I.4.1 Modifications chimiques des siARN

Les modifications chimiques peuvent être introduites sur les molécules de siARN afin d'augmenter leurs résistances aux nucléases et/ou d'éviter une activation du système immunitaire tout en conservant leur reconnaissance par les enzymes responsables de leur activité. Il est ainsi possible de modifier la partie phosphate, le sucre, la base ou encore de réaliser des modifications terminales du siARN (Figure 27).¹¹

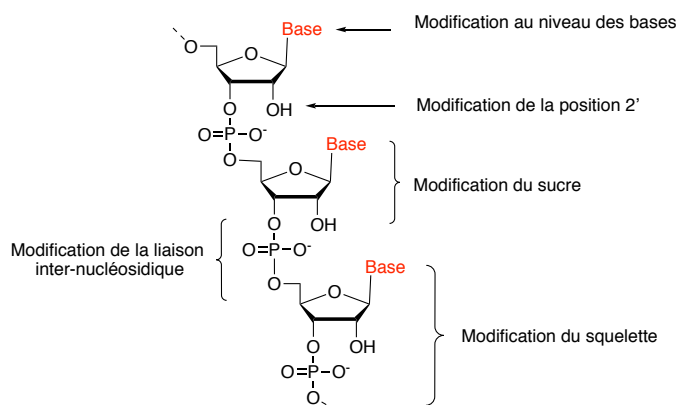


Figure 27 : Sites de modification des ARN

Parmi les plus fréquentes, on retrouve la modification au niveau du lien inter-nucléosidique phosphodiester en phosphorothioate ou boranophosphate.¹² Malgré un renforcement de la résistance aux nucléases, il a été montré que ces modifications peuvent également entraîner une baisse d'efficacité et/ou une augmentation de la toxicité.¹³

En raison de la présence de la fonction alcool en position 2' du sucre, les brins ARN sont beaucoup plus sensibles aux attaques des nucléases que les brins ADN. C'est pourquoi, une stratégie couramment utilisée consiste à modifier la position 2' du ribose notamment en introduisant un 2'-O-méthyl^{14,15} ou 2'-Fluoro.¹² Contrairement à la première méthode, les modifications en 2' peuvent être introduites sur la totalité du siARN, même s'il est préférable de les alterner. Ces modifications ont permis d'augmenter la résistance aux nucléases sans

perdre l'activité biologique du siARN et confèrent une protection vis-à-vis du système immunitaire.¹⁶

D'autre part, différents groupes chimiques ont été greffés de manière covalente au siARN synthétique dans le but d'améliorer leur délivrance, leur biodistribution et leur internalisation. Parmi les ligands utilisés, on retrouve des composés lipophiles tels que le cholestérol ou le tocophérol. Par exemple, le siARN-cholestérol a été synthétisé avec succès par couplage du cholestérol en position 3', par l'intermédiaire d'un espaceur de type pyrrolidine. Ce conjugué chol-siARN a permis *in vivo* une inhibition à 50 % de l'expression de la protéine apoB alors que le siARN non modifié n'a pas eu d'effet.¹⁷

Des peptides (CPP, *cell-penetrating peptide*) pénétrants et des polyamines ont également été utilisés. À titre d'exemple, dans notre laboratoire Mitsuhashi a développé une synthèse permettant d'introduire à n'importe quelle position d'un oligonucléotide des résidus spermines. Ainsi, ils ont réussi à développer un conjugué spermine-siARN cationique capable d'entrer dans les cellules humaines et permettant de réaliser une inhibition d'un gène à des concentrations submicromolaires.¹⁸

I.4.2 Les méthodes virales

Depuis des années, le transfert de gène se fait par le biais de virus génétiquement modifiés. Récemment, cette méthode a été appliquée au transfert d'ARNi. Le principe consiste à conserver la partie non-pathogène de la particule virale responsable du cycle d'infection tout en éliminant la partie infectieuse de son patrimoine génétique. Ainsi, le génome est remplacé par des séquences exprimant les ARN interférents. Ces virus, dit sécurisés, font parties des familles des lentivirus, des adénovirus ou encore des virus-adéno-associés (AAV). Très efficaces, ces vecteurs viraux sont impliqués dans de nombreux essais cliniques en thérapie génique (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

Cependant ils sont coûteux et peuvent également induire des réponses immunitaires et s'intégrer de façon aléatoire dans le génome hôte provoquant ainsi de graves mutations.

I.4.3 Les méthodes synthétiques

Les vecteurs synthétiques constituent une alternative prometteuse à l'utilisation de vecteurs viraux. En effet, ils possèdent de nombreux avantages tels qu'une production à grande échelle simplifiée et moins coûteuse, une sécurité d'utilisation et une faible immunogénicité. Efficace pour le transfert de gène, ces vecteurs ont été, par la suite, testés pour le transfert de siARN.

Les principaux vecteurs utilisés sont des dérivés (poly)cationiques, généralement de nature lipidique ou polymérique.¹⁹⁻²¹ Les systèmes de délivrance lipidique sont les candidats les plus étudiés pour la délivrance de siARN. Parmi eux, on retrouve les liposomes, les micelles, ou encore les émulsions. Le liposome, composé d'une cavité aqueuse entourée d'une bicouche lipidique, est l'un des vecteurs les plus prometteurs (Figure 28).²²

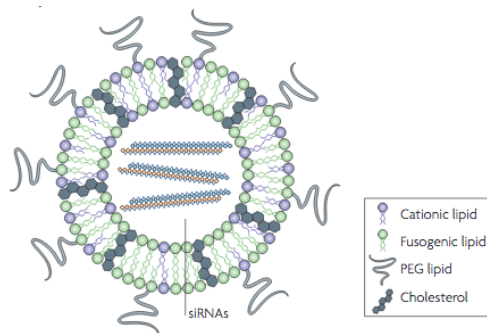


Figure 28 : Structure liposomale pour la délivrance de siARN (d'après De Fourgerolles, 2007).²²

Les nanoparticules polymériques représentent une autre catégorie de vecteurs synthétiques. Les plus couramment utilisés sont le chitosan^{23,24}, les dérivés de cyclodextrine²⁵⁻²⁷ et les polymères synthétiques obtenus à partir du polyéthylèneimine^{28,29} (PEI) (Figure 29).

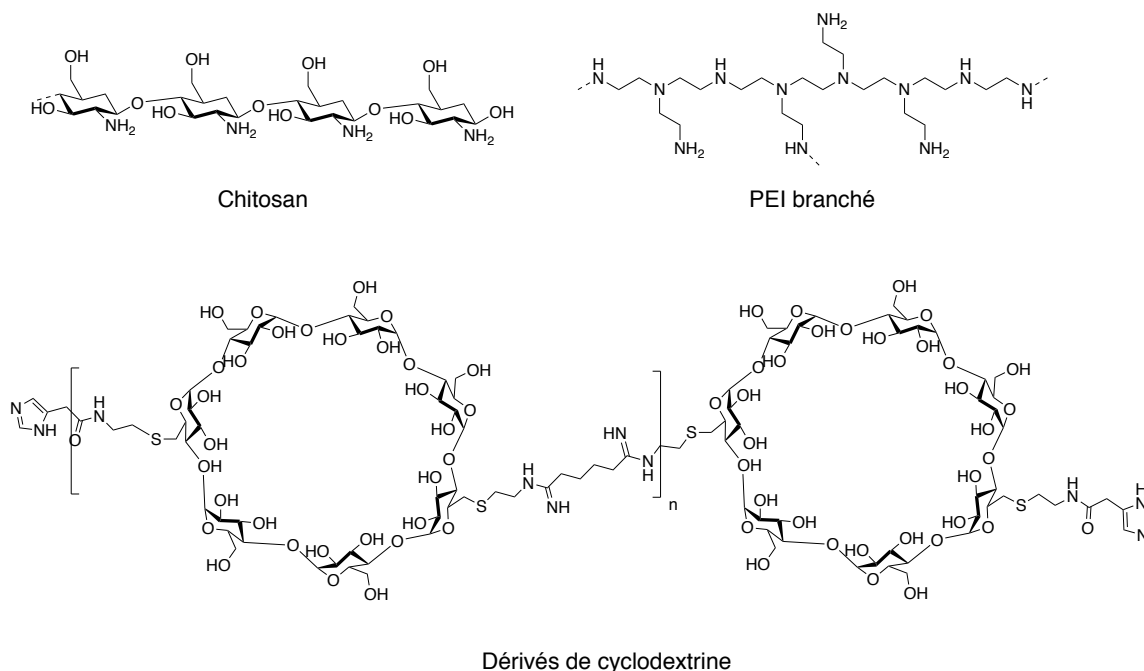


Figure 29 : Exemple de structure de polymères utilisés pour la délivrance de siARN.

Grâce à leurs charges positives, ces vecteurs sont capables d'interagir avec le siARN afin de créer des complexes, généralement nommés lipoplexes ou polyplexes.³⁰ Ainsi, on peut définir un ratio N/P représentant la charge globale du complexe (avec N : le nombre d'amines chargées positivement et P : le nombre de phosphates présents dans le siARN). En fonction de

la quantité de vecteur utilisé, on pourra donc obtenir des complexes cationiques, neutres ou anioniques.

Grâce à ces vecteurs, le siARN est protégé des dégradations enzymatiques et le complexe peut interagir avec la membrane anionique des cellules afin d'être internalisé *via* endocytose.

Aujourd'hui, l'enjeu des vecteurs synthétiques est donc de trouver les propriétés structurales idéales, afin d'augmenter la résistance au milieu extracellulaire, cibler les cellules impliquées dans les pathologies et libérer de manière plus efficace le siARN dans le cytoplasme.

Afin de répondre à cette problématique, notre premier objectif consistait à réaliser une nouvelle génération de vecteur synthétique, formulée sous forme d'une micelle cationique, à partir d'amphiphiles diacétyléniques photopolymérisables. Nous avons ensuite caractérisé ces vecteurs et étudié leur efficacité pour la délivrance de siARN.

II. Synthèses de nouveaux amphiphiles cationiques diacétyléniques

L'équipe d'Eric Doris a montré que les micelles neutres polydiacétyléniques (PDA) formées à partir d'amphiphile DA possédant une tête polaire nitrilotriacétique (NTA) ou polyéthylène glycol (PEG) possédaient de très bonnes propriétés pour la délivrance d'anticancéreux (Figure 30B).^{31,32} En parallèle, les travaux antérieurs du laboratoire ont permis la synthèse de nouvelles molécules amphiphiles cationiques porteuses d'une tête polaire de type amine, capables de s'auto-arranger en structures micellaires. Ces particules se sont révélées être des vecteurs efficaces pour le transfert de gène (Figure 30A).³³ Cependant ces vecteurs n'ont pas permis une délivrance efficace de siARN, c'est pourquoi nous avons décidé de développer une nouvelle génération de micelle PDA adaptée à cette application afin de pouvoir réaliser par la suite une co-délivrance d'un siARN et d'un anticancéreux.

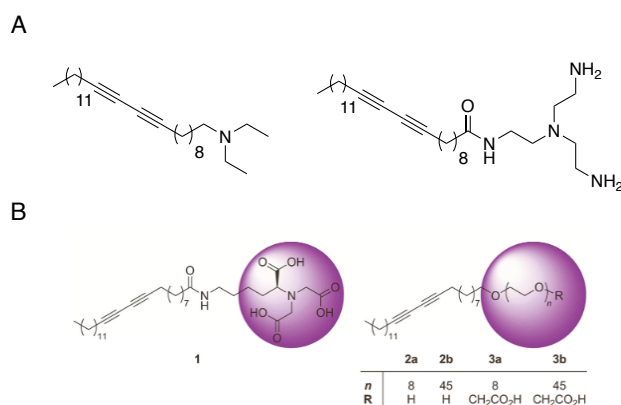


Figure 30 : A. Structures des composés actifs pour le transfert de gène. B. Structures des composés actifs pour la délivrance d'anticancéreux.

Dans le cadre de ce projet, tous les amphiphiles synthétisés possèdent une structure générale similaire. Ils contiennent une chaîne carbonée hydrophobe avec une liaison di-yne insérée en milieu de chaîne. Celle-ci est attachée à un petit espaceur PEGylé sur lequel une tête hydrophile est greffée (Figure 31).

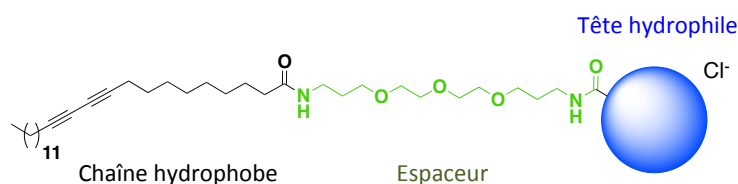


Figure 31 : Structure générale des amphiphiles synthétisés.

La totalité des amphiphiles synthétisés s'inscrit dans une même stratégie de synthèse. La première étape consiste à fonctionnaliser la partie hydrophobe de l'amphiphile en introduisant un espaceur PEGylé sur la chaîne carbonée. L'acide 10,12-pentacosadiynoïque commercial est activé sous forme d'ester activé NHS (N-hydroxysuccinide). Le composé **1** est ainsi obtenu avec un rendement quantitatif. L'ester activé **1** est ensuite mis à réagir avec 2 équivalents de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine commercial afin d'obtenir, après substitution nucléophile, le composé **2** (Figure 32). Le rendement de 70% s'explique par la formation du produit de bicouplage, sous-produit de la réaction, qui peut facilement être séparé par colonne chromatographique sur gel de silice.

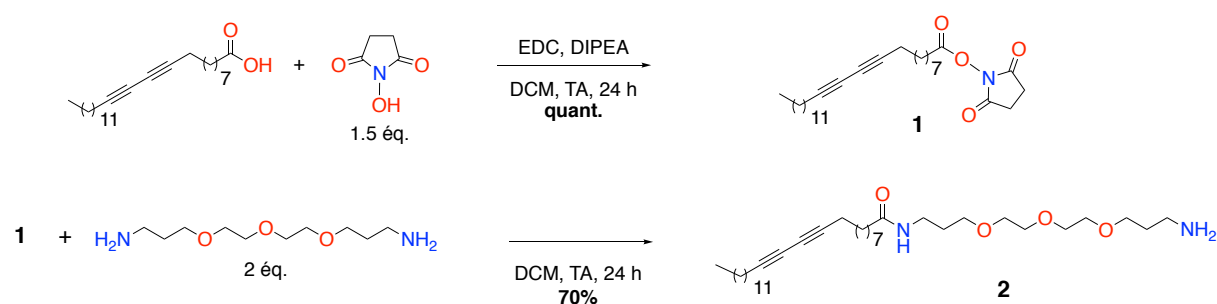


Figure 32 : Schéma réactionnel du composé **2**.

Une fois le précurseur synthétisé, une série d'acides aminés naturels et synthétiques ont été greffés par couplage peptidique (Figure 33). Les acides aminés non naturels (composés **10**, **11** et **12** (Figure 34)) ont été synthétisés par l'équipe du Dr. Frédéric Bihel⁽¹⁾.³⁴ Ces acides aminés naturels et synthétiques ont été choisis en fonction de leur valeur pKa mais également pour leur caractère aromatique ou non. En effet, des études ont montré que certains pKa permettaient d'augmenter la libération cytosolique des molécules délivrées en favorisant la rupture de l'endosome par l'effet « éponge à protons ». Ce principe ainsi que l'impact des pKa sur l'efficacité de transfection de siARN sera développé dans la partie IV de ce chapitre. Selon la nature du groupement utilisé pour protéger l'amine primaire de l'acide aminé, différents agents de couplage et solvants ont été utilisés. À l'exception des réactions faisant intervenir un acide-aminé déjà activé, le carbodiimide EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) a été utilisé car il est ainsi que l'urée associée (sous-produit de la réaction) soluble dans l'eau et ces 2 composés peuvent donc être facilement éliminés par extraction aqueuse. Pour les acides aminés non naturels, nous avons conservé les

⁽¹⁾Laboratoire d'innovation Thérapeutique – UMR7200, Illkirch-Grattenstaden

méthodes optimisées par notre équipe collaboratrice à savoir l'utilisation de l'activateur HATU (hexafluorophosphate de-N, N-diméthylméthaniminium) dans le DMF.

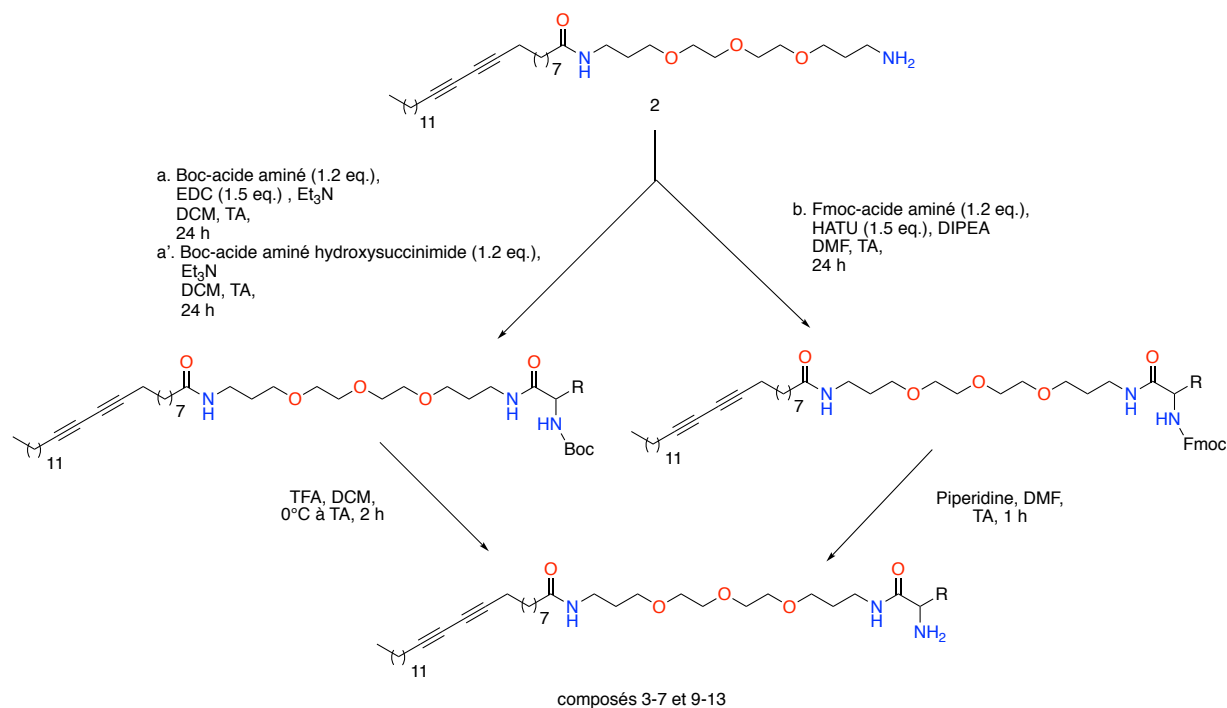


Figure 33 : Schéma réactionnel de la synthèse des amphiphiles.

Après une étape de déprotection des groupements Boc ou Fmoc, 9 composés **3-7** et **9-12** ont été obtenus. Les structures ainsi que les rendements sont répertoriés dans la Figure 34. Pour toutes les étapes de la synthèse, il est important de manipuler à l'abri de la lumière pour empêcher la polymérisation des composés qui sont photosensibles. En effet, le produit polymérisé reste sur colonne et cette polymérisation parasite peut expliquer en partie les rendements modérés obtenus.

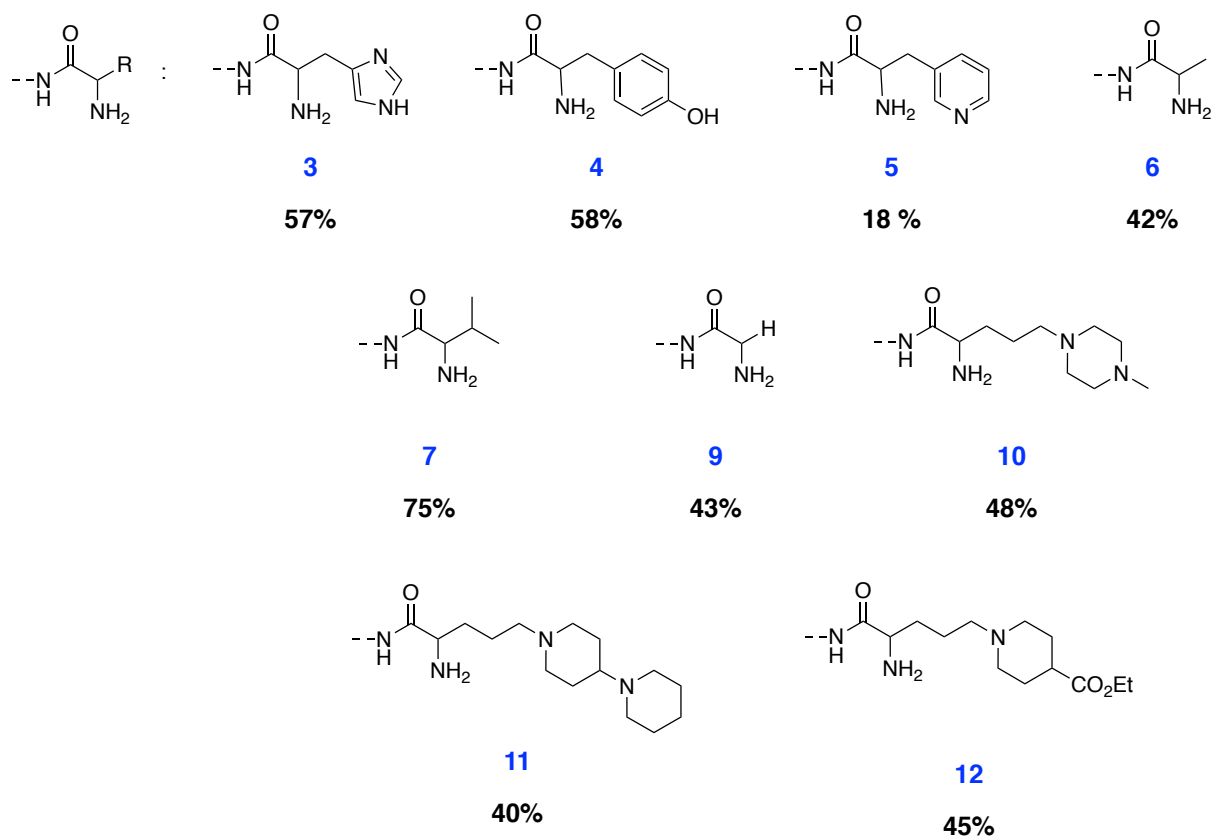


Figure 34 : Structures et rendements globaux des composés.

III. Formation des micelles cationiques polymérisées

III.1 Protocole de formulation

Le laboratoire a développé des méthodes robustes permettant d'obtenir, selon la nature du composé, des micelles ou des nano-fibres.

Formation des micelles

Pour formuler les micelles, l'amphiphile est tout d'abord mis sous sa forme chlorhydrate, en utilisant de l'acide chlorhydrique (HCl). Cette étape va permettre de protoner l'amine primaire présente sur la tête polaire. De l'éthanol est ensuite ajouté et le mélange est évaporé soigneusement jusqu'à la formation d'un film. Après séchage sous vide pour enlever les traces d'HCl restantes, le film est solubilisé dans l'eau afin d'obtenir une solution finale à 5 mg/mL.

Cependant, nous nous sommes rendu compte que certains tensio-actifs étaient capables de se réorganiser spontanément en gel après un long stockage à 4°C. Une observation similaire avait été faite avec des tensio-actifs propargylique-ammonium.³⁵

Partant de ces observations, le laboratoire a mis au point un autre protocole permettant d'obtenir des fibres.

Formation des fibres

Tout d'abord, l'amphiphile est dissout par sonication dans de l'éthanol préalablement chauffé à 60 °C. La solution est ensuite filtrée afin de retirer les résidus polymérisés qui se sont formés au cours du stockage du monomère diacétyléniques de départ. Cette solution est ensuite soigneusement injectée dans un mélange éthanol-eau dans le but d'obtenir une solution final à 30% en éthanol. La solution est placée à 4°C pendant 18 heures afin d'obtenir la formation des fibres. Contrairement, aux solutions micellaires, le gel formé est très fortement photosensible.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation des objets micellaires. Néanmoins, ces nano-fibres obtenues ont été étudiées parallèlement au laboratoire et vont faire l'objet d'une publication intitulée « polydiacetylenic Nanofibers as new siARN vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery » qui est en cours de soumission (cf. chapitre publications acceptées et en cours de soumission).

III.2 Polymérisation en cuve de quartz

Les micelles classiques ne sont pas de très bons vecteurs car les monomères possèdent une fonction de détergent qui leur procure une forte toxicité. Afin de s'affranchir de ces problèmes, nous avons décidé de polymériser nos micelles afin de réduire l'activité détergente.

Pour cela, nous avons eu recours à la méthode de polymérisation en cuve de quartz. Facile à mettre en place et reproductible, cette méthode est utilisée depuis de nombreuses années au sein du laboratoire. Celle-ci consiste à mettre les solutions aqueuses de micelles obtenues dans une cuve en quartz possédant un trajet optique de 1 cm. Une fois fermées de manière hermétique avec du parafilm, les cuves sont irradiées dans un four UV pour une durée déterminée. Cette étape va permettre de figer les micelles en liant de manière covalente les monomères entre eux. Dans notre cas, la polymérisation est possible grâce au motif diacétylène qui, sous irradiation UV à 254 nm, va réagir selon une réaction 1-4 entre les monomères pour former un réseau ène-yne (cf. chapitre I).

Temps de polymérisation

Le temps de polymérisation optimal (4 heures) a été déterminé pour le composé **3**, en faisant la corrélation avec les résultats obtenus en délivrance de siARN. Ces résultats seront détaillés dans la partie IV du chapitre II. Tous les composés ont ensuite été irradiés en utilisant le même protocole afin de pouvoir les comparer entre eux.

Coloration

Après polymérisation, on constate que les solutions initialement incolores deviennent jaunes. La formation du système ène-yne s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance UV-visible, due à une délocalisation électronique importante des liaisons π . Comme décrit dans le chapitre I, les réseaux fortement conjugués vont avoir un maximum d'absorption dans le rouge (entre 600 et 700 nm) et vont donc apparaître bleu. Plus le réseau sera faiblement conjugué, plus la longueur d'absorption maximale tendra vers les plus faibles longueurs d'onde. Dans notre cas, les micelles polymérisées sont des structures supramoléculaires de petite taille, soumises à de fortes contraintes stériques. Elles vont donc être faiblement conjuguées, présentant un maximum d'absorption aux alentours de 275 nm, et apparaître jaunes.

Le changement de couleur nous donne donc une première indication quant à la nature des objets formés. La coloration jaune sera représentative des micelles alors qu'une coloration rouge indiquera la formation de fibres (Figure 35).

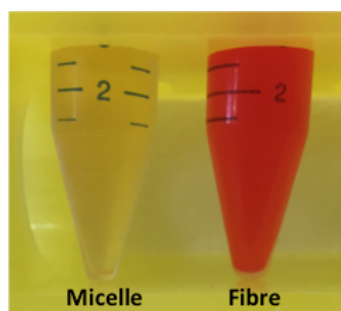


Figure 35 : Coloration des structures micellaires ou fibrillaires obtenues à partir du composé **3**, selon le protocole de formulation utilisé.

Suivi de la polymérisation

Le suivi de la polymérisation a été réalisé par spectrophotométrie UV-visible avec le composé **3**. Après formation des micelles, le système est irradié à différents temps. Un échantillon est prélevé à des intervalles de temps différents et les spectres UV-visible sont enregistrés. Entre 10 min et 2h de polymérisation, on observe un déplacement de l'épaule vers 275 nm et

également une augmentation de l'absorption, synonymes de la création du réseau conjugué. Au delà de 2 heures, l'épaulement s'affaisse et l'absorption diminue (Figure 36). Ce phénomène est rencontré lors d'irradiation prolongée et est probablement dû à la formation d'imperfections dans le réseau.^{36,37} En effet, lors de longues expositions aux irradiations UV, le polymère peut se dégrader à cause d'une augmentation locale de la température qui conduit à la rupture des liaisons covalentes.

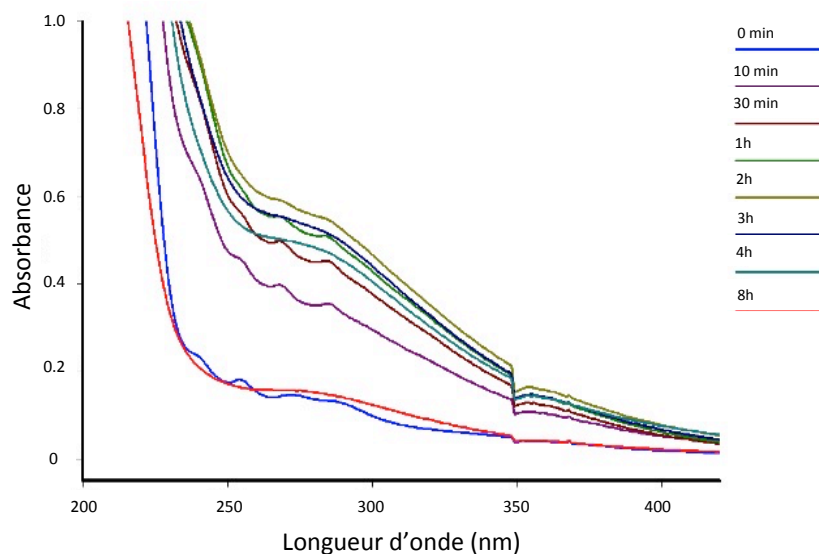


Figure 36 : Suivi de la polymérisation des micelles-Histidine pendant 8h par spectrophotométrie UV-visible.

Stabilité des groupements chimiques

Afin de vérifier l'intégrité des fonctions chimiques lors des irradiations UV, nous avons synthétisé un analogue de **3** : le composé **3'** saturé, ne comportant pas de liaison di-yne et possédant une chaîne à 16 carbones qui est commercial (Figure 37). La stratégie de synthèse utilisée est identique à la précédente.

Le composé **2'** a déjà été synthétisé antérieurement au laboratoire par couplage entre le chlorure de palmitoyle et le composé 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (10 éq.) dans le THF à TA.

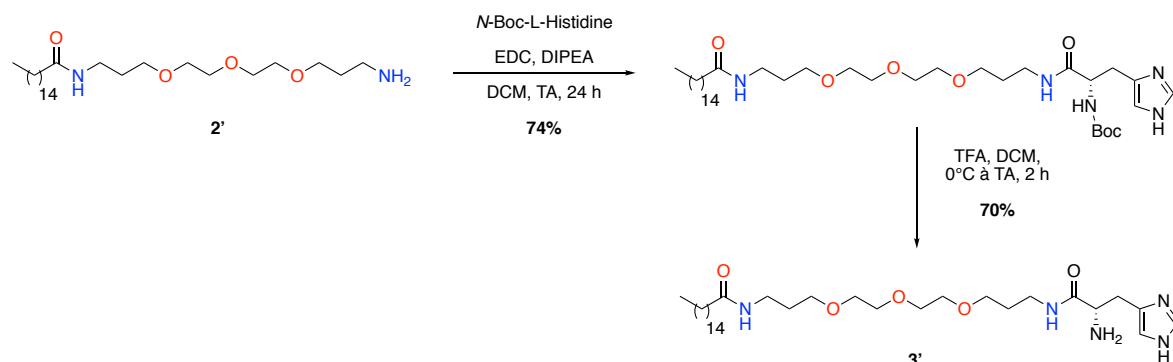


Figure 37 : Schéma réactionnel de la synthèse du composé **3'**.

Une fois le composé synthétisé, une solution à 5 mg/mL du composé **3'** a été formulée selon le protocole utilisé pour la formation des micelles, décrit dans la partie précédente. Cependant, l'eau milliQ est remplacée par de l'eau deutérée afin de pouvoir réaliser les spectres RMN. On constate qu'avant irradiation et à différents temps de polymérisation, les pics représentant les protons de l'imidazole et du groupement en alpha de l'amide sont intacts (Figure 38). Aucune dégradation n'est donc visible en RMN, témoignant de la stabilité de ces fonctions chimiques.

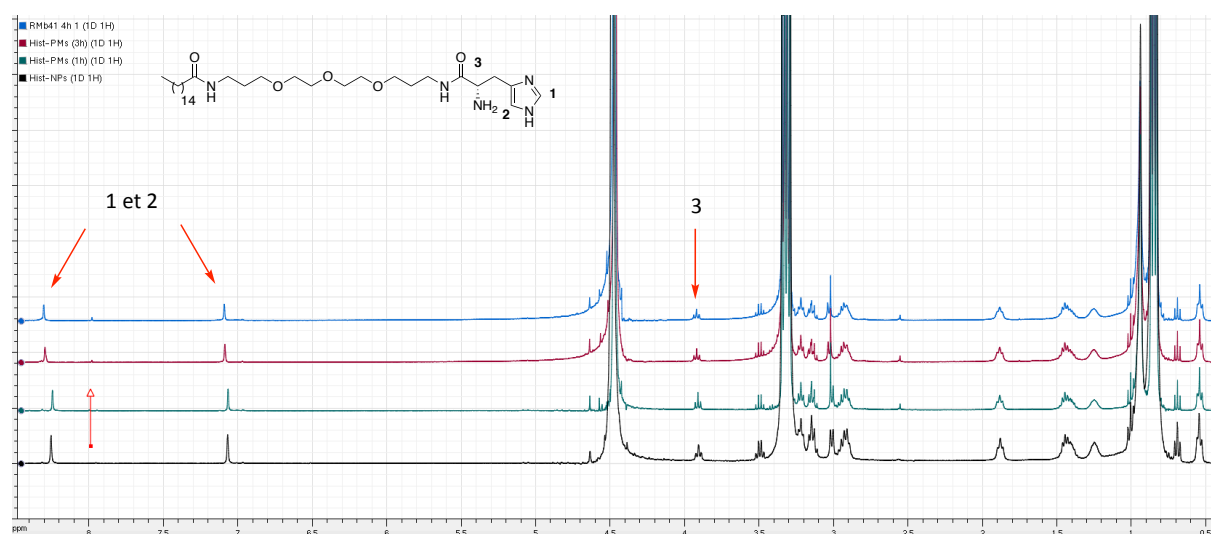


Figure 38 : Suivi de la stabilité du composé **3'** après polymérisation par analyse RMN dans D₂O.

En conclusion, cette méthode de photopolymérisation, rapide à mettre en œuvre, a permis d'obtenir des micelles PDA polymérisées stables et reproductibles sans toucher aux autres fonctions chimiques, notamment les imidazoles des groupements histidines.

III.3 Analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS s'avère être une méthode de choix pour vérifier rapidement la présence de micelles. En effet, cette technique non destructive permet de mesurer la taille et la distribution de particules nanométriques. Le mouvement brownien des particules en suspension conduit à des variations dans l'intensité de la lumière diffusée. L'analyse de ces changements d'intensité de lumière donne accès à la vitesse du mouvement brownien et ainsi à la taille des particules. Afin de réaliser une première sélection des composés, des mesures de DLS de tous les composés, formulés selon le protocole d'obtention de micelles et polymérisé 4 heures, ont été réalisés. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 4. Pour chaque objet, les mesures ont été reproduites trois fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

Composé	Mesure de la taille (nm)	Objets formés
2	6,7	Micelle
2'	6,9	Micelle
3	6,8	Micelle
3'	7,2	Micelle
4	6,9	Micelle
5	9,8	Micelle
6	14,5	Micelle
7	8,5	Micelle
9	10,3	Micelle
10	6,6	Micelle
11	7,7	Micelle
12	8,2	Micelle

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des distributions de taille en nombre, obtenues par DLS, pour les composés synthétisés.

Les résultats obtenus indiquent que tous les composés ont une taille avoisinant les 10 nm de diamètre ce qui correspond à la taille caractéristique des micelles. Nous pouvons donc en conclure que dans notre cas, la nature des têtes hydrophiles n'intervient pas ni dans la formation ni dans la taille des micelles.

L'impact de la polymérisation sur la micelle formée à partir du composé **3** (abrégée MP-Hist) a ensuite été suivi par DLS (Tableau 5).

Temps de polymérisation	Taille des particules MP-Hist (nm)
0	7,6
15 min	7,6
1 h	9,1
3 h	8,7
4 h	6,9
8 h	8,7

Tableau 5 : Suivi de la distribution de taille en nombre de MP-Hist.

Aucune différence significative de la taille des particules n'est observée lorsque l'on augmente le temps de polymérisation. Le temps de polymérisation n'influe donc pas sur la taille des micelles. Cependant, les micelles diluées dans le tampon HÉPES-glucose (HBG : Hepes Buffered Glucose) agrègent progressivement, et nous avons pu constater lors des essais de couplage chimique sur les micelles (cf. Chapitre IV) que celles-ci avaient tendance à former des objets ayant une taille supérieure à 800 nm dès que l'on dépasse $\text{pH} = 7,6$. Nous avons donc choisi de conserver des solutions ayant un pH inférieur à 7,6.

IV. Transfection d'un petit ARN interférent ciblant un gène rapporteur

IV.1 Sélection du gène candidat pour la délivrance *in vitro* de siARN

Une première série de tests biologiques a été réalisée afin de connaître la capacité des micelles à délivrer un siARN. Les expériences ont été réalisées sur une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du poumon exprimant de manière stable le gène de la luciférase (A549-Luc). La luciférase est une enzyme à l'origine du phénomène de la bioluminescence présente notamment chez le ver luisant. Ce gène, une fois isolé et introduit dans un plasmide qui va être utilisé pour transformer une lignée cellulaire de façon stable, va servir de gène rapporteur de l'expression. En effet, après ajout du substrat de l'enzyme, la luciférase est facilement quantifiable par luminescence et peut donc servir de gène modèle pour évaluer la capacité d'un vecteur à introduire des siARN.

Tout d'abord, les complexes sont formés par interaction électrostatique en mettant en présence une quantité croissante de micelles polymérisées avec une quantité fixe de siARN,

dans un tampon HEPES glucose. Pour chaque complexe, il est important de définir un ratio de charge N/P qui est calculé de la manière suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{monomère}) * 1 (\text{mol})}{n(\text{siRNA}) * 42 (\text{mol})}$$

42 étant le nombre de phosphates présents dans le siARN que nous avons utilisé.

La concentration finale en siARN que nous avons choisi d'utiliser est relativement faible puisqu'elle est de 10 nM. Deux siARN différents ont été utilisés : un siARN possédant une séquence capable de s'apparier parfaitement avec celle de l'ARNm codant pour la luciférase (siLuc) et un siARN contrôle (siCTL). Le siCTL est un contrôle négatif qui ne cible aucun transcrite cellulaire. Il permettra donc de s'assurer de la spécificité de l'extinction de l'expression du gène ciblé. Après 1h de maturation à température ambiante, les complexes sont ensuite ajoutés sur les cellules A549-Luc, préalablement ensemencées dans des plaques 24 puits, en absence de sérum. 4 heures après le dépôt, 10 % de sérum sont ajoutés aux cellules. Les cellules sont lysées et la luciférase est dosée par luminescence après 48h de transfection. La viabilité cellulaire est déterminée par dosage des protéines cellulaires. En contrôle positif, l'agent de transfection commercial INTERFERin™ est ajouté afin de contrôler le succès de l'expérience.

Pour la suite des travaux, sauf mention exceptionnelle, les expériences de transfection ont été réalisées en suivant ce même protocole.

Une distinction sera faite entre inhibition et inhibition spécifique. L'inhibition représente la différence de l'expression de la luciférase obtenue entre le siLuc délivré avec le vecteur et les cellules non transfectées alors que l'inhibition spécifique sera rapportée aux cellules transfectées avec le siCTL et calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition spécifique} = \left(1 - \frac{RLU (\text{siLuc})}{RLU (\text{siCTL})}\right) * 100 \%$$

Une expérience préliminaire a montré que les micelles formulées à partir du composé **2** (abrégé MP-NH₂) ne permettent pas une transfection efficace du siARN (Figure 39). En effet, la différence entre l'expression de la luciférase obtenue après transfection avec le siLuc et le siCTL est quasiment nulle. De plus, l'expression de la luciférase reste très importante (60%), ce qui signifie que le gène n'a pas été éteint de manière efficace. De plus, d'après la courbe de viabilité cellulaire, MP-NH₂ présente une toxicité relativement élevée.

Des résultats plus prometteurs ont cependant été obtenus avec les micelles MP-Tyro (formulées à partir du composé **4**) et MP-Hist (formulées à partir du composé **3**). Malgré une toxicité intrinsèque, les deux composés ont permis une inhibition du gène à 65 et 80% respectivement pour des ratios N/P de l'ordre de la cinquantaine. Il est également important de noter qu'à cette concentration en vecteur, l'expression en luciférase avec le siCTL reste aux alentours de 80% ce qui signifie que l'inhibition du gène est majoritairement spécifique.

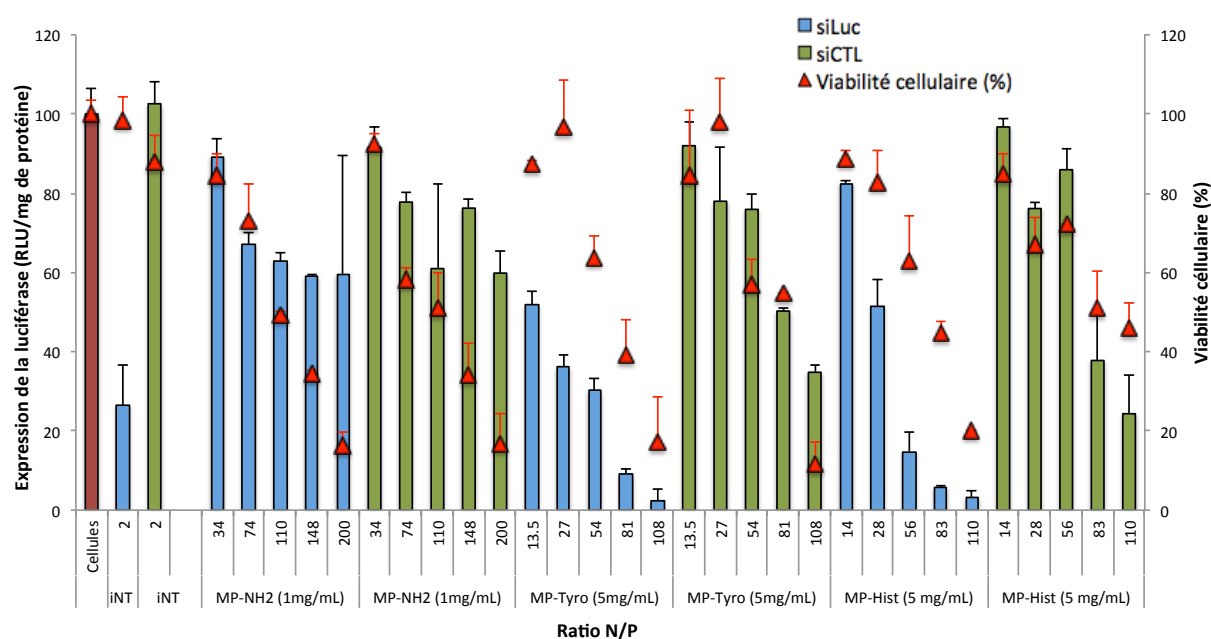


Figure 39: Transfection du siLuc/siCTL pour différentes concentrations en tensioactifs. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™), MP-NH₂ (2), MP-Tyro (4) et MP-Hist (3), toutes polymérisées 4h. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Des expériences similaires ont également été réalisées avec les composés **5-7** et **9-12** ainsi qu'avec les deux candidats actifs en transfert de gène (MP-NEt₂ et MP-(NH₂)₂ ; voir ci-dessous pour la structure).³³

Le pourcentage d'inhibition ainsi que la toxicité intrinsèque obtenus par luminescence et par dosage des protéines respectivement ont été regroupés dans le Tableau 6.

Celui-ci regroupe les nouveaux composés synthétisés basés sur un dérivé d'acide aminé couplé sur un espaceur trioxadecane amine ainsi que des composés déjà décrits par notre groupe pour la vectorisation de gène.

Nom de la micelle	Tête polaire du monomère	Inhibition du gène de la luciférase	Toxicité
MP-Gly		50%	+
MP-Ala		50%	++
MP-Val		30%	++
MP-Tyr		65%	++
MP-Hist		80%	++
MP-NH ₂		Inactif	++
MP-10		Inactif	+++
MP-11		Inactif	+++
MP-12		Inactif	+++
MP-Pyr		Inactif	-
MP-NEt ₂		Inactif	+
MP-(NH ₂) ₂		Inactif	++

Tableau 6 : Tableau représentant les inhibitions et la toxicité induites par les différentes micelles polymérisées 48 h après transfection de siARN.

Ces expériences préliminaires ont permis d'évaluer l'activité des différents composés pour la délivrance de siARN et donc de sélectionner le candidat le plus prometteur.

De façon surprenante, MP-NEt₂ et MP-(NH₂)₂ ne sont pas actifs en délivrance de siARN malgré leur efficacité en transfert de gène.³³ De même, les micelles MP-NH₂ sont inefficaces alors que tous les composés comportant un acide aminé naturel (glycine, alanine, valine,

tyrosine, histidine) présente une activité. Ces résultats démontrent que la nature de la tête polaire joue un rôle très important.

En comparant les pKa théoriques des amines primaires des acides aminés naturels, on remarque que les composés les plus actifs, MP-Hist et MP-Tyro, possèdent des pKa des amines primaires les plus faibles (7,8 et 8,02 respectivement) contre des pKa compris entre 8,3 et 8,5 pour les autres. De plus, le cycle imidazole semble conférer de meilleures propriétés au vecteur que le groupement phénol puisqu'il s'avère être le candidat le plus efficace avec une inhibition spécifique à hauteur de 80%. De nombreuses études ont montré que l'utilisation de certaines fonctions comportant des pKa favorables d'environ 6-7 tel que l'imidazole, permettait d'induire un effet éponge à proton entraînant une augmentation du relargage cytosolique et donc une inhibition du gène plus importante.³⁸⁻⁴⁰

Afin d'étudier l'impact du cycle sur l'efficacité du vecteur, trois composés **10**, **11** et **12**, comportant des amines tertiaires ayant des pKa différents, ont été synthétisés et testés en délivrance de siARN (Figure 40). Ces micelles (MP-10, MP-11 et MP-12) sont, malheureusement inactives et pour la majorité très toxique. Le pKa théorique le plus favorable semble donc se trouver autour de 6.

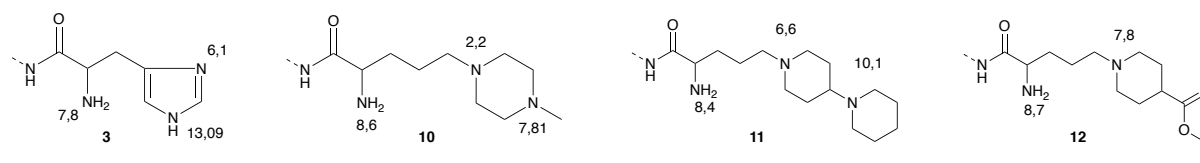


Figure 40: pKa théoriques des composés 10, 11 et 12 obtenus d'après MarvinSketch

MP-Hist et MP-Tyro ont également en commun la présence d'un cycle aromatique contrairement aux composés comportant les acides aminés non naturels. C'est la raison pour laquelle un composé possédant un cycle pyridine (MP-Pyr) a été synthétisé et testé (Tableau 6). MP-Pyr n'a cependant montré aucune activité (ni aucune toxicité).

Pour la suite, l'optimisation et l'étude complète ont donc été réalisées sur MP-Hist, composé le plus prometteur.

Composé sélectionné :

- Le composé **3** comportant un groupement histidine comme tête polaire

IV.2 Optimisation du composé actif

Afin d'optimiser l'efficacité de la micelle MP-Hist, l'impact de plusieurs facteurs a été étudié. Différentes conditions de formulation mais également divers paramètres biologiques ont été modifiés dans le but de déterminer les conditions optimales pour la transfection de siARN.

IV.2.1 Optimisation du temps de polymérisation

Tout d'abord, l'impact de la polymérisation sur la délivrance de siARN a été étudié. L'expression de la luciférase ainsi que la viabilité cellulaire ont été mesurées pour chaque micelle (Figure 41). Lorsque la micelle n'est pas polymérisée (MNP-Hist), une très forte cytotoxicité est observée. Celle-ci diminue après polymérisation des micelles (MP-Hist). En effet, en polymérisant, la quantité de monomères libres devrait être considérablement réduite. Le composé perd alors sa nature tensio-active réduisant ainsi la déstabilisation des membranes cellulaires qui conduit à la cytotoxicité. De plus, en augmentant le temps de polymérisation de 15 min à 4 heures, on observe que les micelles formées présentent une plus grande spécificité au niveau de l'inhibition. A 15 min, il n'y a pas de différence significative entre les activités observées pour les deux siARN alors qu'à 4h l'inhibition devient siARN spécifique. Pour des raisons non encore élucidées, à 8 heures de polymérisation l'activité biologique est réduite. Toutefois, ces résultats peuvent être mis en relation avec les observations faites en spectrophotométrie UV (Figure 36). Nous supposons que les déformations au niveau du réseau ène-yne entraînent une dégradation ou une déformation de la micelle qui deviendrait alors moins efficace.

Afin d'avoir le meilleur compromis entre efficacité et toxicité, le temps de polymérisation a été fixé à 4 heures pour la suite de ces travaux.

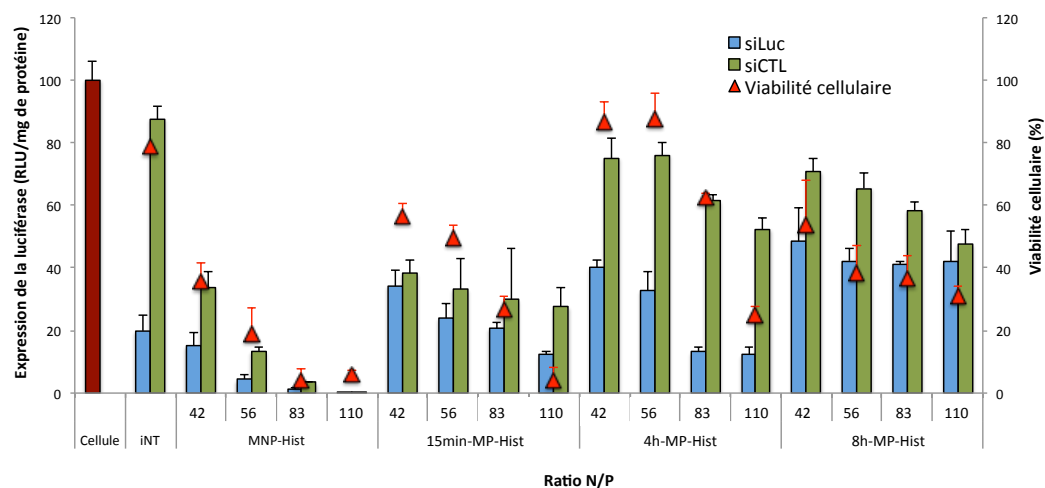


Figure 41 : Transfection du siLuc/siCTL(10 nM) par le vecteur MP-Hist, pour différents ratios N/P, à différents temps de polymérisation. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™), MP-Hist non polymérisé (MNP-Hist), MP-Hist polymérisé 15 min (15min-MP-Hist), 4h (4h-MP-Hist) et 8h (8h-MP-Hist). Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Condition retenue:

- Durée d'irradiation : 4 heures dans l'eau à 5 mg/mL

IV.2.2 Evaluation de l'impact de la concentration en siARN

Le deuxième paramètre que nous avons fait varier est la concentration en siARN. L'efficacité biologique ainsi que la viabilité cellulaire ont été déterminées pour trois concentrations différentes : 5, 10 et 30 nM (Figure 42). En prenant pour référence les résultats obtenus avec 10 nM, on constate que lorsqu'on diminue par 2 la concentration en siARN, la toxicité diminue. Ce résultat est cohérent car la quantité de vecteur a été diminuée pour maintenir les mêmes ratios N/P. Cependant, l'inhibition spécifique diminue également de manière importante. A cette concentration, notre vecteur ne semble donc pas efficace.

Les résultats obtenus avec 30 nM de siARN ont révélé une forte toxicité. En revanche des N/P moins importants (15 au lieu de 56) ont permis d'atteindre la même inhibition spécifique qu'avec 10 nM de siARN. Afin d'avoir le meilleur compromis entre efficacité et toxicité, la concentration en siARN de 10 nM a été retenue pour la suite. Enfin, on constate qu'à concentration égale de siARN (10 nM), l'efficacité de la micelle MP-Hist est comparable à celle de l'agent de transfection commercial.

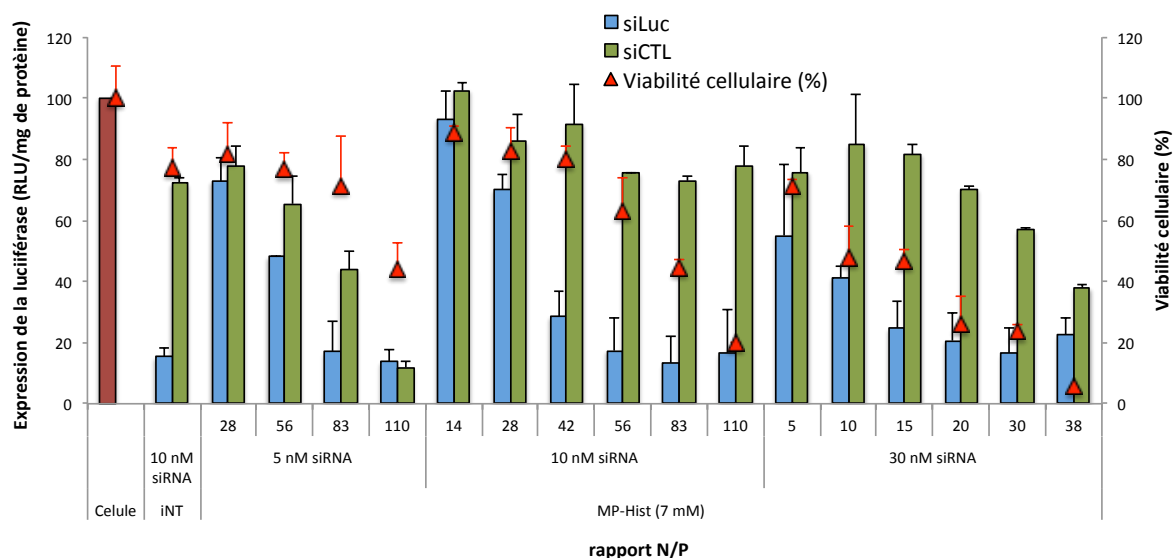


Figure 42 : Transfection du siLuc/siCTL par le vecteur Hist-MP pour différents ratios N/P, à différentes concentrations en siARN. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™) et MP-Hist. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Condition retenue:

- Concentration en siARN : 10 nM

IV.2.3 Evaluation de l'impact du sérum

Transfection en présence de sérum

Il est connu que les protéines présentes dans les milieux biologiques ont la capacité d'entraver l'internalisation de certains vecteurs cationiques. Cette baisse d'activité peut s'expliquer entre autres par les interactions entre vecteurs cationiques et protéines sériques. C'est pourquoi les expériences de transfection de siARN sont généralement réalisées dans un premier temps en absence de sérum. Nous avons donc réalisé l'expérience en comparant l'efficacité du vecteur obtenu en présence et en absence de sérum. Les résultats obtenus en présence de 10% sérum montrent que l'efficacité est drastiquement diminuée. En effet, aucune inhibition spécifique n'est observée (Figure 43). Pour la suite des travaux et afin de valider notre preuve de concept, le dépôt des complexes sur les cellules a donc été réalisé en absence de sérum afin d'obtenir une internalisation efficace. Le sérum (10 %) a ensuite été ajouté, 4 heures après le début de l'expérience.

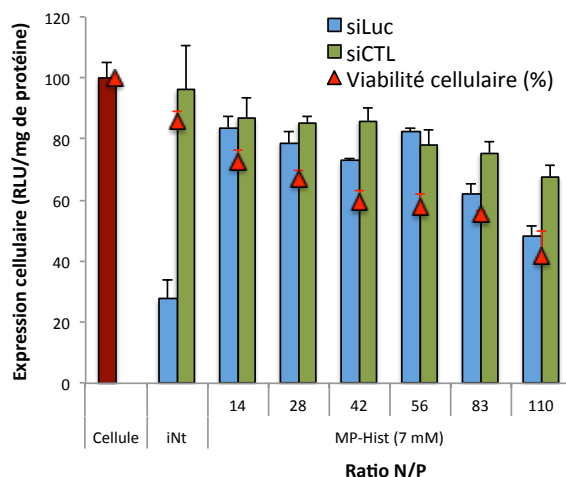


Figure 43 : Transfection du siLuc/siCTL par le vecteur Hist-MP pour différents ratios N/P en présence de sérum. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™) et MP-Hist. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Condition retenue:

- Dépôt des complexes sur les cellules en absence de sérum. Ajout de 10% de sérum après 4h

IV.2.4 Réduction de la toxicité

Malgré des temps de polymérisation assez élevés, une toxicité résiduelle sur les cellules persiste, probablement due aux monomères libres encore présents.⁴¹ Afin de résoudre ce problème, nous avons donc dialysé exhaustivement nos échantillons dans le but d'enlever les monomères non polymérisés. La structure moléculaire des différentes micelles ainsi que leurs toxicités ont ensuite été étudiées.

Dialyse des échantillons

En vue de réduire la quantité de monomères présents dans les micelles, des dialyses (2000 MWCO, *Molecular weight Cut-off*) ont été réalisées avec deux solvant différents : l'eau ou l'éthanol à 70 %.

Suite à ces dialyses, les nouvelles concentrations en amine ont été calculées par dosage des amines primaires. Le dosage a été réalisé à l'aide de l'acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène (TNBS). Ce dernier est un réactif très sensible, utilisé pour quantifier les groupements amines libres. La réaction du TNBS avec ces amines primaires génère un produit hautement chromogénique détectable par spectrophotométrie UV-visible à 335 nm (Figure 44).

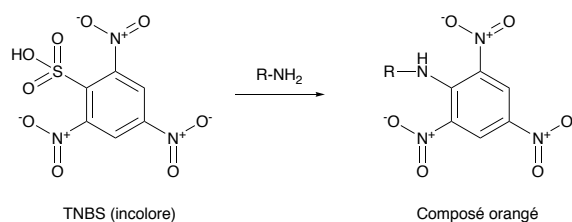


Figure 44 : Dosage d'amine primaire par le TNBS

Lorsqu'on trace graphiquement l'absorbance en fonction de la concentration en tensio-actif, on obtient des courbes linéaires. En prenant pour référence MP-Hist (7 mM) et sachant que le coefficient directeur de la pente est proportionnel à la concentration ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$), les concentrations réelles des échantillons dialysés peuvent être obtenues. Ainsi, le lot dialysé dans l'eau a une concentration de 6,3 mM et celui dans l'éthanol de 5 mM (Figure 45). Par la suite, les micelles polymérisées et dialysées seront notées MPD.

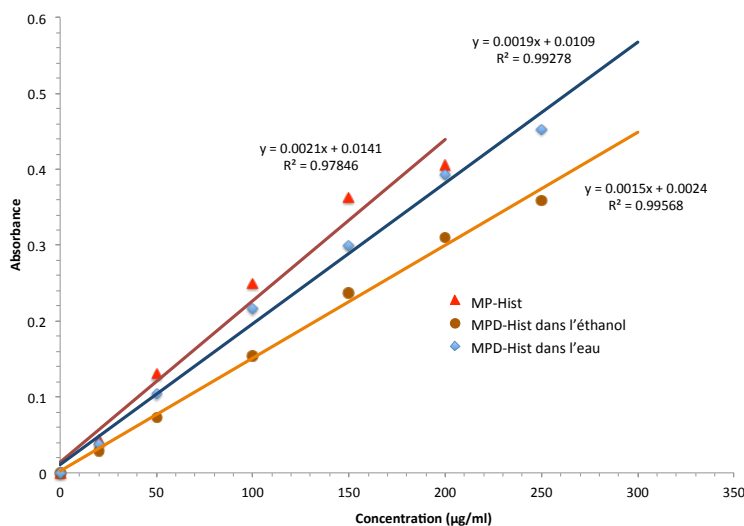


Figure 45: Dosage des amines primaires par TNBS, de MPD-Hist dans l'eau ou dans l'éthanol en prenant pour référence MP-Hist.

Analyse par RMN du DOSY

Nous avons choisi d'analyser MNP-Hist, 4h-MP-Hist et 4h-MP-Hist dialysé par des expériences de type DOSY, afin de comprendre les différences structurales qu'il existe entre ces objets. En effet, l'expérience DOSY est une expérience de RMN à deux dimensions qui permet de discriminer les composés d'un mélange d'après leur différence de poids moléculaire. La première correspond aux déplacements chimiques obtenus en RMN du proton et l'autre aux coefficients de diffusion. Ainsi, si plusieurs molécules sont présentes au sein d'un même échantillon, cette expérience sera capable de montrer les différentes populations en fonction de leur coefficient de diffusion.

Tout d'abord, les trois échantillons de micelles sont évaporés à sec et redissociés dans une solution de méthanol deutéré afin d'obtenir des structures dissociées. La micelle non

polymérisée est prise comme contrôle. Le spectre obtenu montre une seule population avec une constante de diffusion D de $568 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 46A).

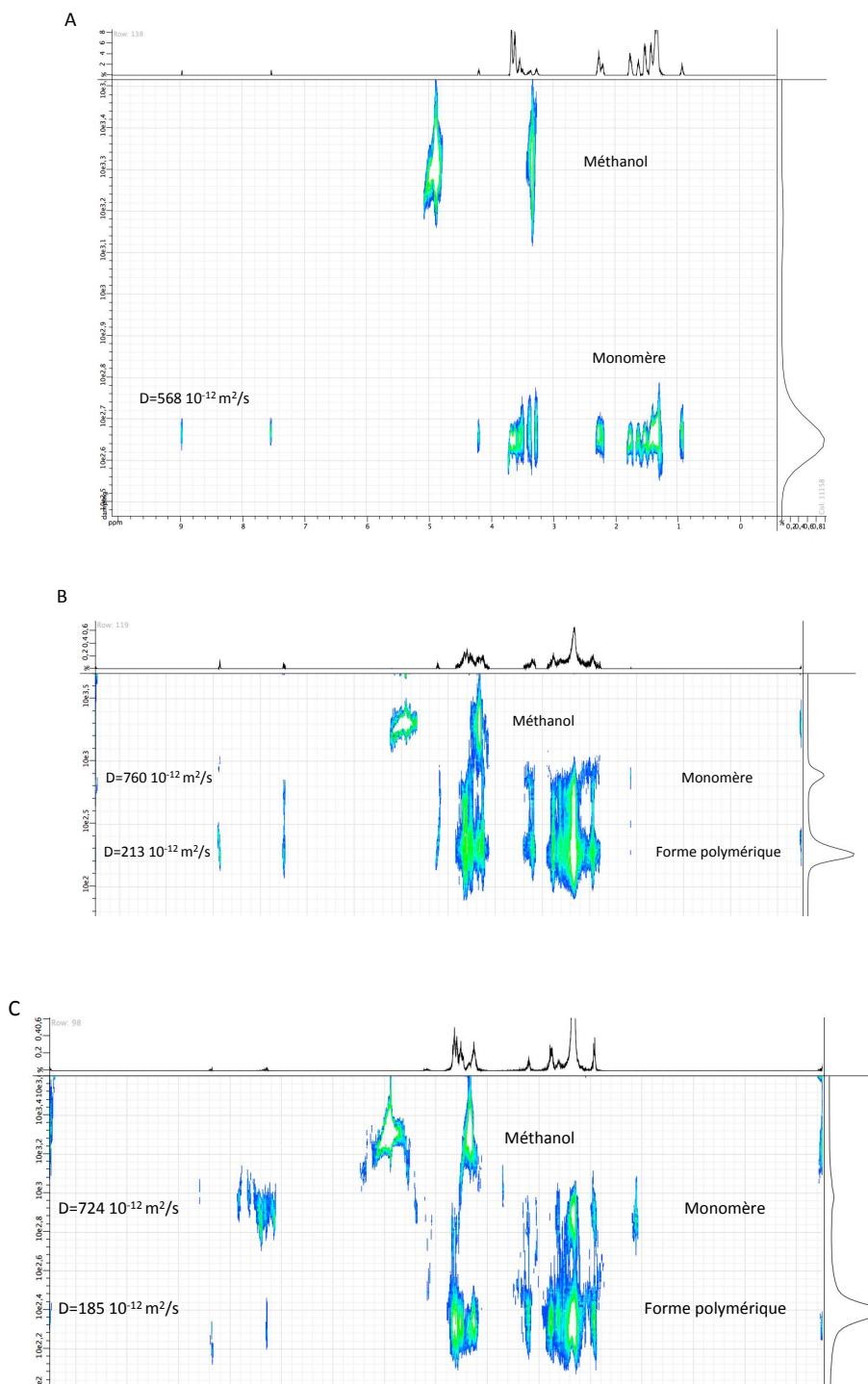


Figure 46: Expériences par RMN-DOSY de A. MNP-Hist B. 4h-MP-Hist, C. 4h-MP-Hist dialysé.

Cette population correspond à la forme monomère de l'amphiphile. Toute la micelle a donc été capable de se dissocier, témoignant de l'absence de lien covalent entre les motifs di-yne.

Le même protocole ainsi que les mêmes analyses ont été réalisées avec MP-Hist dialysée et non dialysée. MP-Hist présentent deux populations, une correspondant aux monomères libres avec une constante de diffusion égale à $760 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une autre avec une diffusion plus faible ($D = 213 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) reflétant les structures oligomériques (Figure 46B). En effet, la forme polymérique étant une plus grosse particule, elle diffusera moins vite. En intégrant les pics correspondant aux diverses populations, le pourcentage de chaque population peut être calculé. Ainsi, l'expérience montre clairement qu'après 4 heures de polymérisation, 25% de monomères libres sont encore présents dans l'échantillon. De même, l'analogue dialysé montre deux populations distinctes. La première représentant le monomère ($D = 724 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et la deuxième correspondant à la forme polymérique ($D = 185 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Figure 46C). Cependant, après dialyse, seulement 10% de monomères restent libres. Partant de ces observations, nous avons évalué les IC_{50} de chaque échantillon afin de corrélérer ces résultats à la toxicité intrinsèque du vecteur.

Étude de la cytotoxicité par dosage MTT

Pour valider l'hypothèse selon laquelle le monomère libre est le principal responsable de la toxicité du vecteur, des tests de cytotoxicité sur les cellules A549-Luc et HeLa ont été réalisées (Figure 47). 24h après l'adhérence des cellules, les différentes micelles sont ajoutées à différentes concentrations sur les cellules. La viabilité cellulaire a ensuite été quantifiée par dosage MTT après 48 heures. Les résultats confirment les observations faites en délivrance de siARN. En effet, la micelle non polymérisée MNP-Hist est trois fois plus toxique que l'analogue polymérisé ($\text{IC}_{50} = 24 \mu\text{M}$ et $\text{IC}_{50} = 63 \mu\text{M}$ respectivement), confirmant l'intérêt de la polymérisation (Figure 47A). Une réduction similaire de la toxicité a également été observée sur la lignée humaine du cancer du col de l'utérus (HeLa) (Figure 47B).

En vue de réduire la quantité de monomères, deux stratégies de dialyse ont été mises au point. La première consistait à dialyser les micelles dans l'eau pendant 4 jours. Cependant, ce protocole de dialyse n'a pas permis de diminuer significativement la toxicité du vecteur. En effet, sur les A549-Luc, MPD-Hist dialysé dans l'eau a une IC_{50} de $56 \mu\text{M}$ contre $63 \mu\text{M}$ pour l'analogue seulement polymérisé. Afin d'améliorer cette formulation, nous avons donc décidé de dialyser dans un solvant où le monomère était soluble : l'éthanol à 70 %. Et cette fois-ci, les résultats montrent que le produit dialysé est environ deux fois moins toxique que la micelle polymérisée. En comparant ces résultats à ceux obtenus en DOSY, on constate que le pourcentage de monomères est bien lié à la toxicité. En effet, plus il y a de monomères libres,

plus la toxicité est importante. Pour la suite des travaux, seul le composé dialysé dans l'éthanol a donc été utilisé.

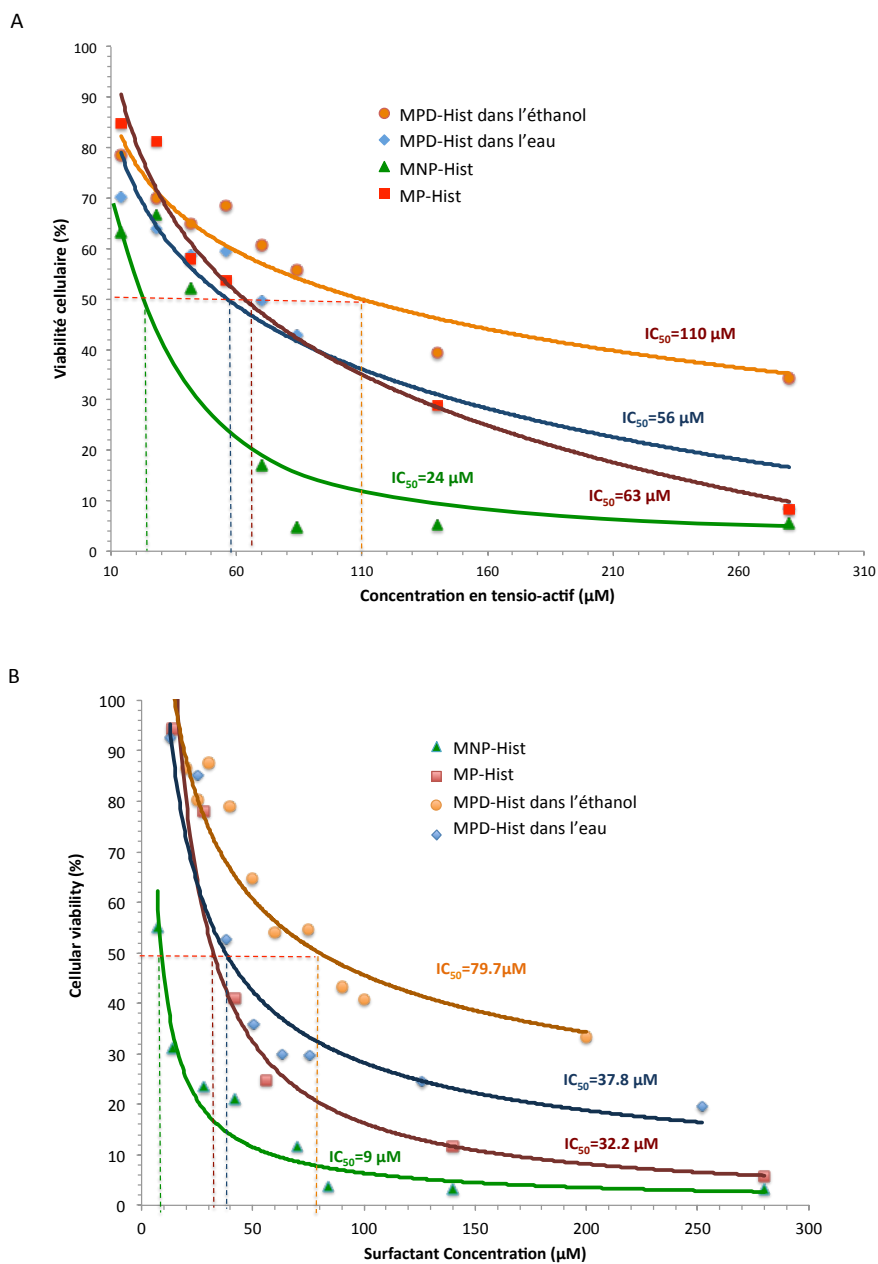


Figure 47: Viabilité cellulaire obtenue par dosage MTT, 48h après l'ajout des différentes micelles sur les cellules. Celle-ci est donnée pour la micelle non polymérisée (MNP-Hist), micelle polymérisée (MP-Hist) et les micelles dialysées dans l'eau ou l'éthanol (MPD-Hist). A. Lignée cellulaire A549-Luc B. Lignée cellulaire HeLa. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Influence de la réduction de monomères dans les micelles sur l'activité biologique

Afin de s'assurer que l'élimination des monomères libres n'influe pas sur l'activité biologique, MP-Hist et MPD-Hist ont été testés en transfection de siARN. L'inhibition de l'expression de la luciférase a été calculée en prenant pour référence l'expression obtenue avec les cellules non transfectées. Les résultats obtenus avec les micelles optimisées sont présentés dans la Figure 48. En comparant avec le système non dialysé, MPD-Hist montre une efficacité plus importante avec plus de 80% d'inhibition spécifique et ce en utilisant moins de matériel (N/P = 39 au lieu de N/P de 56 pour le non dialysé) entraînant une diminution de la toxicité.

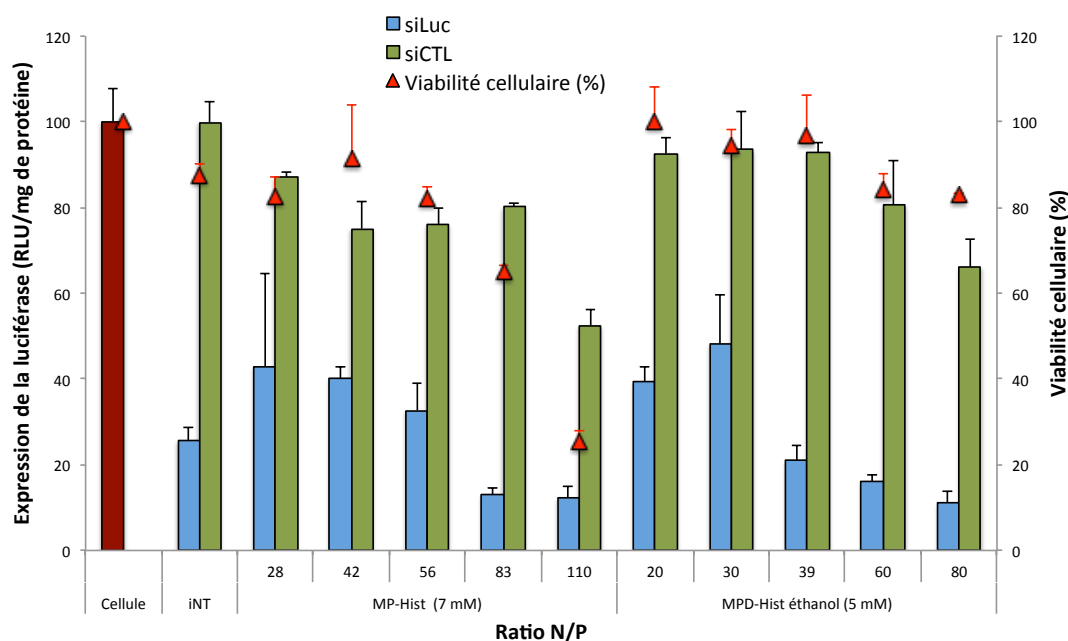


Figure 48: Transfection du siLuc/siCTL (10 nM), pour différentes concentrations en micelle. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™), MP-Hist et MPD-Hist. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

En résumé, la polymérisation suivie de l'étape de dialyse dans l'éthanol a permis de réduire drastiquement la toxicité intrinsèque du vecteur tout en conservant une transfection efficace. Pour la suite, seul le composé dialysé a donc été utilisé.

Condition retenue:

- Purification par dialyse à l'éthanol (70 %) du composé pendant 4 jours

IV.2.5 Synthèse et évaluation d'un groupement di-histidine

La tête histidine jouant un rôle crucial, nous avons synthétisé un amphiphile comportant deux têtes histidines afin d'essayer de conférer aux micelles encore davantage de "pouvoir tampon".

Synthèse

La synthèse du monomère di-histidine **8** a été réalisée à partir du composé **4** par couplage peptidique (Figure 49). L'histidine doublement protégée par des groupements Boc est mise à réagir avec le composé **4**, en présence de EDC, HOBT et DIPEA dans le dichlorométhane. Après purification sur colonne chromatographique phase inverse, le composé intermédiaire comportant les groupements protecteurs est obtenu avec un rendement de 34 %. Après déprotection des groupements Boc, le composé **8** est obtenu avec un rendement de 45 %. Malgré l'ajout de HOBT permettant la diminution de la racémisation, deux diastéréoisomères sont obtenus dans un rapport 70/30. Nous avons supposé que la stéréochimie majeure était représentée par la conservation des conformations de départ des produits (S, S). Cependant nous n'avons pas cherché à les séparer.

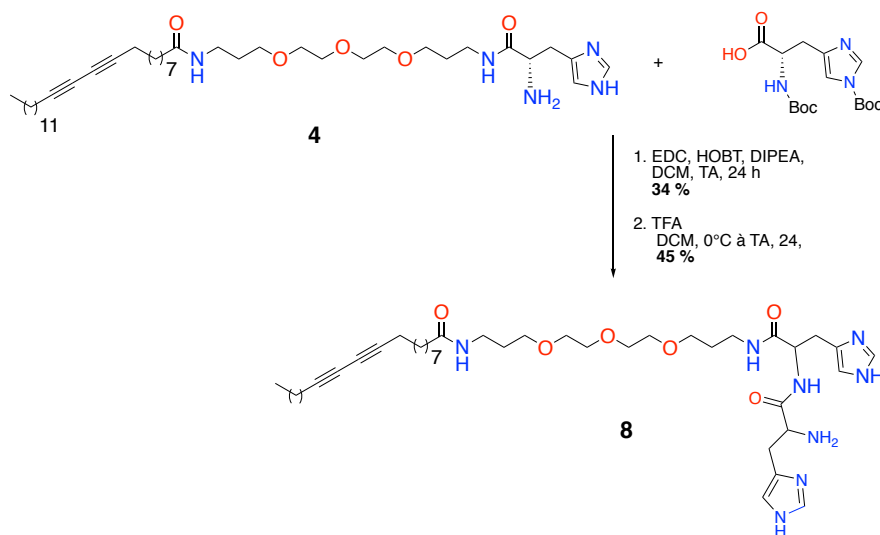


Figure 49 : Schéma réactionnel de la synthèse du composé **8**

Une fois synthétisé, le composé **8** a été formulé comme précédemment en micelles puis celles-ci sont photopolymérisées et dialysées. Comme pour les autres vecteurs, des objets de l'ordre de 10 nm ont été mesurés par DLS, confirmant la présence des micelles (MP-DiHist). L'évaluation biologique pour la délivrance en siARN a ensuite été étudiée.

Evaluation biologique

Le test biologique a été strictement réalisé dans les mêmes conditions que pour MP-Hist. De même que MP-Hist, MP-DiHist permet de vectoriser de manière très efficace le siARN (Figure 50). En effet, 80 % d'inhibition spécifique ont été obtenus avec un ratio N/P de 70 tout en conservant une faible toxicité. Cependant, l'ajout d'une deuxième tête histidine n'améliore pas de manière significative les résultats. L'encombrement stérique dû à l'ajout de la nouvelle tête polaire empêche probablement une protonation efficace de l'imidazole de la première tête histidine. Plus facile à synthétiser que MP-DiHist, le composé MP-Hist a donc été retenu pour le reste des expériences biologiques.

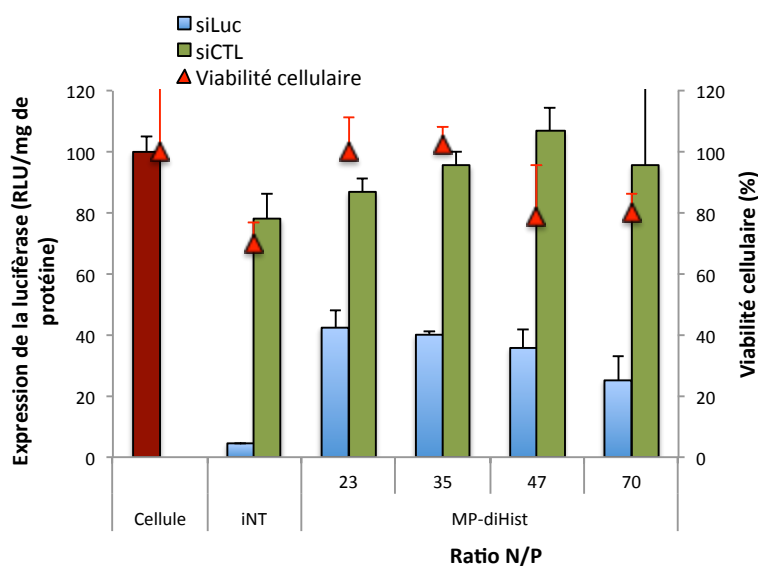


Figure 50 : Transfection du siLuc/siCTL (10 nM), pour différentes concentrations en micelle. L'expression de la luciférase (histogrammes) et la viabilité cellulaire (triangles) sont données pour les cellules non transfectées, le contrôle positif (INTERFERin™), MP-DiHist. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Composé retenu :

- MPD-Hist

IV.3 Caractérisation des complexes siARN/micelle-PDA

IV.3.1 Analyse par DLS

Comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, un des défis majeurs de l'oncologie est d'arriver à cibler les cellules tumorales. Une des stratégies consiste à synthétiser des vecteurs de petites tailles qui vont permettre un ciblage passif des cellules tumorales. En effet, les petits objets sont capables de diffuser plus profondément à travers les tissus et peuvent s'accumuler dans la tumeur *via* l'effet EPR.⁴²

Dans ce but, les nanoparticules ont été développées afin d'obtenir des petits objets de l'ordre de la centaine de nm. Pour cela, la taille des complexes a été étudiée dans différents milieux de complexation afin de trouver le milieu optimal.

Etude de la taille des complexes dans différents milieux de complexation

Les complexes MPD-Hist/siARN ont été formulés dans différents milieux compatibles avec les cellules. La distribution de la taille des différentes particules a ensuite été mesurée par DLS (Tableau 7).

On remarque qu'en présence de milieux ayant une concentration élevée en sels tels que NaCl ou dans des milieux de culture complexes tels que OptiMEM et RPMI, des objets supérieurs à 100 nm sont formés.

Plus encourageant, le milieu HBG présentant une faible teneur en sels permet la formation d'objets ayant une taille inférieure à 100 nm. Il a donc été utilisé pour la suite des travaux. Pour tous les composés, on constate que le temps de maturation ne semble pas impacter la taille des objets. Cependant, le temps de maturation choisi pour le reste de l'étude est de 1 heure.

Milieu de complexation	N/P	Temps de maturation	Taille (nm)
HBG (10 mM HEPES-Na + 10 mM HEPES)	40	30 min	51
	40	1 h	49
NaCl (150 mM)	40	30 min	213
	40	1 h	362
	80	30 min	280
	80	1 h	298
OptiMEM	20	30 min	200
	20	1 h	200
	40	30 min	190
	40	1 h	210
RPMI	40	30 min	> 500
	40	1h	> 500

Tableau 7 : Étude de la distribution de la taille des complexes MP-Hist/siARN en fonction du milieu, du ratio N/P et du temps de maturation.

Conditions retenues:

- Milieu de complexation : HBG
- Temps de maturation des complexes : 1 heure

IV.3.2 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose

La capacité des vecteurs à complexer les siARN a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Le siARN a été mis en présence de différentes quantités de MP-Hist dans du HBG (pH = 7,4) afin d'obtenir des N/P croissants. Pour rappel, le ratio N/P représente la charge globale du complexe, où N est le nombre d'amines primaires et P le nombre de groupements phosphates du siARN. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, ces complexes sont ajoutés sur le gel d'agarose comprenant du Sybersafe, un intercalant fluorescent d'ADN. Le gel a ensuite été visualisé sur un transilluminateur UV. Lorsque du TBE (Tris Borate EDTA, pH = 8,2), tampon classique de migration pour les acides nucléiques est utilisé comme tampon de migration, la complexation totale du siARN se fait à partir d'un N/P supérieur à 30 (Figure 51A). Ceci s'explique par le fait qu'à pH basique, les amines primaires des groupements histidines du vecteur ne sont presque plus protonées, les micelles ne peuvent donc plus complexer efficacement le siARN. Afin d'étudier le comportement de ces complexes dans des conditions utilisées en biologie, nous avons utilisé comme tampon migrateur un tampon tris-acétate (T-A, pH = 7,5, 40 mM). Dans ce cas, les résultats montrent qu'à partir d'un N/P égale à 2, la totalité des siARN est complexée (Figure 51B).

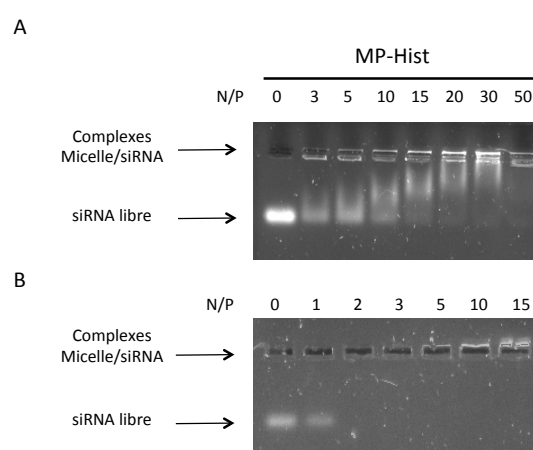


Figure 51 : Étude de la complexation des micelles/siARN en milieu HBG pour différents ratios N/P. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose A. Électrophorèse réalisée avec TBE comme tampon de migration. B. Électrophorèse réalisée avec T-A comme tampon de migration

Condition retenue :

- Tampon de migration : Tris-acétate pH = 7,5

Des gels similaires ont également été réalisés pour les micelles MP-Tyro, MP-NH₂, MP-Gly, MP-10, MP-11, MP-12 et MP-Pyr (Figure 52). On remarque qu'à l'exception de MP-NH₂ et MP-Pyr, toutes les micelles sont capables de complexer totalement les siARN à partir d'un ratio N/P de 2. L'étape de complexation n'est donc pas responsable du manque d'activité observé pour les composés présentant des acides aminés non naturels.

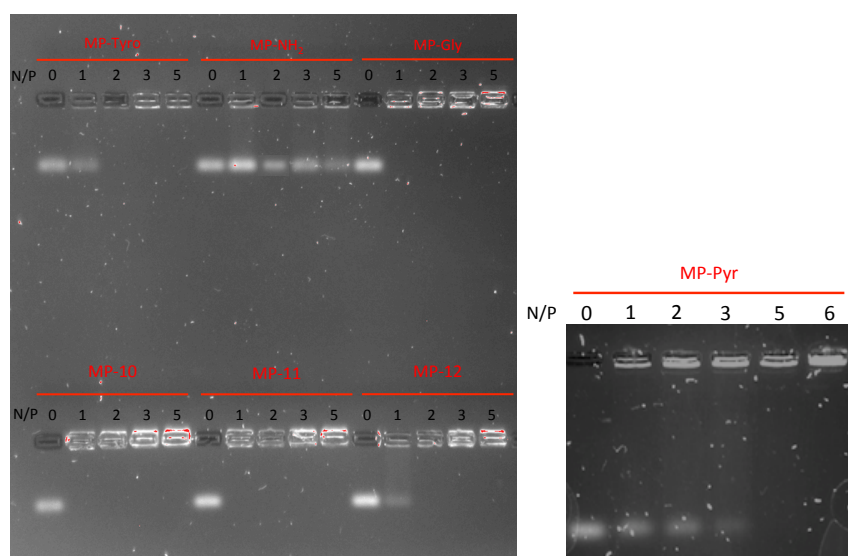


Figure 52 : Etude de la complexation des micelles-siARN en milieu HBG pour différents N/P. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.

Il est important de noter que des ratios N/P nettement plus élevés sont nécessaires pour délivrer de manière efficace le siARN *in vitro* que les ratios N/P minimaux déterminés par électrophorèse sur gel d'agarose. En effet, même si la complexation est totale à partir d'un N/P de 2, les meilleurs résultats en transfection sont obtenus à partir d'un N/P supérieur à 50 pour le composé MP-Hist et 39 pour l'analogue dialysé. De telles observations ont également été faites pour des agents de transfection peptidiques⁴⁰ ou polymériques.⁴³ Afin d'expliquer ce phénomène, des expériences complémentaires ont été effectuées. Tout d'abord, les tailles des complexes MPD-Hist/siARN en fonction du ratio N/P ont été mesurées. Des quantités croissantes de siARN ont été mises en présence d'une quantité fixe de micelles dans une solution HBG. Les complexes ainsi formés possèdent des ratios N/P allant de 5 à 50. Après 1 heure de maturation à température ambiante, la taille a été mesurée par DLS. Les résultats

montrent clairement qu'en augmentant la charge positive du complexe, la taille des complexes devient inférieure à 100 nm (Figure 53).

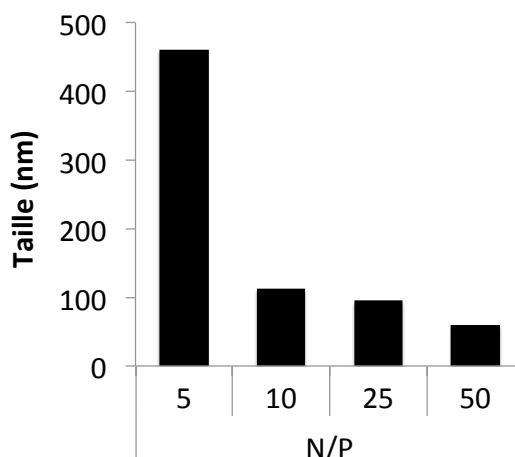


Figure 53 : Distribution en nombre de la taille des complexes MPD-Hist/siARN à différents N/P.

De plus, des tests de stabilité en présence de sérum et de polymères polyanioniques ont été réalisés. La stabilité en présence de sérum a été étudiée en préparant tout d'abord, des complexes dans HBG ayant des N/P de 10 et 40. À différents intervalles de temps, 20 μ L de la solution ont été prélevés et stockés à -20°C . Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 54A). En contrôle, la même expérience a été réalisée avec du siARN nu. Les résultats montrent qu'après 2 heures d'incubation, les complexes ayant un N/P de 40 permettent une protection totale du siARN alors qu'avec le ratio N/P de 10, une partie du siARN n'est plus complexée (flèches rouges). De même, en présence d'un compétiteur anionique, une décomplexation du siARN est visible à partir d'un ratio S/P (ratio molaire entre les groupements sulfate du dextran et les groupement phosphate du siARN) de 3 lorsque le ratio N/P est de 10 alors qu'avec le ratio N/P plus élevé, une protection complète est observée. Ces résultats permettent d'affirmer que des ratios N/P plus élevés que 2 (vus en électrophorèse) sont requis pour assurer une protection totale du siARN en milieu biologique.

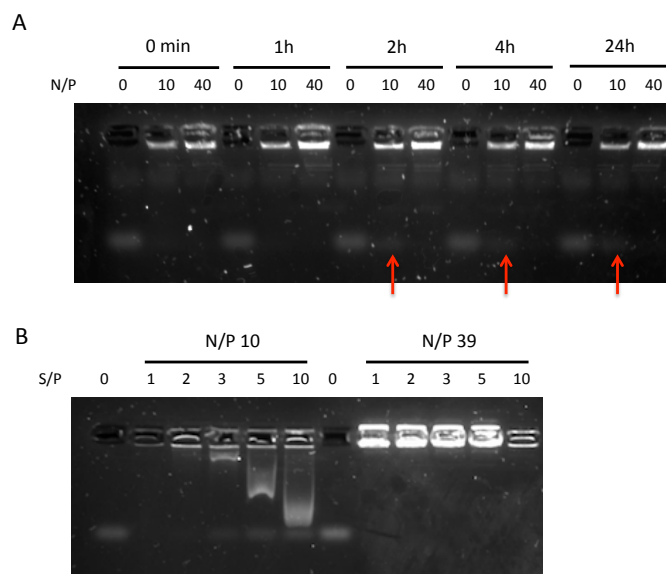


Figure 54: A. Efficacité de complexation des complexes MPD-Hist/siARN à N/P de 10 et 40 en présence de 10% de sérum à plusieurs temps d'incubation à 37°C. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose dans le tampon T-A. B. Complexes MPD-Hist/siARN à N/P de 10 et 40 mis en présence avec plusieurs concentrations de sulfate de dextran pendant 2h à température ambiante. S/P représente le ratio molaire entre les groupements sulfate du dextran et les groupements phosphates du siARN. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose dans le tampon T-A.

IV.3.3 Internalisation des complexes micelle/siARN

L'internalisation des complexes dans les cellules a été étudiée par microscopie. Après formation des complexes entre un siARN-Cy5 fluorescent et la micelle, ces derniers sont incubés avec les cellules A549-Luc. La microscopie à épifluorescence a montré que le siARN-Cy5 était capable de pénétrer efficacement dans les cellules *via* le vecteur (Figure 55).

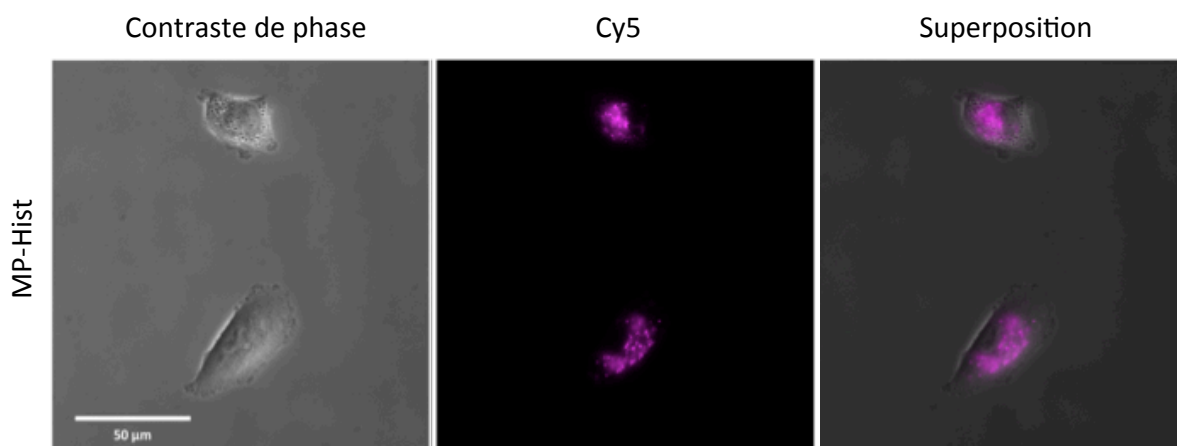


Figure 55 : Internalisation du siARN-Cy5 par les micelles (MP-Hist) dans les cellules A549-Luc après 24h de transfection. Images obtenues suite à l'observation au microscope à fluorescence en utilisant le filtre du Cy5 (620 nm). Echelle : 50 μm.

IV.4 Étude du mécanisme de relargage du siARN

La transfection de siARN fait intervenir deux étapes clefs. Tout d'abord, le vecteur doit permettre l'internalisation du siARN dans la cellule. Nous avons vu précédemment que le vecteur était capable : 1) de complexer le siARN, 2) de le protéger et de masquer les charges négatives, et 3) de permettre une internalisation efficace. Cependant, l'internalisation n'est pas suffisante. En effet, pour obtenir une inhibition du gène ciblé, il est nécessaire que le complexe puisse sortir de l'endosome afin de rejoindre son site d'action : le cytoplasme. Plusieurs stratégies ont été décrites dans la littérature et parmi elles, on retrouve notamment l'utilisation de groupements chimiques comme l'histidine, comportant des pKa favorables, conduisant à un effet « éponge à protons ».^{29,43}

Une fois une particule internalisée *via* endocytose, l'endosome va être acidifié pour être mûré en lysosome. Pour cela, il transporte par le biais d'une pompe ATPase un flux de protons vers l'intérieur de l'endosome suivi d'une entrée passive des ions chlorures. L'effet éponge à proton consiste à utiliser des vecteurs capables de capter les protons qui entrent dans l'endosome ce qui va empêcher le phénomène d'acidification. En réponse, l'endosome va continuer à transférer des protons toujours accompagnés d'un flux d'ions chlorure provoquant une augmentation de la pression osmotique aboutissant à une entrée massive d'eau dans les endosomes ; il en résulte l'éclatement de ce dernier (Figure 56).

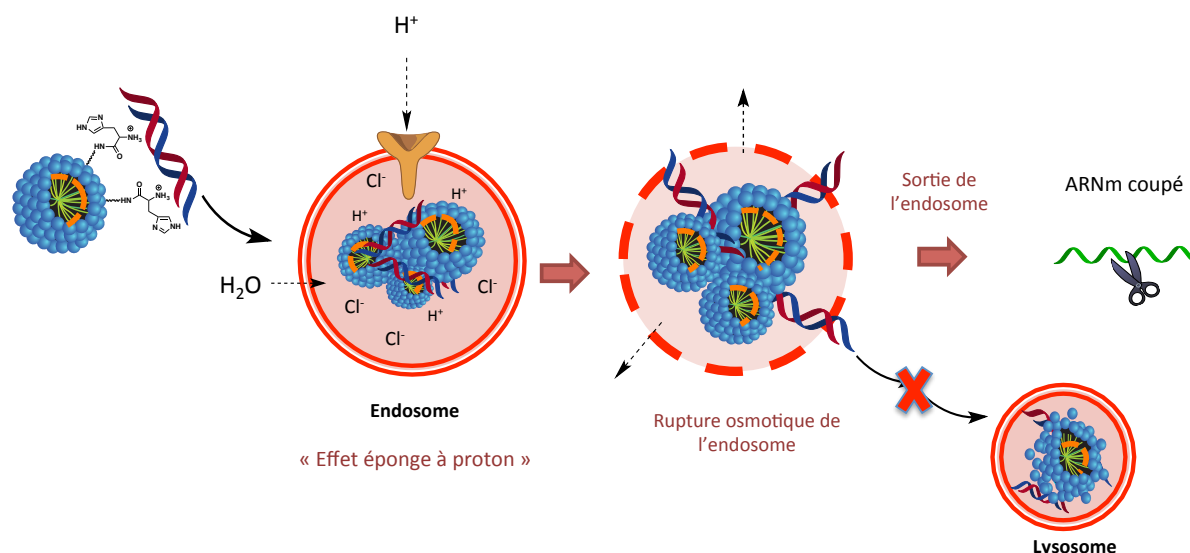


Figure 56: Mécanisme du phénomène éponge à protons.

Afin d'évaluer l'effet « éponge à protons » de notre système de délivrance, nous avons réalisé tout d'abord des titrations par pH-métrie pour s'assurer que notre composé présentait bien un pKa favorable. Puis, nous avons réalisé une expérience de transfection en ajoutant un

inhibiteur d'acidification endosomale afin de voir si l'efficacité s'en trouverait réduite. Enfin, nous avons étudié la taille des complexes formés à différents pH.

pH-métrie

Les courbes de titration du monomère ainsi que celle du composé dialysé MPD-Hist ont été déterminées par pH-métrie (Figure 57). La courbe de titration du monomère dans le méthanol montre deux sauts de pH. Le monomère induit un effet tampon dans la plage de pH présente dans l'endosome (de 4 à 6). 0,5 équivalent de NaOH par amine sont nécessaires pour abaisser le pH de la solution de 4 à 6. En comparaison, la courbe de titration dans l'eau de MPD-Hist présente une plage étendue de tampon de pH suivi d'un seul saut de pH. La formulation en micelle permet donc d'augmenter cette zone de tampon par deux. En effet, 1 équivalent de NaOH est maintenant requis pour abaisser le pH de deux unités. Cette propriété s'explique par le fait que les micelles polymérisées adoptent une conformation condensée. Ainsi, les amines primaires sont plus proches les unes des autres entraînant une augmentation de la répulsion électrostatique et une diminution de la valeur du pKa.

Cette expérience confirme donc l'intérêt du pKa de l'imidazole et permet de montrer encore une fois l'importance de la forme micellaire.

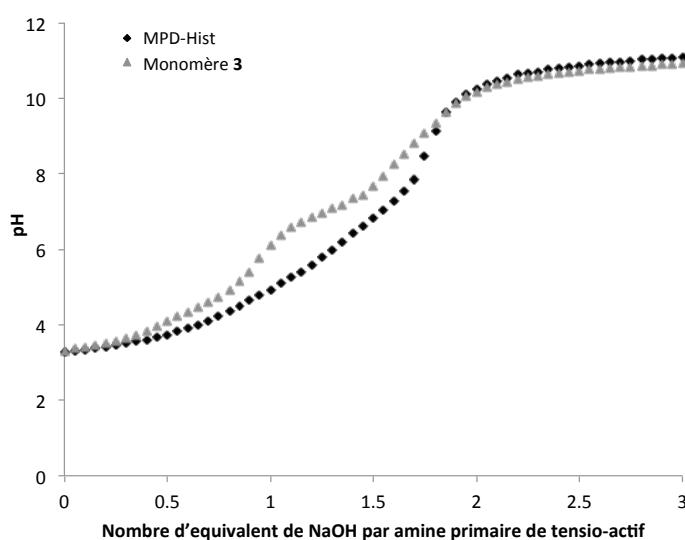


Figure 57: Courbes de titration du monomère (triangle) et de MPD-Hist (losange) obtenues par pH-métrie.

Bafilomycine A1

La bafilomycine A1 est un antibiotique capable d'inhiber spécifiquement les pompes à protons de type H^+ -ATPase (V-ATPase).^{44,45} Ces pompes ATPase sont responsables, entre autres, de l'acidification des compartiments endosomaux. Cet antibiotique permet donc d'empêcher l'acidification endosomale.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité biologique de délivrance de notre composé reposerait principalement sur son pouvoir tampon, des expériences de transfection sur les cellules A549-Luc ont été réalisées en utilisant 175 nM de bafilomycine A1 et 10 nM de siARN. Les résultats représentés sur la Figure 58A montrent une diminution significative de l'inhibition spécifique quand la transfection est réalisée en présence de cet inhibiteur. Ces expériences mettent donc en évidence que l'acidification des endosomes par le flux de proton joue un rôle important dans le mécanisme de libération de la micelle-histidine dans le cytoplasme. La protonation de l'imidazole permet donc sans doute un effet « éponge à protons » qui conduit à une augmentation du relargage cytosolique du siARN et en conséquence à une amélioration de l'inhibition du gène.⁴⁶

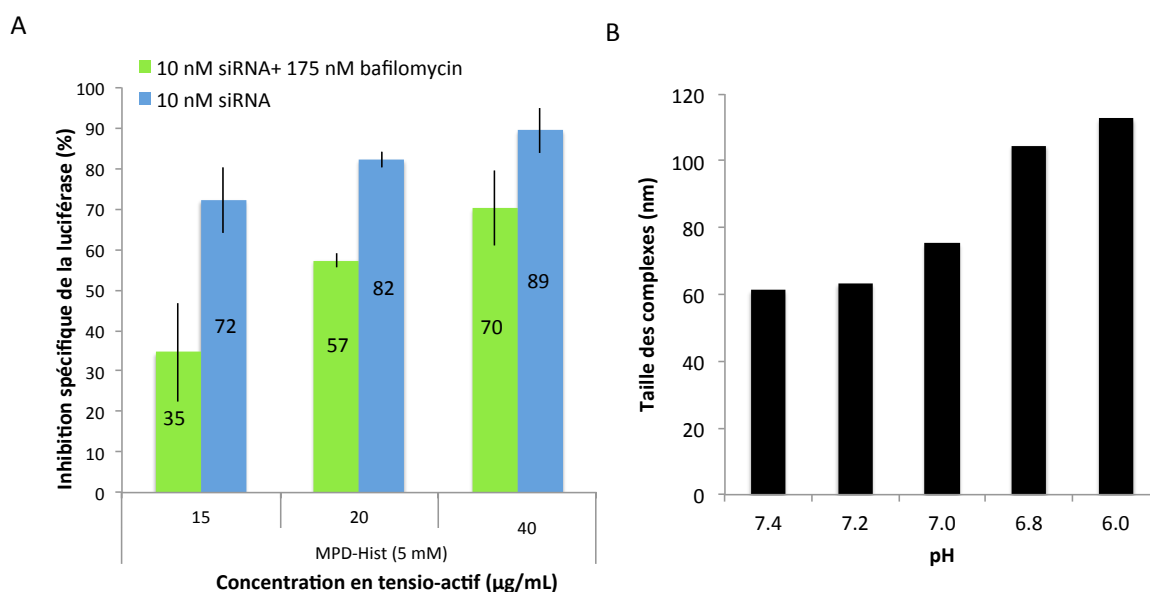


Figure 58: A. Effet de la bafilomycine A1 sur l'efficacité de transfection sur les cellules A549-Luc des MPD-Hist après 48h. B. Evolution de la taille des complexes MPD-Hist/siARN (N/P=39) après ajout progressif d'acide.

Cependant il est important de noter que dans le cas des polymères ayant ces mêmes capacités tampons tels que les dendrimères ou la polyéthylénimines, une augmentation du volume de la particule a également été observée lorsque le pH diminuait.⁴⁷ Dans notre cas, il est également

possible que l'acidification permette de conduire à une augmentation du volume des micelles, pouvant entraîner ainsi une déstabilisation supplémentaire des membranes de l'endosome.

A pH neutre (7,4), les complexes ont une taille approximative de 60 nm de diamètre. Quand on diminue le pH d'une unité par acidification, la taille de ce dernier double (de 60 nm à 110 nm), ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la protonation des groupements histidines menant à une répulsion des charges plus importante (Figure 58B). Dans ce cas, moins de micelles sont nécessaires à la complexation du siARN entraînant un relargage de l'excès de micelles.

La rupture de l'endosome pourrait ainsi être lié aux deux phénomènes à savoir l'expansion micellaire et l'effet « éponge à protons » induit par la tête histidine.

V. Caractérisation du composé actif

V.1 Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)

Principe et méthode

Afin de caractériser plus amplement nos vecteurs, il est important de déterminer la concentration micellaire critique. Comme décrit dans le chapitre I, les micelles sont composées de surfactants ayant la capacité de s'auto-arranger dans les milieux aqueux. Cependant ce réarrangement n'est possible que si la concentration en tensio-actif est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). En effet, en dessous de cette valeur, les amphiphiles vont préférer se comporter de façon monomoléculaire. Parmi les différentes approches existantes pour mesurer cette caractéristique, nous avons choisi la méthode de l'encapsulation du pyrène.⁴⁸

En fonction de l'environnement du pyrène, son spectre d'émission va varier. Parmi les pics de fluorescence que présente le pyrène, les pics à 373 et à 383 nm reflètent les changements environnementaux (Figure 59). Si le pyrène est encapsulé dans les micelles, le pic à 383 nm subira une augmentation en intensité puisqu'il se trouvera dans un environnement hydrophobe. En revanche, si les micelles ne sont pas formées, le pyrène se retrouve en milieu aqueux provoquant une diminution de l'intensité de ce pic. Pour déterminer la CMC, il faut alors mesurer le ratio I_{373}/I_{383} pour une gamme de concentrations en tensio-actif, puis tracer ces ratios en fonction du logarithme (log) des concentrations.

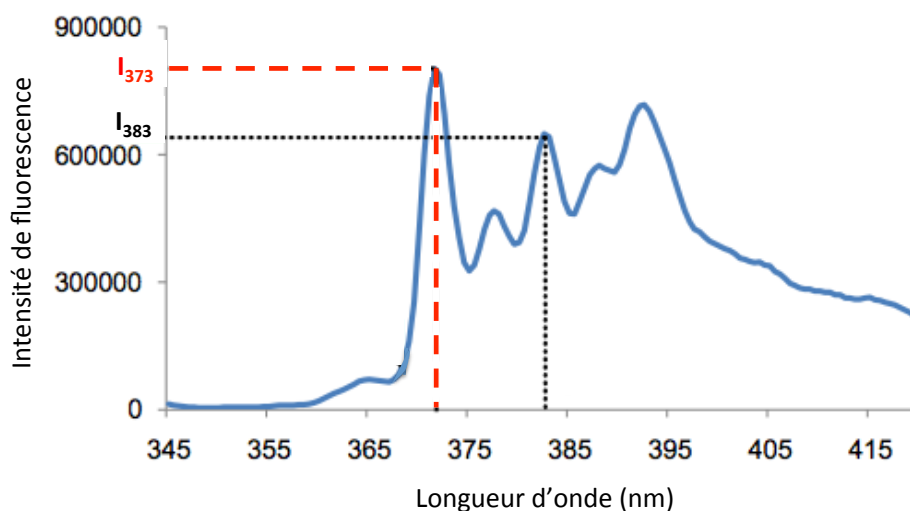


Figure 59: Spectre d'émission du pyrène pour la détermination de la CMC

Mesure des CMC

Une gamme de solutions à différentes concentrations en composé **3** a été réalisée dans l'eau. À chacune de ces solutions, 1 μL de pyrène à 1 mM dissout dans du DMSO a été ajouté. Le spectre d'émission du pyrène a ensuite été enregistré en utilisant comme longueur d'onde d'excitation 335 nm. En reportant les différents ratios I_{373}/I_{383} obtenus en fonction du logarithme de la concentration, on remarque un point de rupture entre les deux demi-droites. Cette intersection permet de déterminer la CMC. En résolvant l'équation mathématique, on en conclut que la concentration micellaire de MNP-Hist (micelle non polymérisée) est de 0,1 mM ce qui est relativement élevé (Figure 60A). En comparaison, la même expérience a été réalisée avec la micelle polymérisée (Figure 60B). La CMC de MP-Hist est de 0,7 mM. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que la polymérisation des lipides ne permet pas une inclusion du pyrène efficace. En effet, la mesure de la CMC représente la concentration minimale d'amphiphiles à laquelle les monomères commencent à interagir avec le pyrène hydrophobe. Dans le système polymérisé, la concentration en monomère étant drastiquement réduite par rapport à MNP-Hist, la CMC apparaît plus grande, reflétant indirectement la conversion partielle des monomères libres, ce qui corrobore les résultats obtenus en RMN-DOSY.

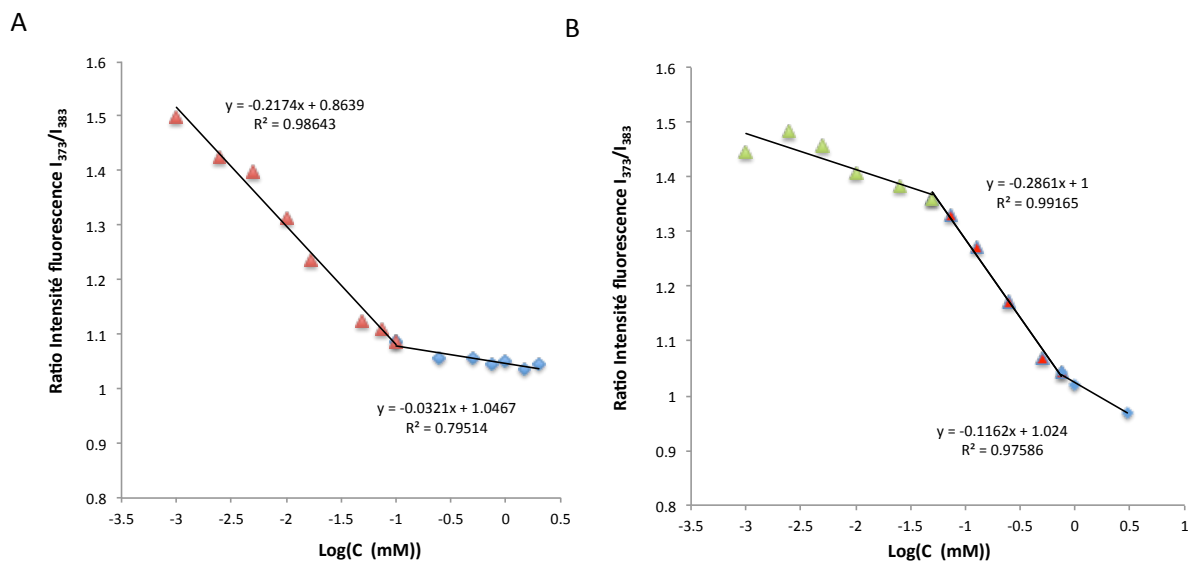


Figure 60: Détermination de la CMC par la méthode d'inclusion du pyrène : A. du monomère 3 dans l'eau. B. de MP-Hist dans l'eau.

V.2 Caractérisation par Microscopie Electronique à Transmission (MET)

La formation et la taille des micelles histidines observées en DLS ont été confirmées par microscopie électronique à transmission. Des images d'objets sphériques, de l'ordre de grandeur du nanomètre, concordant avec une structure micellaire, ont été observées (Figure 61A). Les complexes formés avec le siARN sont de tailles plus importantes mais toujours inférieures à 100 nm (Figure 61B).

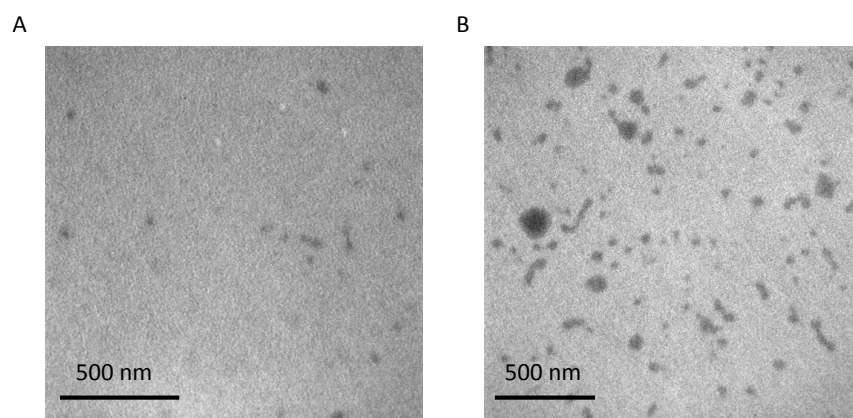


Figure 61: A. Image représentant les MPD-Hist dans HBG obtenue par MET. Echelle de l'image: 500 nm. B. Image représentant les complexes micelle/siARN dans HBG obtenue par MET. Echelle de l'image: 500 nm.

V.3 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge de surface des particules. Cette mesure permet de comprendre les causes d'agrégation et ainsi de savoir si les particules sont stables dans le milieu. Des mesures de potentiel zêta ont été réalisées avec la solution mère de MPD-Hist dans l'eau, la micelle diluée dans une solution HBG et les complexes micelles/siARN actifs en biologie (N/P 39).

On constate premièrement que la solution de micelles chlorhydrates possède un potentiel zêta supérieur à 30 mV ce qui signifie qu'elles sont stables dans l'eau (Figure 62A). En effet, même après des jours de stockage, les micelles restent des objets dissociés les uns des autres. Lorsqu'on dilue par 10 les micelles dans HBG, le potentiel zêta chute à 10 mV (Figure 62B). La base HEPES-Na du tampon HBG neutralisent en parti les charges cationiques présent à la surface de la particule. Cette mesure indique que les micelles ne sont pas très stables dans ce tampon, elles agrègent avec le temps conduisant à une augmentation de la taille. Enfin, on constate que lorsque le siARN est complexé avec la micelle, le potentiel zêta diminue encore jusqu'à atteindre 5 mV (Figure 62C). Les complexes actifs *in vitro* restent donc légèrement cationiques.

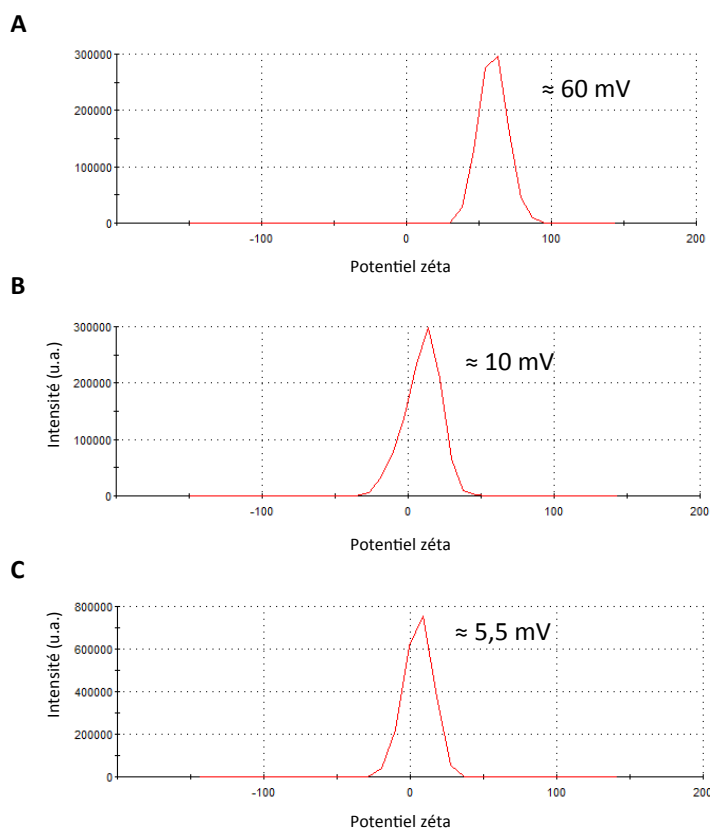


Figure 62 : A. Potentiel zêta de MPD-Hist dans l'eau, B. Potentiel zêta de MPD-Hist dans HBG (40 mM), c. Potentiel zêta des complexes MPD-Hits/siARN (N/P = 39) dans HBG.

VI. Conclusion et perspectives

La synthèse de nouvelles molécules amphiphiles, contenant des acides aminés naturels ou synthétiques, a permis d'obtenir une nouvelle génération de micelles polydiacétyléniques. Parmi ces structures, un des composés s'est démarqué par son efficacité importante en délivrance de siARN. En effet, après optimisation de plusieurs paramètres physiques et biologiques, le composé actif MP-Hist a permis l'extinction de l'expression de la luciférase à 80% tout en conservant une faible toxicité. L'auto-assemblage suivi de la polymérisation des micelles ont été caractérisés par plusieurs techniques telles que la DLS, la microscopie électronique ou encore la RMN-DOSY. L'étude portée sur la polymérisation a démontré que celle-ci était un outil puissant pour stabiliser les micelles mais également pour réduire la toxicité intrinsèque du vecteur due aux monomères. Enfin, il a été montré que le groupement imidazole présent sur la tête polaire du composé était capable d'agir comme une « éponge à protons », permettant ainsi un relargage plus efficace du siARN dans le cytoplasme.

Ces objets, petits et fonctionnalisables, présentent donc de nombreux avantages qui pourraient convenir à d'autres applications. En effet, ces nanoparticules possède également un coeur hydrophobe capable d'accueillir de petites molécules notamment des anticancéreux. Ainsi dans un second temps, nous avons étudié la co-délivrance d'un siARN et d'un anticancéreux à partir des micelles polydiacétyléniques.

Références

- (1) Helene, C.; Thuong, N. T.; Harel, A. Control of Gene Expression by Triple Helix-Forming Oligonucleotides. *The Antigene Strategya. Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *660* (1), 27–36.
- (2) Offensperger, W. B.; Offensperger, S.; Blum, H. E. Antisense Therapy of Hepatitis B Virus Infection: In Vivo Analyses in the Duck Hepatitis B Virus Model. *Methods Mol. Med.* **1996**, *1*, 143–158.
- (3) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811.
- (4) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494–498.
- (5) McCaffrey, A. P.; Meuse, L.; Pham, T.-T. T.; Conklin, D. S.; Hannon, G. J.; Kay, M. A. RNA Interference in Adult Mice. *Nature* **2002**, *418* (6893), 38–39.
- (6) Wang, J.; Lu, Z.; Wientjes, M. G.; Au, J. L.-S. Delivery of SiRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J.* **2010**, *12* (4), 492–503.
- (7) Mehrotra, N.; Tripathi, R. M. Short Interfering RNA Therapeutics: Nanocarriers, Prospects and Limitations. *IET Nanobiotechnol.* **2015**, *9* (6), 386–395.
- (8) Agrawal, N.; Dasaradhi, P. V. N.; Mohammed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R. K.; Mukherjee, S. K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67* (4), 657–685.
- (9) Bertrand, J.-R.; Pottier, M.; Vekris, A.; Opolon, P.; Maksimenko, A.; Malvy, C. Comparison of Antisense Oligonucleotides and SiRNAs in Cell Culture and in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296* (4), 1000–1004.
- (10) Reischl, D.; Zimmer, A. Drug Delivery of SiRNA Therapeutics: Potentials and Limits of Nanosystems. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2009**, *5* (1), 8–20.
- (11) Shukla, S.; Sumaria, C. S.; Pradeepkumar, P. I. Exploring Chemical Modifications for SiRNA Therapeutics: A Structural and Functional Outlook. *ChemMedChem* **2010**, *5* (3), 328–349.
- (12) Bramsen, J. B.; Kjems, J. Development of Therapeutic-Grade Small Interfering RNAs by Chemical Engineering. *Front. Genet.* **2012**, *3*.
- (13) De Paula, D.; Bentley, M. V. L. B.; Mahato, R. I. Hydrophobization and Bioconjugation for Enhanced SiRNA Delivery and Targeting. *RNA N. Y. N* **2007**, *13* (4), 431–456.
- (14) Jackson, A. L.; Burchard, J.; Leake, D.; Reynolds, A.; Schelter, J.; Guo, J.; Johnson, J. M.; Lim, L.; Karpilow, J.; Nichols, K.; Marshall, W.; Khvorova, A.; Linsley, P. S. Position-Specific Chemical Modification of SiRNAs Reduces “off-Target” Transcript Silencing. *RNA N. Y. N* **2006**, *12* (7), 1197–1205.
- (15) Judge, A. D.; Bola, G.; Lee, A. C. H.; MacLachlan, I. Design of Noninflammatory Synthetic SiRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Mol. Ther.* **2006**, *13* (3), 494–505.
- (16) Allerson, C. R.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Prakash, T. P.; Naik, N.; Berdeja, A.; Wanders, L.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E.; Bhat, B. Fully 2'-Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Potency and Stability Compared to Unmodified Small Interfering RNA. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 901–904.

- (17) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.-P. Therapeutic Silencing of an Endogenous Gene by Systemic Administration of Modified SiRNAs. *Nature* **2004**, *432* (7014), 173–178.
- (18) Nothisen, M.; Kotera, M.; Voirin, E.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P. Cationic SiRNAs Provide Carrier-Free Gene Silencing in Animal Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (49), 17730–17731.
- (19) Kanasty, R.; Dorkin, J. R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery Materials for SiRNA Therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 967–977.
- (20) Gomes-da-Silva, L. C.; Fonseca, N. A.; Moura, V.; Pedroso de Lima, M. C.; Simões, S.; Moreira, J. N. Lipid-Based Nanoparticles for SiRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1163–1171.
- (21) Wagner, E. Chapter Eight - Polymers for Nucleic Acid Transfer—An Overview. In *Advances in Genetics*; Leaf Huang, D. L. and E. W., Ed.; Nonviral Vectors for Gene Therapy Lipid- and Polymer-based Gene Transfer; Academic Press, 2014; Vol. 88, pp 231–261.
- (22) de Fougerolles, A.; Vornlocher, H.-P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. Interfering with Disease: A Progress Report on SiRNA-Based Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (6), 443–453.
- (23) Ragelle, H.; Vandermeulen, G.; Préat, V. Chitosan-Based SiRNA Delivery Systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2013**, *172* (1), 207–218.
- (24) Katas, H.; Alpar, H. O. Development and Characterisation of Chitosan Nanoparticles for SiRNA Delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2006**, *115* (2), 216–225.
- (25) Alabi, C.; Vegas, A.; Anderson, D. Attacking the Genome: Emerging SiRNA Nanocarriers from Concept to Clinic. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12* (4), 427–433.
- (26) O'Mahony, A. M.; Ogier, J.; Darcy, R.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. Cationic and PEGylated Amphiphilic Cyclodextrins: Co-Formulation Opportunities for Neuronal SiRNA Delivery. *PLoS One* **2013**, *8* (6), e66413.
- (27) Tiwari, G.; Tiwari, R.; Rai, A. K. Cyclodextrins in Delivery Systems: Applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2010**, *2* (2), 72–79.
- (28) Bonnet, M.-E.; Erbacher, P.; Bolcato-Bellemin, A.-L. Systemic Delivery of DNA or SiRNA Mediated by Linear Polyethylenimine (L-PEI) Does Not Induce an Inflammatory Response. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (12), 2972–2982.
- (29) Neuberg, P.; Kichler, A. Recent Developments in Nucleic Acid Delivery with Polyethylenimines. *Adv. Genet.* **2014**, *88*, 263–288.
- (30) Felgner, P. L.; Barenholz, Y.; Behr, J. P.; Cheng, S. H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J. A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A. R.; Wagner, E.; Wu, G. Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems. *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8* (5), 511–512.
- (31) Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. Drug Delivery and Imaging with Polydiacetylene Micelles. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2012**, *18* (2), 400–408.
- (32) Gravel, E.; Thézé, B.; Jacques, I.; Anilkumar, P.; Gombert, K.; Ducongé, F.; Doris, E. Cellular Uptake and Trafficking of Polydiacetylene Micelles. *Nanoscale* **2013**, *5* (5), 1955–1960.
- (33) Morin, E.; Nothisen, M.; Wagner, A.; Remy, J.-S. Cationic Polydiacetylene Micelles for Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1916–1923.

- (34) Schneider, S.; Ftouni, H.; Niu, S.; Schmitt, M.; Simonin, F.; Bihel, F. Rapid and Scalable Synthesis of Innovative Unnatural α,β or γ -Amino Acids Functionalized with Tertiary Amines on Their Side-Chains. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (25), 7020–7026.
- (35) Morin, E.; Guenet, J.-M.; Díaz, D. D.; Remy, J.-S.; Wagner, A. Fine-Tuning the Morphology of Self-Assembled Nanostructures of Propargyl Ammonium-Based Amphiphiles. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (39), 12495–12500.
- (36) Daly, S. M.; Heffernan, L. A.; Barger, W. R.; Shenoy, D. K. Photopolymerization of Mixed Monolayers and Black Lipid Membranes Containing Gramicidin A and Diacetylenic Phospholipids. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2006**, *22* (3), 1215–1222.
- (37) Temprana, C. F.; Duarte, E. L.; Taira, M. C.; Lamy, M. T.; del Valle Alonso, S. Structural Characterization of Photopolymerizable Binary Liposomes Containing Diacetylenic and Saturated Phospholipids. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2010**, *26* (12), 10084–10092.
- (38) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A. Chemical Vectors for Gene Delivery: A Current Review on Polymers, Peptides and Lipids Containing Histidine or Imidazole as Nucleic Acids Carriers. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 166–178.
- (39) Gonçalves, C.; Berchel, M.; Gosselin, M.-P.; Malard, V.; Cheradame, H.; Jaffrès, P.-A.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Lipopolyplexes Comprising Imidazole/Imidazolium Lipophosphoramidate, Histidinylated Polyethyleneimine and SiRNA as Efficient Formulation for SiRNA Transfection. *Int. J. Pharm.* **2014**, *460* (1–2), 264–272.
- (40) Langlet-Bertin, B.; Leborgne, C.; Scherman, D.; Bechinger, B.; Mason, A. J.; Kichler, A. Design and Evaluation of Histidine-Rich Amphipathic Peptides for SiRNA Delivery. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (7), 1426–1436.
- (41) Neuberg, P.; Perino, A.; Morin-Picardat, E.; Anton, N.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S.; Remy, J.-S.; Wagner, A. Photopolymerized Micelles of Diacetylene Amphiphile: Physical Characterization and Cell Delivery Properties. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (58), 11595–11598.
- (42) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2000**, *65* (1–2), 271–284.
- (43) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (16), 7297–7301.
- (44) Yoshimori, T.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y.; Futai, M.; Tashiro, Y. Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H(+)-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (26), 17707–17712.
- (45) Huss, M.; Vitavska, O.; Albertmelcher, A.; Bockelmann, S.; Nardmann, C.; Tabke, K.; Tiburcy, F.; Wieczorek, H. Vacuolar H⁺-ATPases: Intra- and Intermolecular Interactions. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90* (9), 688–695.
- (46) Lächelt, U.; Kos, P.; Mickler, F. M.; Herrmann, A.; Salcher, E. E.; Rödl, W.; Badgular, N.; Bräuchle, C.; Wagner, E. Fine-Tuning of Proton Sponges by Precise Diaminoethanes and Histidines in PDNA Polyplexes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10* (1), 35–44.
- (47) Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C. In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (6), 703–714.

- (48) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2039–2044.

Chapitre III

-

*Co-délivrance d'un siARN et d'un
anticancéreux hydrophobe: Evaluation in vitro
et in vivo*

I. Thérapie combinatoire pour le traitement du cancer

I.1 Mécanisme de résistance à la chimiothérapie

Responsable de 8,8 millions de décès en 2015, le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde, constituant ainsi un enjeu primordial dans le domaine médical (site de l'OMS, <http://www.who.int>). Actuellement, les stratégies principales visant à traiter les cancers incluent la radiothérapie, la chirurgie et la chimiothérapie. Généralement, la radiothérapie et la chirurgie sont utilisées pour le traitement des tumeurs locales alors que les cancers métastasés nécessitent l'utilisation de la chimiothérapie. Celle-ci est donc devenue l'une des stratégies les plus utilisées en clinique.

Cependant, due à leur nature hétérogène, les cancers présentent souvent des résistances aux thérapies classiques, principales causes d'échec des chimiothérapies.^{1,2} La résistance multiple aux anticancéreux (MDR : *multidrug resistance*) représente la capacité des cellules tumorales à résister à des anticancéreux de familles et de modes d'actions divers.

Ce phénomène a été observé pour la première fois sur des lignées tumorales animales exposées de manière continue et prolongée à des quantités croissantes de cytostatique. Suite à cette exposition, les cellules étaient devenues naturellement résistantes à d'autres cytostatiques.³ Un mécanisme commun de résistance a pu être élucidé, par Biedler et Riehm.⁴ Cette multi-résistance serait due principalement à l'accroissement des pompes d'expulsion des drogues et plus précisément à l'expression d'une glycoprotéine de membrane (P-gp) responsable du transport transmembranaire.^{5,6} En effet, l'exposition prolongée des cellules à un anticancéreux altère les cibles intracellulaires et provoque la surexpression des gènes reliés au phénomène de résistance et anti-apoptotiques, à l'origine de ces protéines MDR. Le développement de cette MDR conduit ensuite à une augmentation de l'expulsion des drogues, ce qui limite les effets liés au cytotoxique, rendant le traitement inefficace (Figure 63). La suppression des gènes liés à ces mécanismes de résistance devrait donc permettre d'augmenter la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses et ainsi d'améliorer l'efficacité du traitement.

Au cours des dernières années, la co-délivrance d'anticancéreux et de siRNA ou thérapie combinatoire a été reconnue comme étant une stratégie prometteuse. En effet, la combinaison des mécanismes de deux agents thérapeutiques a permis de contourner le mécanisme de

résistance mais également d'entraîner un effet anti-tumoral synergique.⁷⁻¹¹ Il a également été démontré que les effets secondaires étaient limités avec l'utilisation d'une thérapie combinatoire.¹²

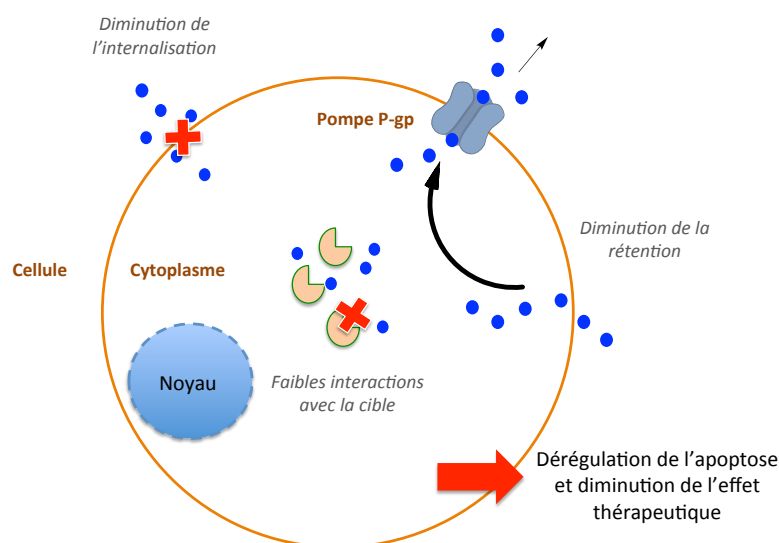


Figure 63: Schéma représentant le mécanisme de la résistance multiple dans les cellules cancéreuses.

I.2 Mécanisme d'action des siRNA en thérapie combinatoire

Afin d'obtenir les effets anti-tumoraux désirés, il est important de sélectionner un siRNA possédant le mécanisme d'action compatible avec l'effet attendu. La thérapie combinatoire fait intervenir une diversité importante de siRNA. Dans cette partie, nous allons donc brièvement lister les mécanismes des siRNA étudiés dans la littérature.¹³

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la surexpression de la protéine P-gp est en partie responsable du mécanisme de résistance. Naturellement, les chercheurs ont donc décidé d'utiliser des siRNA capables d'inhiber l'expression du gène associé à la production de ces pompes à efflux. Associé avec un anti-tumoral, cette combinaison a permis de renverser le phénomène MDR tout en entraînant un excellent effet thérapeutique.^{14,15} Il a aussi été envisagé dans la littérature d'associer ces anticancéreux avec des siRNA ciblant des gènes liés à la production de molécules anti-apoptotiques. En effet, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée indispensable à l'organisme sain. Dans les cellules tumorales, ce mécanisme est déficient conduisant au maintien de la croissance rapide de la tumeur. Ainsi, on peut avoir recours à des siARN ciblant les inhibiteurs d'apoptose (IAP : *inhibitors of apoptosis*) telle que la survivine, surexprimés dans les cellules tumorales. Cette stratégie a notamment permis de stopper la pousse tumorale mais également de rendre les cellules plus sensibles aux agents thérapeutiques.¹⁶ La voie de signalisation de Notch joue également un

rôle majeur dans la communication intercellulaire et dans le devenir des cellules. De récents résultats ont montré que dans tous les cancers, cette voie de signalisation était positivement dérégulée.¹⁷ Son inhibition à l'aide de siARN permet donc de supprimer la croissance des cellules tumorales et d'augmenter la sensibilité à la chimiothérapie.¹⁸ Un autre processus indispensable à la survie de la cellule est la division cellulaire. En général, les tumeurs surexpriment les enzymes responsables de la division cellulaire telle que la Polo-like-kinase 1 (PLK-1), afin d'accroître la prolifération cellulaire. Des siARN antiprolifératifs ont donc également été évalués afin de stopper cette prolifération.¹⁹ Enfin, on retrouve des stratégies basées sur l'inhibition du processus d'autophagie ou encore de la réplication de l'ADN.²⁰

I.3 Vecteurs appliqués à la co-délivrance de siARN et d'anticancéreux

Il existe deux stratégies pour co-délivrer un siARN avec un anti-tumoral simultanément. La première consiste à réaliser un co-traitement en injectant les agents thérapeutiques individuellement. La seconde, permet de co-délivrer ces agents thérapeutiques par le biais d'un vecteur unique.²² Cette stratégie permet d'une part un meilleur contrôle spatial et temporel et d'autre part une co-localisation des agents thérapeutiques. Pour cela, il est nécessaire que la nanoparticule puisse encapsuler mais également délivrer les principes actifs dans le site d'action désiré. Dans ce but, le développement de vecteurs tels que les liposomes, les nanoparticules inorganiques et les polymères, connaît un intérêt grandissant (Figure 64).²³⁻
²⁶ Dans cette partie, nous allons résumer les différents systèmes conçus pour la co-délivrance d'un siARN et d'un anti-tumoral.

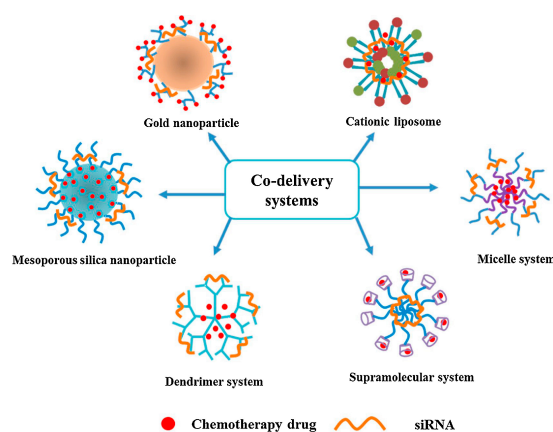


Figure 64 : Systèmes principaux adaptés à la co-délivrance de siARN et d'anti-cancéreux (d'après Wang et al. 2017).¹³

I.3.1 Les liposomes

Les liposomes sont très fréquemment utilisés pour la délivrance de siARN mais également pour l'encapsulation d'agents chémo-thérapeutiques. Facilement obtenus, ces lipides présentent de nombreux avantages pour la thérapie combinatoire.²⁷ Selon la charge de surface du liposome, le siARN se retrouve lié à la surface ou encapsulé à l'intérieur du cœur aqueux. Par ailleurs, la solubilité de l'anti-tumoral détermine si la drogue sera dans la cavité aqueuse ou ancrée dans les bicouches lipidiques. De plus, ces vecteurs sont facilement fonctionnalisés ce qui permet de moduler les propriétés intrinsèques du liposome. Ainsi, des liposomes comportant des groupements PEGylés, pH-sensibles ou encore permettant un ciblage ont été développés. La PEGylation des lipides a permis, par exemple, de prolonger le temps de circulation des liposomes facilitant un ciblage passif *in vivo* afin de délivrer avec succès un siARN ciblant l'expression de BCL2, un régulateur apoptotique, avec du docetaxel (DTX, inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules) pour le traitement du cancer du poumon.²⁸ D'autre part, la construction de liposome comportant un chitosan carboxy-méthyl a, quant à elle, permis de délivrer de manière pH-sensible, *in vitro* et *in vivo*, un siARN thérapeutique accompagné de la sorafenib (inhibiteur multikinases) afin de traiter le cancer de l'estomac.²⁹ Enfin, l'utilisation de ligand dans le but de cibler des récepteurs surexprimés dans les cellules cancéreuses, a également fait ses preuves. Notamment, des études ont montré que des liposomes modifiés avec de l'acide folique, appelé couramment vitamine B9, permettaient de co-délivrer un siARN ciblant la protéine Bmi1, impliquée dans la division cellulaire et de la doxorubicine (inhibiteur de la topoisomérase II) en ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses surexprimant le récepteur des folates.³⁰ La combinaison des deux agents a permis une augmentation de l'effet thérapeutique comparé à l'utilisation des principes actifs individuellement. Les liposomes représentent donc un outil prometteur en oncologie.

I.3.2 Les polymères

Un autre système de co-délivrance très étudié, repose sur l'utilisation de polymères.^{26,31} Ces vecteurs peuvent facilement être modifiés, offrant ainsi une liberté au niveau de la taille de la particule mais également des propriétés d'encapsulation. Ils représentent donc une plateforme intéressante pour la délivrance de multiples agents thérapeutiques. Comparés aux liposomes, ces particules polymériques sont compactes. Elles peuvent dans certains cas permettre un meilleur contrôle du relargage des drogues.³² Ces vecteurs polymériques peuvent être classés

en trois catégories principales : les nanoparticules polymériques, les micelles polymériques et les dendrimères.

Nanoparticules polymériques

Des polymères biodégradables tels que l'acide polylactique (PLA : *poly(lactic acid)*) ou l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA : *poly(lactic-co-glycolic)*) sont en général utilisés pour la thérapie combinatoire.³³ Ce type de particules est surtout étudié pour la délivrance de siARN et d'un anti-tumoral hydrophobe. Deux modèles différents sont présents dans la littérature. Le premier consiste à piéger les molécules hydrophobes dans la matrice du polymère et à l'entourer d'un lipide ou d'un polymère cationique pour complexer le siARN. Par exemple, il a été montré sur les cellules du cancer du poumon A549 que la co-formulation de paclitaxel (PXL, inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules) avec un siARN ciblant la protéine STAT3 (facteur de transcription) *via* une nanoparticule de PLGA/PEI conduisait à une augmentation de la cytotoxicité induite sur les cellules.³⁴ Une autre méthode consiste à incorporer le siARN et la particule hydrophobe simultanément dans la matrice du polymère *via* une double émulsion. Notamment, Patil *et al.* ont encapsulé le PXL avec un siARN ciblant la protéine P-gp dans un copolymère PLGA/PEI par double émulsion et ont montré que le relargage se faisait de manière continue pendant plusieurs jours, entraînant un meilleur contrôle de la taille de la tumeur qu'avec le paclitaxel seul.³⁵

Micelles polymériques

Les micelles polymérisées formées à la fois de blocs de copolymères hydrophobes et hydrophiles (di- ou triblocs) sont les plus étudiées pour la co-délivrance de deux agents thérapeutiques différents.³¹ Elles sont généralement composées d'une partie cationique pour la complexation du siARN et d'une partie hydrophobe pour permettre la formation de micelles mais également l'encapsulation de drogues. Ces vecteurs ont permis la co-délivrance de siARN associés à diverses drogues tels que siPLK1/PXL³⁶ et siBCL2/DTX³⁷. Ces études ont montré une suppression totale de la croissance tumorale incluant un effet synergique en présence des deux agents thérapeutiques.

Dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules dont la taille dépend du nombre de branchements réalisés.^{38,39} Les dendrimères basés sur la poly(amidoamine) (PAMAM), la polylysine (PLL) et le PEI ont, tout d'abord, été étudiés pour la délivrance d'acides nucléiques et se sont révélés

être très efficaces. Au cours des dernières années, un dendrimère de PAMAM modifié, SuperFect a été commercialisé en tant qu'agent de transfection pour une application *in vitro*. Ces nanoparticules ont ensuite été développées pour la co-délivrance de siARN et de petites molécules anticancéreuses en les greffant sur la surface du dendrimères. Les premiers résultats prometteurs ont été obtenus avec la PLL fonctionnalisée avec de la doxorubicine et complexée par interaction électrostatique avec un siARN pour le ciblage du gène de la luciférase.⁴⁰

I.3.3 Particules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques ont également été exploitées pour la thérapie combinatoire. Elles possèdent des propriétés physico-chimiques uniques telles qu'une petite taille, une stabilité importante dans les milieux biologiques, une surface facilement fonctionnalisable et des propriétés optiques et magnétiques intéressantes. Ces vecteurs incluent les particules d'or⁴¹, de silice mésoporeuse⁴², de phosphate de calcium⁴³ ou encore des nanotubes de carbone¹⁹. La plupart de ces particules inorganiques ont montré un fort potentiel *in vitro* pour cette application. Cependant, l'efficacité et la toxicité de ces objets *in vivo* reste à prouver.

I.4 Conclusion et objectifs

En résumé, plusieurs types de nanovecteurs ont été développés dans le but de co-délivrer un siARN et un anticancéreux. Les avantages de ces vecteurs telles que la stabilité ou l'augmentation de l'index thérapeutique, ont été largement démontrés. Cependant, malgré les avancées réalisées sur ces systèmes, des problèmes persistent comme la complexité des vecteurs qui rend leur production à grande échelle compliquée ou bien leur sécurité d'emploi plus difficile à vérifier.

Au vu des résultats encourageant obtenus dans le chapitre II, nous avons souhaité évaluer le potentiel de nos micelles polydiacétyléniques cationiques à co-délivrer un siARN et un anticancéreux.

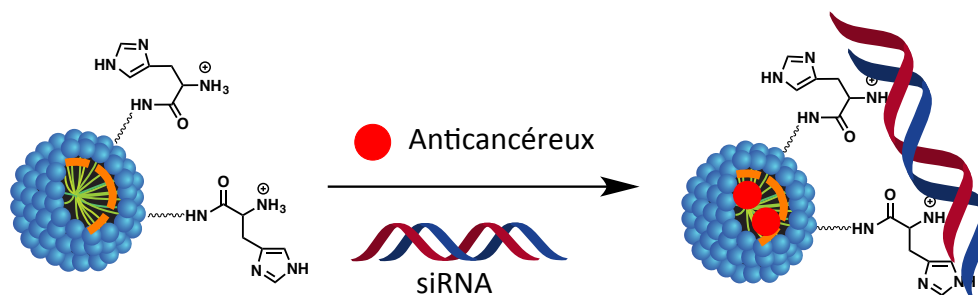


Figure 65 : Co-délivrance d'un siARN et d'un anticancéreux par MP-Hist.

Possédant un coeur hydrophobe et une surface cationique, le vecteur devrait être capable d'accueillir une molécule hydrophobe ainsi qu'un siARN d'intérêt thérapeutique (Figure 65). Cette nouvelle génération de vecteurs possède l'avantage d'être facilement synthétisée et formulée et permet également de conserver une petite taille lui permettant de réaliser un ciblage passif.

II. Vectorisation d'un siARN ayant une cible thérapeutique

Nous avons montré précédemment que les micelles diacétyléniques comportant des groupements histidines permettaient de délivrer de manière efficace un siARN modèle ciblant l'ARNm codant pour la luciférase. Pour la suite du projet, il a tout d'abord été nécessaire de vérifier si notre système était capable de délivrer un siARN d'intérêt thérapeutique c'est-à-dire un siARN ciblant un gène endogène impliqué dans une pathologie.

II.1 siARN ciblant la Polo-like kinase 1 (PLK-1)

Comme décrit précédemment, de nombreux siARN peuvent être utilisés pour la thérapie combinatoire. Dans notre cas, nous avons choisi un siARN anti-prolifératif ciblant l'expression du gène de la Polo-Like Kinase 1. Cette protéine joue un rôle clef lors de la division cellulaire. Elle permet la transition de la phase G2/M du cycle cellulaire et régule la cytokinèse. En effet, la PLK-1 permet la phosphorylation des cohésines libérant ainsi les chromosomes qui peuvent alors se décondenser (Figure 66).

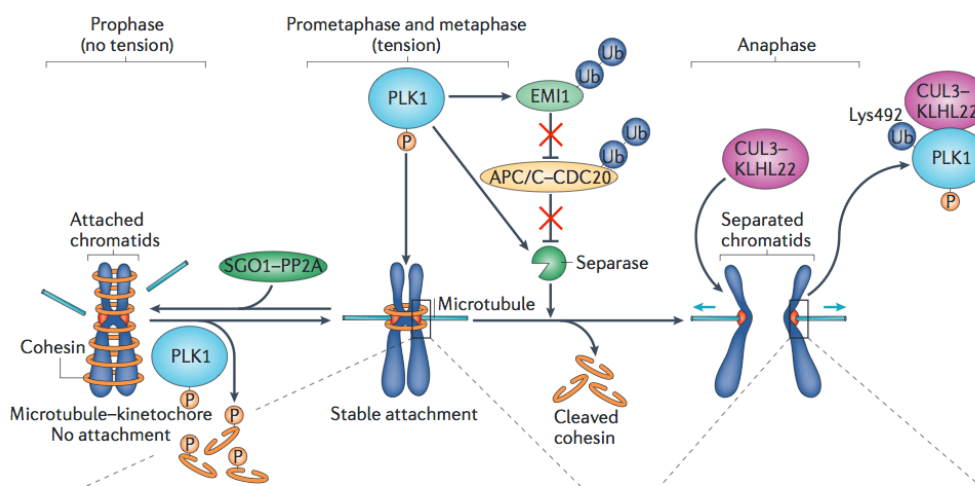


Figure 66: Mécanisme de la polo-like kinase 1 (d'après Sihem Zitouni et al. *Nature Reviews*, 2014).⁴⁴

L'augmentation de son expression est étroitement liée à la progression des tumeurs notamment dans les cancers du sein, de la prostate ou encore des ovaires et est souvent associé à de mauvais pronostic.⁴⁵ De récentes publications ont montré que l'inhibition de l'expression du gène PLK-1 entraînait une diminution de la viabilité cellulaire avec une induction d'apoptose et une défaillance au niveau du processus de la mitose, ce qui rend cette protéine attractive pour le traitement des cancers, où les cellules se divisent rapidement.⁴⁶

Actuellement, différents inhibiteurs de la PLK-1 sont étudiés cliniquement tel que Volasertib® qui est en phase III des essais cliniques. Des études précliniques ont également été menées avec des siARN ciblant l'ARNm codant pour la PLK-1.⁴⁷ De plus, des études ont montré que la combinaison de ce dernier avec un anticancéreux était prometteuse. En effet, associé par exemple au paclitaxel et à l'Herceptin, cette combinaison a permis un effet thérapeutique synergique tout en réduisant les principaux effets secondaires observés avec le traitement initial.⁴⁸

Dans le cadre de ces travaux, nous avons donc décidé de vectoriser un siARN anti-PLK-1 (siPLK-1) dont la séquence a déjà démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo*.

II.2 Transfection *in vitro*

Nous avons évalué l'efficacité biologique *in vitro* par des tests de cytotoxicité reliant indirectement la mort cellulaire à l'inhibition de la protéine. Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés au moyen d'un test MTT sur deux lignées cellulaires différentes : des cellules humaines cancéreuses issues de l'utérus (HeLa) et du sein (MDA-MB-231). Ce test permet une détection colorimétrique de l'activité mitochondriale donnant accès à la viabilité cellulaire. Le sel de tétrazolium MTT est réduit par la succinate déshydrogénase

mitochondriale des cellules vivantes en formazan, précipité violet quantifiable par spectroscopie visible.

Tout d'abord, les tests ont été réalisés sur les cellules HeLa, en utilisant une gamme de concentration en siARN séquence spécifique de l'ARNm codant pour la PLK-1 (siPLK1). Comme précédemment, un siARN contrôle a également été testé. La complexation des siARN a été réalisée en pré-incubant le siARN avec des quantités croissantes de MPD-Hist (1 mg/mL) dans le tampon HEPES glucose, conduisant à divers ratios N/P. Après 1 heure de maturation à température ambiante, ces derniers (MPD-Hist_{siPLK1}) sont ajoutés sur les cellules, préalablement ensemencées en plaque 96 puits. Les cellules sont incubées pendant 48 h à 37°C avant ajout du réactif MTT, puis incubées de nouveau pendant 2 h. La viabilité cellulaire est mesurée par dissolution dans du DMSO du formazan et lecture de l'absorbance à 570 nm. La viabilité cellulaire est exprimée par rapport à la viabilité des cellules non traitées. Les résultats montrent d'une part, que l'augmentation de la concentration en siPLK1 permet de diminuer de manière significative la viabilité cellulaire par mécanisme d'ARN interférence. D'autre part, on remarque que pour chaque concentration en siPLK1, l'augmentation du ratio N/P conduit également à une diminution de la viabilité cellulaire. Au-delà d'un ratio N/P de 5,6, une baisse de la viabilité cellulaire est visible pour le siCTL témoignant de la toxicité intrinsèque du vecteur sur cette lignée cellulaire. La différence de viabilité cellulaire observée entre les complexes siPLK1/micelle-PDA et siCTL/micelle-PDA reflète le taux d'inhibition spécifique de la protéine PLK-1. Une concentration minimale de 100 nM est requise pour atteindre 50 % d'inhibition (Figure 67). De plus, le ratio N/P de 5,6 semble optimal puisqu'il permet une inhibition spécifique de 60 % à 150 nM. Pour la suite, ce ratio N/P sera donc conservé. En comparant avec les résultats obtenus en transfection de siLuc (N/P de 39), des ratios N/P assez faibles semblent optimaux ici, sachant que la concentration en siARN est multiplié par 10. Ceci rejoint notre observation déjà faite dans les expériences d'inhibition de l'expression de la luciférase (Figure 42, chapitre II) à savoir plus la concentration en siARN est élevée, plus les ratios N/P faibles semblent optimaux.

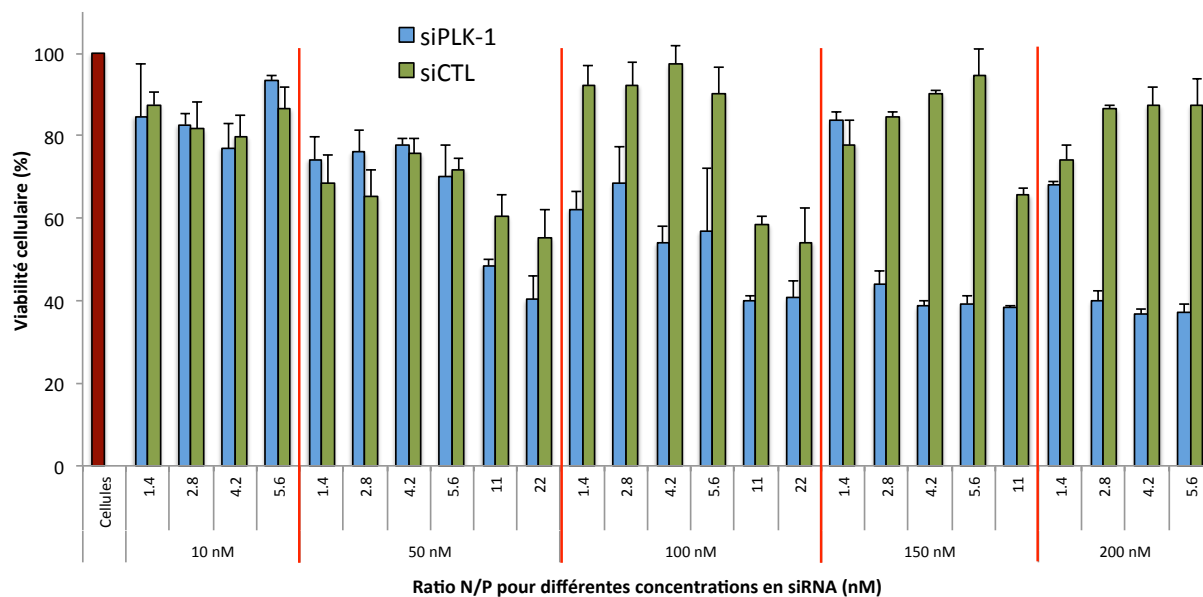


Figure 67 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec le vecteur MPD-Hist après 48h d'incubation sur les cellules HeLa. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN et différents ratios N/P. La viabilité a été mesurée par un test MTT. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

De la même manière, les tests ont été réalisés sur les MDA-MB-231. Des résultats similaires ont été obtenus. Cependant une concentration plus importante de siARN (200 nM) est requise pour obtenir une inhibition spécifique de 50 % (Figure 68). Ce résultat montre que les MDA-MB-231 sont plus difficilement transfectées que les cellules HeLa.

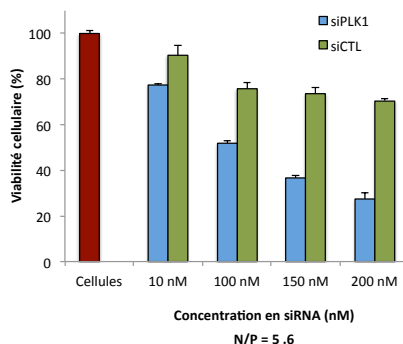


Figure 68 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec le vecteur MPD-Hist après 48h d'incubation sur les MDA-MB-231. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN et différents ratios N/P. Les résultats sont obtenus suite à un test MTT. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

En conclusion, ces résultats ont permis de démontrer l'efficacité de notre vecteur à délivrer un siARN inhibant un gène endogène qui a conduit à l'inhibition de la PLK-1, entraînant la mort cellulaire.

Condition retenue:

- Ratio N/P de 5,6 pour une concentration en siARN de 100 nM

Parallèlement et dans le cadre d'une collaboration, l'équipe du Dr. Massfelder² a testé ces vecteurs pour l'inhibition du gène endogène Lim-1 sur les cellules du cancer du rein 786-O (Figure 69). Après analyse en Q-PCR, les résultats ont montré que le vecteur était capable d'inhiber également l'expression de ce gène à 42 % en utilisant seulement 10 nM de siARN (N/P de 69). Ces résultats nous confirment que notre système est capable de délivrer efficacement différents siARN dans le cytoplasme.

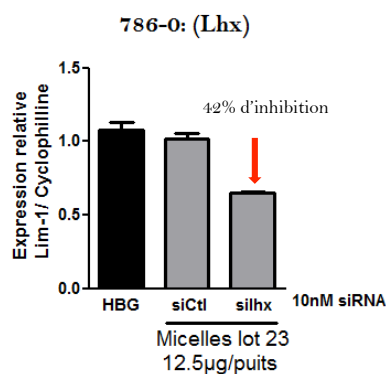


Figure 69 : Expression relative de la protéine Lim-1 obtenue par PCR après 48 h de transfection. Le graphique montre les cellules traitées avec le tampon HBG, les complexes siCTL/micelles et les complexes siLhx/micelle. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

II.3 Analyse par microscopie à fluorescence

Nous avons ensuite étudié les effets de l'inhibition de la PLK-1 sur la morphologie des cellules HeLa. L'expérience de transfection a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Après 48 h, les cellules ont été fixées avec du méthanol et le noyau coloré à l'aide d'une solution de Hoechst 33342 donnant une fluorescence bleue lorsqu'il est irradié à 350 nm. Les images obtenues par microscopie à fluorescence confirment les résultats obtenus en transfection *in vitro*. En effet, en présence de siPLK1, les noyaux se condensent et se fragmentent à partir de 100 nM, indiquant une apoptose importante, résultat de l'inhibition de la PLK-1 (Figure 70).

² Unité INSERM U1113, Strasbourg

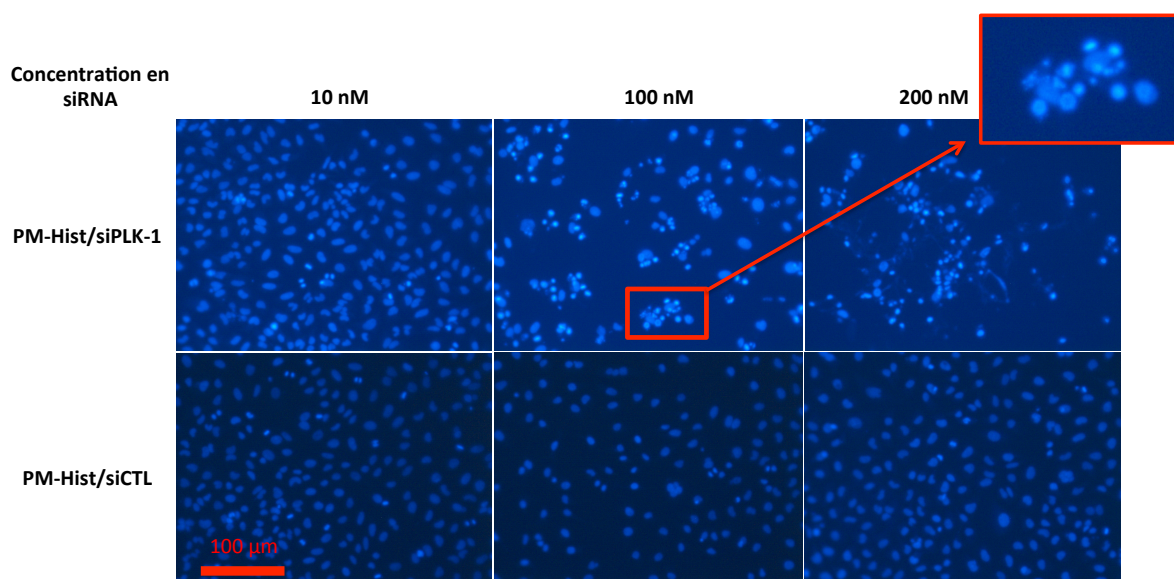


Figure 70: Images obtenues par microscopie à fluorescence des cellules HeLa incubées avec les complexes formés avec le siPLK1 et le siCTL. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 48 h en présence de trois concentrations en siARN. Coloration des noyaux par le Hoeschst. Observation réalisée avec un filtre DAPI. Echelle : 100 μ M.

A l'inverse, en présence du siCTL la densité cellulaire reste importante ce qui corrobore avec les résultats de viabilité cellulaire obtenus ci-dessus. Les noyaux sont normalement formés et ne laissent apparaître aucune fragmentation ou condensation.

III. Délivrance d'un anticancéreux

Depuis de nombreuses années, la délivrance d'anticancéreux se trouve face à d'importantes limites telles qu'une faible biodistribution, des solubilités restreintes ou encore l'apparition d'effets secondaires. Pour limiter ces problèmes, les chercheurs ont recours à des vecteurs qui permettent, après formulation, d'améliorer ces propriétés.

Notre objectif ici a été de voir si nos micelles étaient capables d'encapsuler et de délivrer un anticancéreux.

III.1 Choix et formulation de l'anticancéreux

En vertu du microenvironnement hydrophobe des micelles PDA, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'anticancéreux hydrophobes. De récents résultats ont montré que l'utilisation du siPLK1 permettait d'améliorer l'effet thérapeutique de la camptothécine (CPT) pour le traitement du cancer.⁴⁹ La CPT est un alcaloïde pentacyclique isolé de l'arbre

Camptotheca acuminata (Figure 71). Elle forme un complexe stable entre la topoisomérase I et le brin d'ADN, et inhibe ainsi la synthèse de l'ADN ce qui conduit à la mort cellulaire.⁵⁰

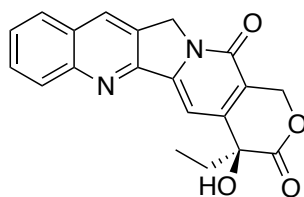


Figure 71 : Structure de la camptothécine.

De plus, récemment il a été montré que des micelles PDA étaient capables d'encapsuler la CPT tout en maintenant son activité anti-tumorale.⁵¹ Sur ce même modèle et en vue de démontrer la capacité des vecteurs MPD-Hist à co-délivrer plusieurs agents, nous avons encapsulé la CPT dans nos nanoparticules. Afin d'éviter une potentielle dégradation de l'anticancéreux sous irradiation UV, nous avons tout d'abord formulé les micelles comme décrit dans le chapitre II, puis encapsulé la CPT à l'intérieur des nano-vecteurs au moyen de la sonication.

III.2 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier la capacité de la micelle à encapsuler des molécules hydrophobes, nous avons réalisé une série d'analyses par électrophorèse sur gel d'agarose. Tout d'abord, un gel d'agarose en présence de différents rapports Micelle/CPT, a été réalisé en utilisant comme tampon migrateur le tris-acétate (pH = 7,5). Cependant, comme constaté sur la Figure 72A, ni la micelle ni la CPT ne migrent dans ces conditions. Cette méthode n'a donc pas permis de visualiser une potentielle encapsulation. Pour contourner ce problème de neutralité de la CPT à ce pH, nous avons donc réalisé l'étude sur une molécule modèle hydrophobe et chargée : le pyrène comportant un acide carboxylique en position 1.

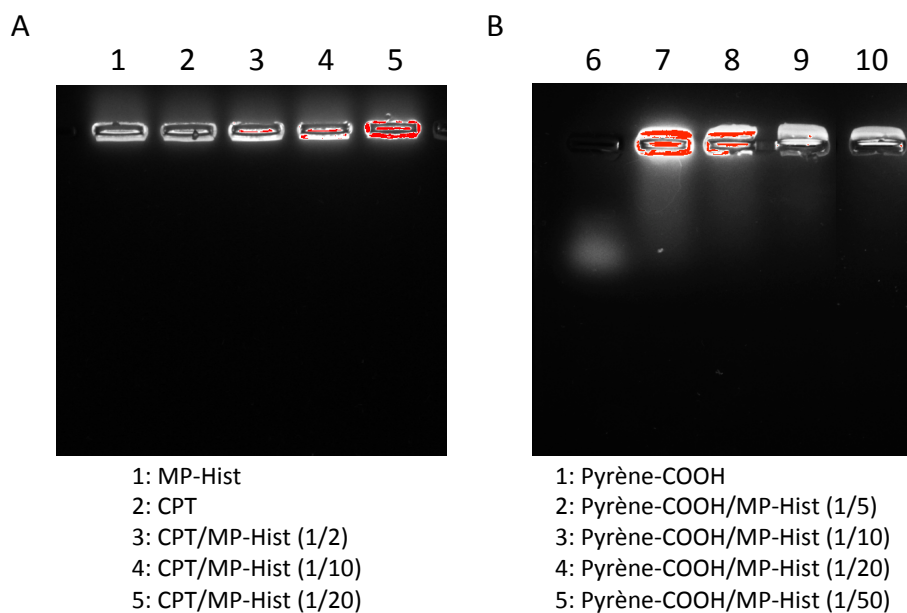


Figure 72 : Etude de l'encapsulation de molécules hydrophobes dans les micelles pour différents ratios massiques (A) en camptothécine ; (B) en 1-pyrène-COOH. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose réalisée avec T-A comme tampon de migration.

On constate que la micelle est capable d'encapsuler la molécule de pyrène à partir de ratios supérieurs à 1/10, puisque le pyrène-COOH n'est plus capable de migrer dans le gel (Figure 72B). Pour obtenir des informations plus précises sur le taux d'encapsulation de la camptothécine, des mesures de fluorescence ont ensuite été effectuées et seront exposées dans la partie suivante.

III.2 Détermination du taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation maximum de la CPT dans les micelles histidines a été déterminé par fluorescence. La CPT présente un maximum de fluorescence à 440 nm lorsqu'elle est excitée à 370 nm. Une gamme croissante de quantité de CPT a été encapsulée dans une quantité fixe de MPD-Hist par sonication. La CPT n'étant pas soluble dans l'eau, celle-ci va se placer dans le cœur hydrophobe de la micelle et ainsi former une suspension, abrégée ^{CPT}MPD-Hist. Bien que la CPT ne montre presque aucune fluorescence en milieu aqueux car insoluble, une étape de filtration a été réalisée pour éliminer la CPT non encapsulée. La fluorescence a été mesurée sur les échantillons avant et après filtration. La fluorescence de la micelle a été prise comme référence et retranchée aux intensités de fluorescence obtenues pour les différents échantillons. Les données brutes ont été répertoriées dans le Tableau 8.

Micelle (mg)	CPT (mg)	Fluorescence avant filtration $\lambda_{\text{max}_{\text{em}}}=440 \text{ nm}$	Fluorescence après filtration $\lambda_{\text{max}_{\text{em}}}=440 \text{ nm}$	Taux de recouvrement (%)	Taux de saturation de la micelle (%)
0,5	0	112	58		
0,5	0,0075	149,9	111,4	74,3	41
0,5	0,015	202,1	189,6	93,9	55
0,5	0,02	256,5	234,2	91,3	70
0,5	0,03	301,6	283,2	93,9	83
0,5	0,04	332,8	300,8	90,4	91
0,5	0,05	364,2	328,5	90,2	100
0,5	0,1	371,7	334,7	90,1	100
0,5	0,25	369,5	335,5	90,8	100

Tableau 8 : Données brutes obtenues par fluorescence avant et après filtration de la camptothécine encapsulée dans MPD-Hist.

Tout d'abord, on remarque qu'après filtration *via* un filtre de $0,45 \mu\text{m}$, un taux de recouvrement de la CPT moyen de 90 % a été obtenu. Ce taux a été déterminé en divisant l'intensité de fluorescence obtenue après filtration avec celle avant filtration. Cette donnée nous a permis de nous assurer de la reproductibilité de la filtration et donc des fluorescences relevées. En traçant la courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité en masse de CPT introduite, un palier est observé à partir de 0,05 mg de CPT encapsulée, représentant un rapport massique de 1/10 entre la CPT et la micelle (Figure 73). Ce rapport correspond donc au taux d'encapsulation maximum.

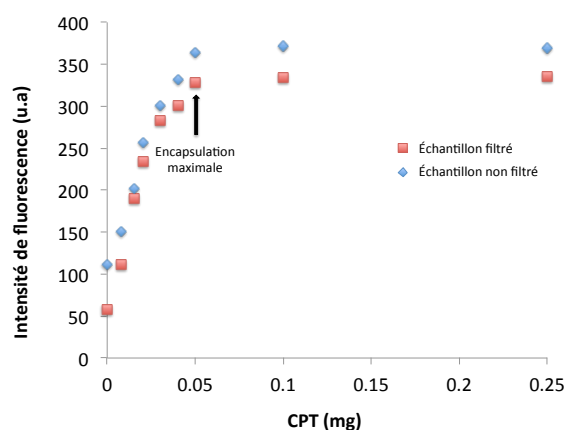


Figure 73 : Intensité de fluorescence à 440 nm de la CPT encapsulée à différents ratios dans MPD-Hist avant (carré) et après (losange) filtration ($\lambda_{\text{ex}} : 370 \text{ nm}$).

De plus, on remarque que l'allure des courbes obtenues avec ou sans filtration est semblable, montrant que la fluorescence de la CPT libre est négligeable. Pour la suite, le ratio massique

de 1/10 CPT/MPD-Hist a donc été conservé. Ce rapport massique d'inclusion est en accord avec les observations faites dans la littérature sur d'autres micelles PDA.

Condition retenue:

- Taux d'encapsulation : ratio massique 1/10 CPT/MPD-Hist

III.3 Délivrance *in vitro* d'anticancéreux

Après optimisation du ratio d'encapsulation, la viabilité cellulaire en présence de la CPT libre et de ^{CPT}MPD-Hist a été testée au moyen d'un test MTT.

Après encapsulation de cette dernière avec un rapport massique de 1/10, les solutions ont été ajoutées sur les cellules HeLa et MDA-MB-231 en absence de sérum. 10 % de sérum ont été ajoutés 4 heures après le début de l'expérience. Après 48h, la solution de MTT a été ajoutée et la lecture de l'absorbance a été réalisée. Les résultats montrent que sur les HeLa, la toxicité induite par ^{CPT}MPD-Hist ($IC_{50} = 1 \mu M$) est deux fois plus importante que pour la CPT seule ($IC_{50} = 4,1 \mu M$) ce qui confirme le maintien de l'activité anti-tumorale de la CPT après encapsulation (Figure 74A). Sur les cellules MDA-MB-231, l'efficacité entre les deux composés est identique jusqu'à $4 \mu M$ (Figure 74B). Après cette concentration, un plateau est observé pour la drogue seule, probablement dû au manque de solubilité de la CPT alors que pour l'analogue encapsulé la viabilité cellulaire continue à décroître.

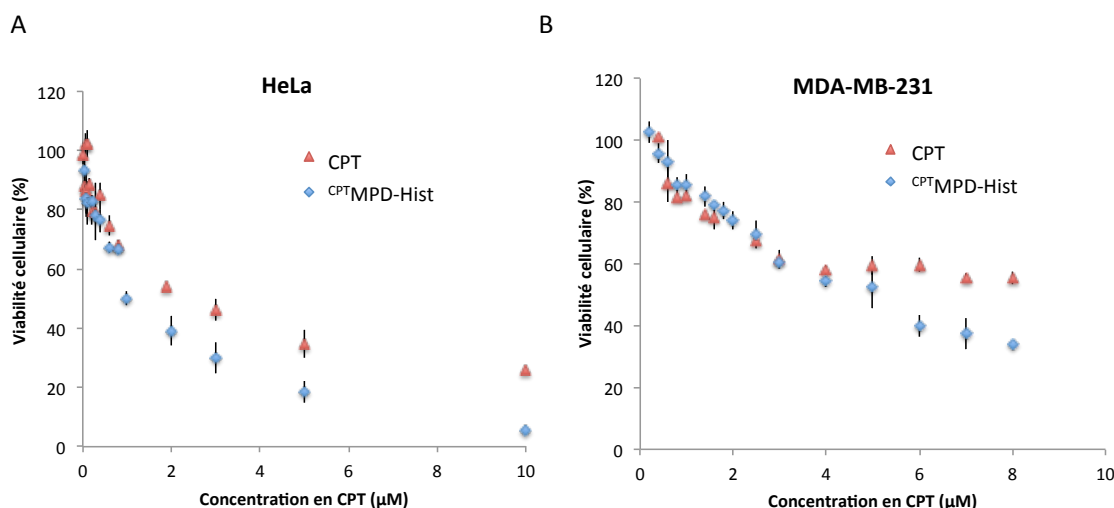


Figure 74 : Viabilité cellulaire obtenue par dosage MTT, 48h après l'ajout des différents composés sur les cellules. La viabilité est donnée pour la CPT libre et la CPT encapsulée dans la micelle (^{CPT}MPD-Hist) pour la lignée cellulaire HeLa (A) et pour la lignée cellulaire MDA-MB-231 (B). Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

L'encapsulation semble donc permettre d'améliorer la solubilité de la CPT à fortes concentrations augmentant ainsi l'internalisation de la drogue. On note ici que la CPT seule a été utilisée à partir d'une solution stock dans le DMSO (0,2 mg/mL) puis diluée à la concentration voulue dans le milieu de culture juste avant l'expérience afin de ne pas dépasser 2 % final en DMSO. Sans cette première solubilisation dans le DMSO, la drogue ne serait pas soluble du tout. Il a donc été important ici de réaliser un autre contrôle afin de connaître la toxicité induite par le DMSO sur les cellules. Aux concentrations de travail utilisées, aucune toxicité provenant du DMSO n'a été observée.

IV. Co-délivrance siARN/drogue *in vitro*

Une fois les conditions optimisées pour la délivrance de la camptothécine ainsi que pour celle du siARN, nous avons étudié la co-délivrance de ces deux agents thérapeutiques afin d'évaluer le potentiel thérapeutique.

IV.1 Analyse par DLS

Tout d'abord, la taille des différents éléments a été déterminée par des mesures de DLS. Les micelles diluées dans le tampon HEPES-glucose présentent un diamètre hydrodynamique moyen de 17 nm (Figure 75A). En comparant ce résultat à la taille des micelles obtenue dans l'eau (~ 10 nm) (Chapitre II), on se rend compte que ce tampon permet l'obtention d'objets légèrement plus gros. En encapsulant la CPT dans la micelle au ratio massique optimal, une légère hausse du diamètre hydrodynamique a été observée (20 nm) (Figure 75B).

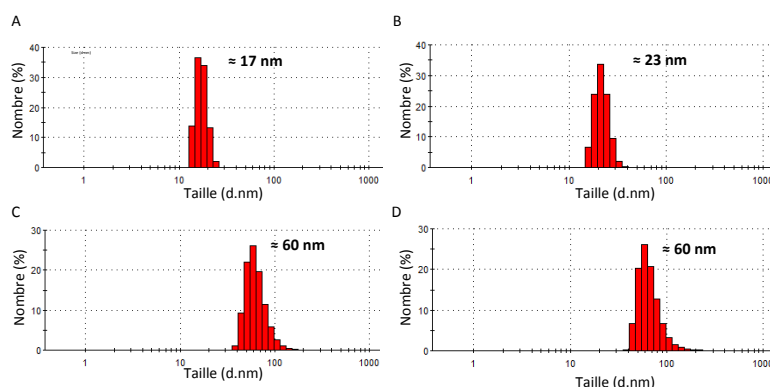


Figure 75 : Distribution de la taille en nombre obtenue par DLS dans le tampon HBG pour A. MPD-Hist (PdI = 0,452) B. ^{CPT}MPD-Hist (PdI = 0.434) C. MPD-Hist_{siplk1} (PdI = 0,215) D. ^{CPT}MPD-Hist_{siplk1} (PdI = 0,213).

Les complexes MPD-Hist_{siPLK1} possèdent quant à eux, une taille avoisinant les 60 nm (Figure 75C). Après co-formulation des deux agents thérapeutiques en sein de la même micelle, le vecteur conserve une taille de 60 nm (Figure 75D).

IV.2 Etude de l'effet combiné

IV.2.1 Détermination de l'effet induit par la combinaison des deux composés

Le but principal de la co-délivrance est d'envisager un effet coopératif visant à l'augmentation de l'effet thérapeutique. Lorsque la combinaison de plusieurs drogues est plus efficace que la somme des effets individuels, l'effet est dit synergique. En d'autre terme, un des agents permet de potentialiser l'effet de l'autre.

L'effet combiné est décrit par l'indice de combinaison CI, calculé selon l'équation suivante :

$$CI = \frac{D1}{ID(x, 1)} + \frac{D2}{ID(x, 2)}$$

où D1 et D2 représentent les concentrations en drogue 1 et en drogue 2 produisant un certain effet lorsqu'elles sont combinées et ID(x,1) et ID(x,2) sont les concentrations des drogues 1 ou 2 isolées donnant le même effet quand elles sont délivrées individuellement.

Selon le résultat obtenu suite à la résolution de cette équation, l'effet est dit antagoniste (CI<1), additif (CI=1) ou synergique (CI>1). Dans notre cas, l'indice de combinaison a été déterminé grâce au logiciel Compusyn, développé par l'équipe de T.C. Chou.⁵²

Ces résultats peuvent également être illustrés par représentation graphique à l'aide de la méthode des isobogrammes où chaque courbe présente les successions de concentrations donnant le même effet biologique (Figure 76).

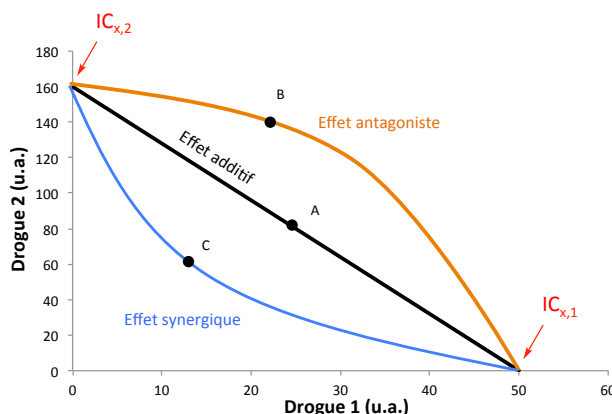


Figure 76: Isobogramme.

Les concentrations en drogue 1 et en drogue 2 sont données respectivement en abscisse et en ordonnée. L'isobologramme montre des effets obtenus tels que des inhibitions à 50 %, à 10 % ou encore à 90% (notés IC_{50} , IC_{10} ou IC_{90}). On rassemble en nuage de points l'ensemble des concentrations donnant un effet identique. Si les points tracés se trouvent en dessous de la droite reliant les valeurs des deux drogues prises isolément, l'effet est synergique, un positionnement sur cette ligne diagonale indique un effet additif et si les points se situent largement au-dessus de cette ligne, l'effet est dit antagoniste, c'est-à-dire qu'une des drogues entrave l'activité de l'autre.

Par exemple, sur ce graphique reliant des points de concentration de deux drogues conduisant à un effet biologique donné $IC_x = IC_{50}$, on peut en déduire que la drogue 1 a une IC_{50} de 50 u.a. (unité arbitraire) et la drogue B de 160 u.a.. Si en combinant 25 u.a. du composé 1 et 80 u.a. de 2, on atteint de nouveau 50 % d'inhibition alors l'effet est additif (point A). Si cette même inhibition est atteinte en utilisant des concentrations plus importantes en drogues 1 et 2, l'effet est antagoniste (point B) et si les concentrations de ces drogues sont plus faibles, elles agissent de façon synergique.

IV.2.2 Co-délivrance *in vitro*

IV.2.2.1 Co-délivrance de la CPT et du siPLK1

L'expérience consistait à évaluer l'activité biologique de la micelle comportant la combinaison de deux agents cytostatiques, la CPT et siPLK1. Afin d'évaluer si l'effet induit en co-formulation était antagoniste, additif ou synergique, il a été nécessaire de tester trois formulations, à savoir la camptothécine encapsulée ($CPT^{MPD-Hist}$), le siPLK1 complexé ($MPD-Hist_{siPLK1}$) et la combinaison des deux agents thérapeutiques ($CPT^{MPD-Hist_{siPLK1}}$), à différentes concentrations (Figure 77).

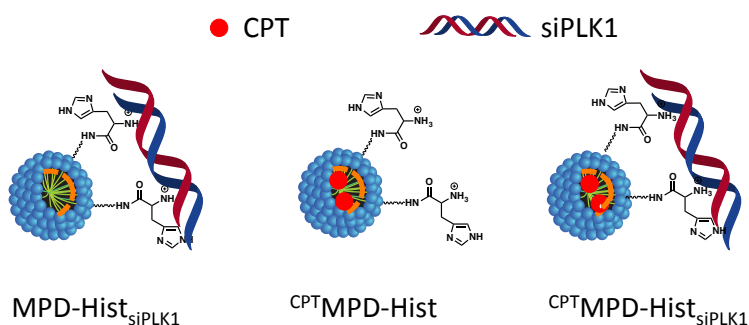


Figure 77: Structure et nom des échantillons testés *in vitro*.

^{CPT}MPD-Hist et MPD-Hist_{siPLK1} ont été obtenus comme précédemment décrit. Pour obtenir la combinaison, ^{CPT}MPD-Hist a été incubé à température ambiante pendant 1 heure avec le siPLK1 préalablement dilué dans le tampon HBG. Ces différents complexes ont ensuite été ajoutés sur les deux lignées de cellules HeLa et MDA-MB-231. Il est également important de noter que pour chaque condition, la même quantité de vecteur a été introduite afin de s'affranchir de la potentielle toxicité liée à la micelle. Ainsi l'effet observé, par comparaison au référentiel « micelle seule », correspond uniquement à l'action des agents thérapeutiques. Après 48 h, la viabilité cellulaire a été mesurée par un dosage MTT et calculé en prenant pour référence celle obtenue pour les cellules non traitées. De même que précédemment, le pourcentage d'inhibition est représenté par la mort cellulaire induite ou le retard de multiplication et est donc calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de croissance} = 100 (\%) - \frac{\text{Viabilité cellulaire des cellules traitées} (\%)}{\text{Viabilité cellulaire des cellules non traitées} (\%)}$$

Plusieurs concentrations en CPT et en siPLK1 ont été testées afin d'établir l'IC₅₀ de ces différentes formulations et ainsi de pouvoir calculer les indices de combinaisons associés. Après calcul des pourcentages d'inhibitions à partir des viabilités cellulaires, les données ont été rentrées dans le logiciel Compusyn capable par un traitement mathématique d'intégrer tous les pourcentages d'inhibition et de les regrouper en un seul isobogramme avec les CI associés. En fonction des indices calculés, la nature de l'effet a été déduit.

Le sérum étant un facteur non négligeable impactant l'efficacité d'un système de délivrance, nous avons préféré dans un premier temps évaluer les pourcentages d'inhibition par combinaison des deux agents en absence de sérum puis en présence de sérum.

Combothérapie en absence de sérum

En comparant les pourcentages d'inhibition induit par chaque formulation pour différentes concentrations en siPLK1 et en CPT, on remarque qu'en absence de sérum la combinaison des deux agents permet bien de réduire plus efficacement la viabilité cellulaire que ^{CPT}MPD-Hist et MPD-Hist_{siPLK1} pris séparément (Figure 78A et B). La co-délivrance permet donc d'augmenter l'efficacité du traitement sur les deux lignées cellulaires.

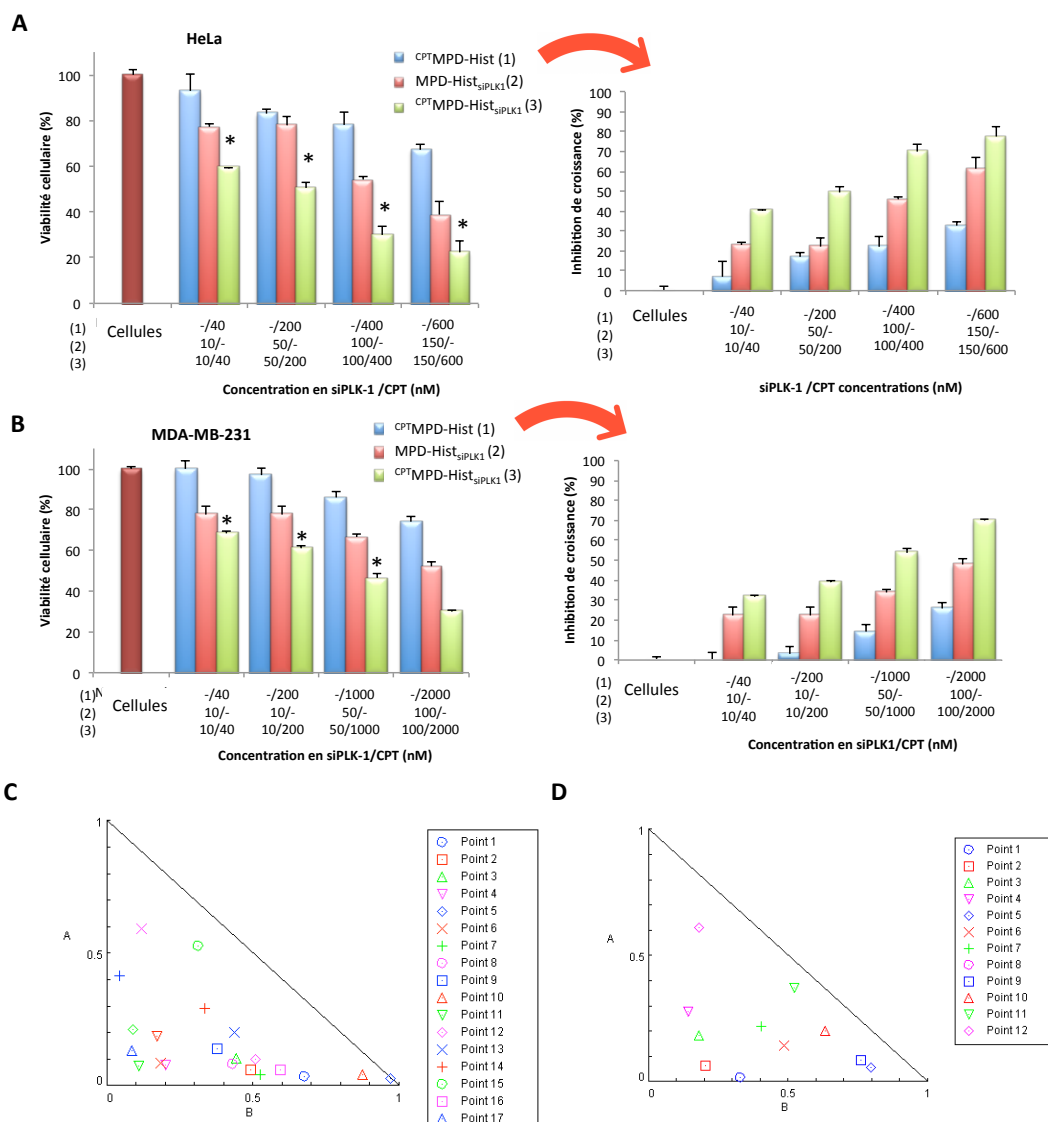


Figure 78 : Viabilité cellulaire obtenue au moyen d'un test MTT et conversion en pourcentage d'inhibition, 48 h après l'addition de ^{CPT}MPD-Hist, MPD-Hist_{siPLK1} et ^{CPT}MPD-Hist_{siPLK1} sur les cellules A. HeLa. B. MDA-MB-231 à différents ratios siPLK1/CPT. * représente un indice de combinaison (calculé à l'aide du logiciel Compusyn) inférieur à 1 indiquant un effet synergique ; Isobogrammes (réalisés à l'aide du logiciel Compusyn) associé à l'expérience de co-délivrance réalisée sur les cellules C. HeLa. D. MDA-MB-231.

L'utilisation du logiciel Compusyn a permis de dire que l'effet observé était synergique pour toutes les concentrations testées puisque les CI calculés sont largement inférieurs à 1. Les isobogrammes obtenus, également par ce logiciel, ont permis de visualiser cet effet synergique. On constate que l'effet est plus important sur les cellules HeLa que sur les MDA-MB-231, lignée plus résistante. En effet, les CI calculés pour la co-délivrance réalisée sur les cellules HeLa, sont inférieurs à ceux observés sur les cellules MDA-MB-231. L'intégralité des indices de combinaison a été regroupée dans les tableaux suivants (Tableaux 9 et 10).

Lignée cellulaire	CPT (nM)	siPLK1 (nM)	% d'inhibition	CI	
HeLa	80	0	1	RÉFÉRENCE	
	400		31	/	
	800		44	/	
	1000		54	/	
	80	10	33	0,36	
	200		49	0,30	
	400		42	0,71	
	1000		68	0,46	
	80	50	46	0,61	
	200		50	0,64	
	400		57	0,63	
	800		59	0,83	
	1000	85	0,21		
	40	100	50	0,92	
	80		63	0,56	
	200		68	0,52	
	400		41	0,52	
	1000	90	0,20		
	40	150	58	0,99	
	80		67	0,71	
	200		74	0,55	
	400		76	0,55	
	800	88	0,28		
	1000	89	0,28		
		0	50	22	RÉFÉRENCE
			100	46	/
			150	61	/

Tableau 9 : Pourcentages d'inhibition obtenu par dosage MTT, 48 h après l'ajout des différents complexes ^{CPT}PMD-Hist_{siPLK1} sur les cellules HeLa. Ils sont donnés pour différentes associations de concentration en siPLK1 et CPT. Les résultats présentés correspondent aux moyennes des triplicats. Les indices de combinaison ont été déterminés à l'aide du logiciel Compusyn.

	CPT (nM)	siPLK1 (nM)	% d'inhibition	CI
MDA-MB-231	40	0	0	/
	200		3	/
	1000		14	/
	2000		26	/
	40	10	32	0,34
	200		39	0,27
	600		41	0,36
	1000		45	0,42
	200	50	43	0,85
	600		51	0,63
	1000		54	0,63
	40	100	48	1,18
	400		55	0,85
	1000		58	0,83
	2000		69	0,69
	0	10	22	/
0	50	34	/	
0	100	48	/	

Tableau 10 : Pourcentages d'inhibition obtenu par dosage MTT, 48 h après l'ajout des différents complexes CPT^{PMH}_{siPLK1} sur les cellules MDA-MB-231. Ils sont donnée pour différentes associations de concentration en siPLK1 et CPT. Les résultats présentés correspondent aux moyennes des triplicats. Les indices de combinaison ont été déterminés à l'aide du logiciel Compusyn.

Combothérapie en présence de sérum

Une expérience similaire a été réalisée en présence de sérum afin de voir l'impact de ce dernier sur la co-délivrance. Tout d'abord, les activités de la CPT libre et encapsulée ont été déterminées. En comparant avec les résultats obtenus précédemment, on constate que le sérum n'impacte pas de manière significative l'activité de la camptothécine (Figure 79A). En effet, les IC_{50} restent proches de $1 \mu M$. Cependant, la délivrance de siARN est nettement plus impactée en présence de sérum. En effet, seule une inhibition spécifique de 20% est obtenue avec 200 nM contre 50% en absence de sérum (Figure 79B). Enfin, la co-délivrance des deux agents thérapeutiques ne permet plus un effet synergique mais majoritairement un effet additif. En effet, contrairement aux résultats obtenus en absence de sérum où les CI étaient principalement en dessous de 0,8, ici la majorité des CI calculés sont compris entre 0,8 et 1,2 (Figure 79C). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en présence de sérum, l'internalisation des micelles est diminuée, ainsi une quantité moindre d'agents thérapeutiques pénètre à l'intérieur des cellules. La sensibilité au sérum reste donc un problème majeur pour nos vecteurs qui

devra être pris en compte notamment lors de la détermination des modes d'injections pour la réalisation des tests *in vivo*.

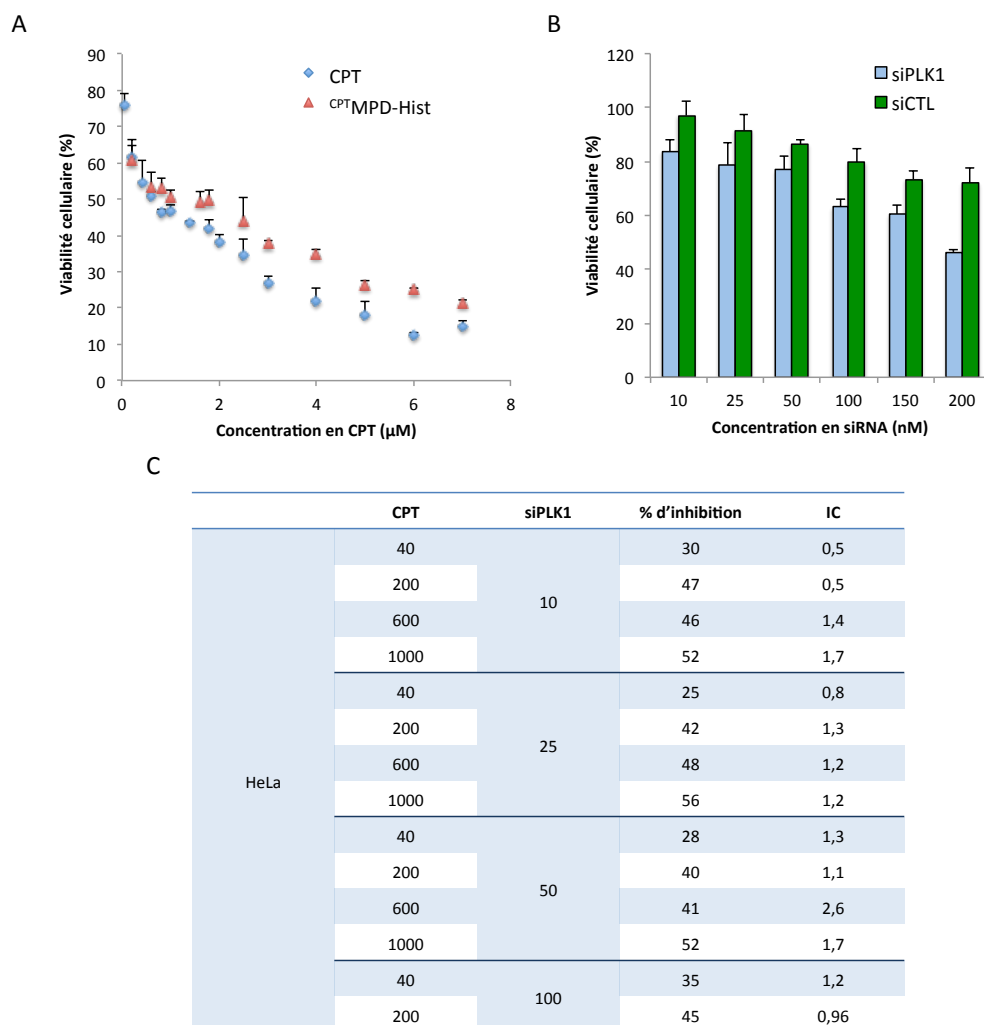


Figure 79 : A. Viabilité cellulaire obtenue par dosage MTT, 48h après l'ajout des différents composés sur les cellules. Celle-ci est donnée pour la CPT libre et pour la CPT encapsulée dans la micelle (CPT^{MPD-Hist}) sur les cellules HeLa. B. Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec le vecteur MPD-Hist après 48h d'incubation sur les cellules HeLa. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN et sont obtenus suite à un test MTT. C. Pourcentages d'inhibition obtenu par dosage MTT, 48 h après l'ajout des différents complexes CPT^{MPD-Hist}/siPLK1 sur les cellules HeLa. Ils sont donnés pour différentes associations de concentration en siPLK1 et CPT. Les indices de combinaison ont été déterminés à l'aide du logiciel Compusyn. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

IV.2.2.2 Co-délivrance du paclitaxel (PXL) et du siPLK1

Au vu des résultats encourageants obtenus avec la camptothécine, nous avons souhaité réaliser une étude similaire mais avec un anticancéreux qui est très utilisé en clinique : le paclitaxel (PXL, un agent antimicrotubules). Ce composé induit l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et stabilise ces dernières empêchant ainsi leurs dépolymérisations.

La réorganisation dynamique du réseau de microtubules se fige ce qui empêche les chromosomes de migrer à chaque pôle de la cellule. La division cellulaire est bloquée et la cellule reçoit un message d'apoptose.⁵³

De même que pour la camptothécine, le paclitaxel a été encapsulé dans la micelle par sonication avec un rapport massique 1/10 PXL/micelle. L'activité anti-tumorale de ce complexe a tout d'abord été déterminée au moyen d'un test MTT sur la lignée cellulaire HeLa. En comparant avec les résultats obtenus avec la camptothécine ($IC_{50} = 4,1 \mu M$), on constate que le paclitaxel est beaucoup plus toxique avec une IC_{50} de l'ordre de 80 nM (Figure 80A).

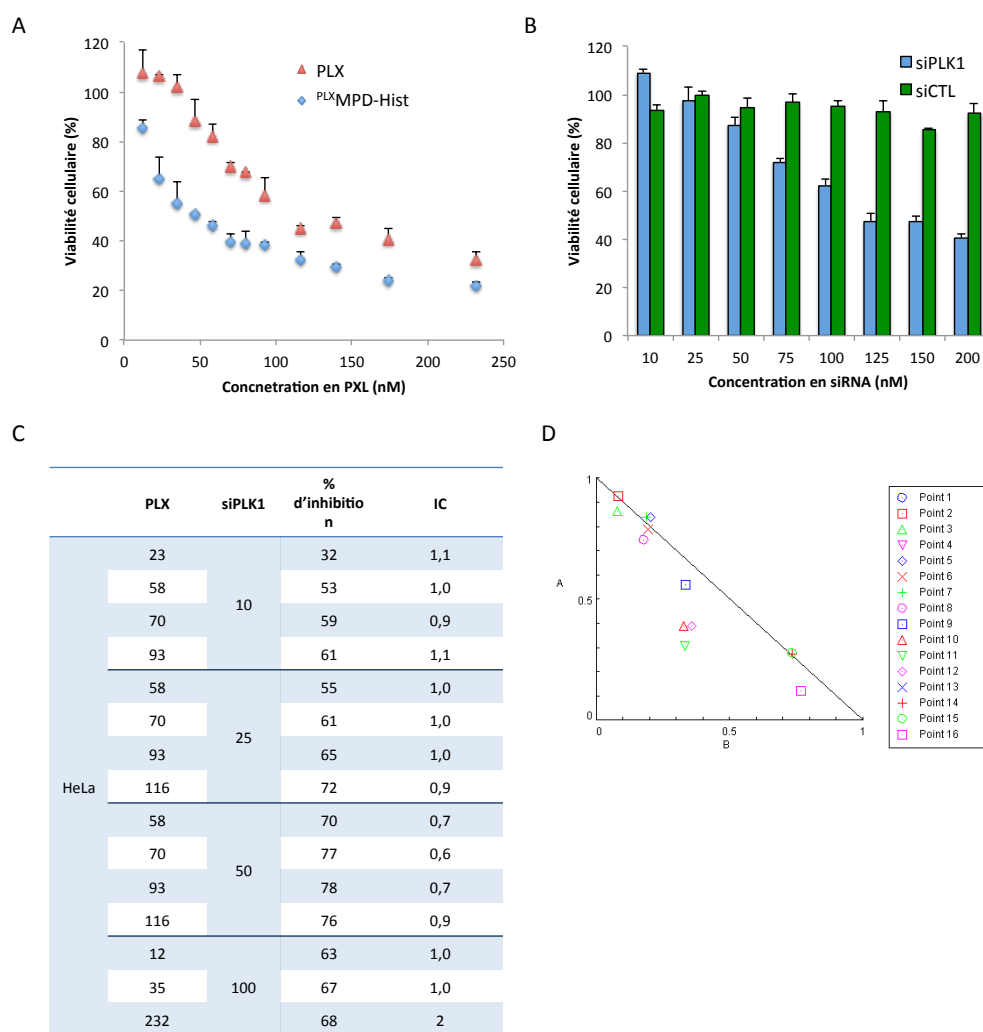


Figure 80 : A. Viabilité cellulaire obtenue par dosage MTT, 48h après l'ajout des différents composés sur les cellules. Celle-ci est donnée pour le PXL libre et le PXL encapsulé dans la micelle ($^{PXL}MPD-Hist$) sur les cellules HeLa. B. Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec le vecteur MPD-Hist (N/P 5,6) après 48h d'incubation sur les cellules HeLa. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN. Les résultats sont obtenus suite à un test MTT. C. Pourcentage d'inhibition obtenu par dosage MTT, 48 h après l'ajout des différents complexes $^{PXL}MPD-Hist_{siPLK1}$ sur les cellules HeLa. Ils sont donnés pour différentes associations de concentration en siPLK1 et PXL. Les indices de combinaison ont été déterminés à l'aide du logiciel Compusyn. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats. D. Isoblogramme associé à l'expérience de co-délivrance réalisée sur les cellules HeLa.

Encapsulé dans la micelle, celui-ci devient plus toxique avec une IC_{50} de l'ordre de 50 nM. L'encapsulation semble donc améliorer l'efficacité de la drogue.

La transfection du siPLK-1, comparée à celle du siCTL, a été réalisée à nouveau en parallèle et en accord avec les précédents résultats, 50 % d'inhibition ont été obtenus à 150 nM avec la ratio N/P 5,6 (Figure 80B).

Concernant la combinaison CPT/siPLK1, malgré quelques indices de combinaison bien inférieurs à 1, notamment pour les points correspondant à une concentration en siARN de 50 nM, les indices de combinaison sont majoritairement situés au alentour de 1 témoignant d'un effet additif (Figure 80C et D).

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que lorsque le siARN et l'anti-tumoral agissent au niveau du même processus dans la cellule telle que la division cellulaire pour siPLK1/PXL, il y a compétition entre les deux agents ce qui ne permet pas d'obtenir un effet synergique. Pour valider cette hypothèse, d'autres drogues seront testés ultérieurement au laboratoire.

V. Co-délivrance des deux agents thérapeutiques *in vivo*

Suite à l'obtention des résultats positifs sur les cellules en culture, nous avons souhaité vérifier si l'effet synergique observé *in vitro* était conservé chez le petit animal, afin de valider notre système *in vivo*.

L'objectif ultime de ce projet vise à développer une nouvelle approche médicale permettant le traitement du cancer du sein ayant acquis une résistance aux anti-tumoraux classiques.

Cette partie du projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Bagnard³ et plus particulièrement sous l'encadrement de Marie Pierdant, doctorante au sein de l'unité Inserm 1109. Afin de respecter la loi régissant l'expérimentation animale, j'ai suivi une formation réglementée destinée aux personnes concevant ou réalisant des procédures expérimentales sur modèle rongeur et une saisine a été déposée (dossier n°2016063017352801).

Dans un premier temps, les conditions expérimentales tels que le choix de l'espèce, la constitution des groupes ou encore les doses injectées ont été déterminés. Après élaboration du protocole expérimental, les différentes formulations ont été testées sur les souris sur des modèles de tumeurs implantées en sous-cutanée.

³ Unité INSERM 1109, Illkirch-Graffenstaden

V.1 Conception du protocole expérimental

V.1.1 Choix du modèle murin

Dans le cadre de cette expérience, des souris NMRI-nude (Naval Medical Research Institute) ont été utilisées. Du fait de l'absence partielle de système immunitaire, ce modèle permet d'établir correctement des greffes de cellules tumorales humaines. Souhaitant étudier les phénomènes de tumorigénèse mammaire, nous avons logiquement choisi de travailler avec des femelles adultes. L'utilisation de souris non adulte n'est pas pertinente dans notre cas car les mécanismes physiologiques impliqués sont potentiellement différents chez l'individu en cours de développement.

La mise au point du modèle tumorale a été réalisée par nos collaborateurs : l'équipe a en particulier déterminé combien de cellules MDA-MB-231 doivent être implantées en sous-cutanée afin d'obtenir de manière relativement reproductible des tumeurs solides et sphériques.

V.1.2 Composition de la formulation micellaire

Pour cette expérience préliminaire, quatre groupes expérimentaux comportant chacun 6 souris ont été créés :

- Groupe 1 : Groupe contrôle traité avec le véhicule seul (MPD-Hist)
- Groupe 2 : ^{CPT}MPD-Hist
- Groupe 3 : MPD-Hist_{siPLK1}
- Groupe 4 : ^{CPT}MPD-Hist_{siPLK1}

Nous avons choisi comme groupe contrôle le traitement par le véhicule seul plutôt que par le tampon de complexation HEPES-glucose car il nous semblait essentiel de connaître la toxicité induite par le vecteur seul. En effet, la micelle pourrait se révéler toxique et induire une inhibition de la croissance tumorale.

Pour les différents groupes de traitement, il a tout d'abord été nécessaire de déterminer la dose de chaque composé à injecter. Pour respecter des volumes raisonnables à injecter, les solutions de complexes ont dû être formulées de façon plus concentrée. Pour une utilisation *in vivo*, une optimisation de la formulation s'est donc avérée nécessaire. Dans ce but, plusieurs solutions comportant différentes quantités en CPT et en siPLK1 ont été réalisées et analysées par DLS.

Premièrement, une gamme croissante de concentration en siPLK1 a été diluée dans le tampon HEPES-glucose (pH = 7,5), puis différentes quantités de MPD-Hist ont été ajoutées afin d'obtenir plusieurs ratios N/P. A noter que le volume de la solution à injecter ne doit pas excéder 100 μ L, volume maximum toléré en sous-cutanée.

Les tailles des différentes formulations ont ensuite été mesurées par DLS (Tableau 11).

siPLK1 (μ g)	PM-Hist (μ g)	N/P	HBG (μ L)	Taille (nm)
2	22,4	5	94	Gros objet
4	50		88	Gros objet
5	56		85,1	Gros objet
6	67		82	Gros objet
7	79		79	Gros objet
8	90		74	Précipité
10	112		70	Précipité
2	45	10	89,5	95
5	112		73,9	130
7	158		63,2	100
8	180		58	210
2	67,5	15	85	86
5	168		62,7	100
7	238		47,4	127

Tableau 11 : Etude de la distribution de taille des complexes MPD-Hist_{siPLK1} formulés dans le tampon HEPES-glucose, à différentes concentrations et ratios N/P.

Les résultats ont montré que pour un rapport N/P de 5, dans ces conditions fortement concentrées, les objets formés étaient supérieurs à 800 nm. Afin d'obtenir des objets plus petits, toujours dans le but de réaliser un ciblage passif, la quantité de micelle a été augmentée pour obtenir des ratios N/P plus importants. Pour les rapports N/P de 10 et 15, on constate que les objets obtenus sont plus petits avec des tailles majoritairement inférieures à 200 nm. La condition optimale a été choisie en prenant la quantité de micelle la plus faible permettant de complexer la plus grande quantité de siARN, tout en gardant une taille de l'ordre de 100 nm. Pour la suite, les formulations seront donc composées de 7 μ g de siARN et 158 μ g de micelle représentant un ratio N/P de 10. Il est également important de noter que dans cette condition, la quantité de tampon HEPES-glucose 5 % ajoutée permet de respecter l'osmolarité physiologique.

Les quantités de siARN et de micelle étant fixées, il a ensuite été nécessaire de déterminer la quantité maximale de CPT pouvant être introduite. En ayant 158 μg de micelle par injection, il est possible, en conservant le ratio massique optimal d'encapsulation de 1/10, d'encapsuler 15 μg de CPT. Les formulations finales $\text{CPT}^{\text{MPD-Hist}}$ et $\text{CPT}^{\text{MPD-Hist}}_{\text{siPLK1}}$ ont également été analysées en DLS (Tableau 12).

siPLK1 (μg)	CPT (μg)	MP-Hist (μg)	HBG (μL)	Taille (nm)
/	15	158	68,4	54
7	15	158	68,4	124

Tableau 12 : Etude de la distribution de la taille des solutions $\text{CPT}^{\text{MPD-Hist}}$ et $\text{CPT}^{\text{MPD-Hist}}_{\text{siPLK1}}$ regroupant les conditions optimales pour l'expérience *in vivo*.

Ces analyses nous ont permis de vérifier que les différents traitements qui seront injectés chez la souris possédaient bien tous une taille inférieure à 200 nm et ne précipitaient pas.

Le mode d'injection choisi à savoir le mode péri-tumorale, ne permet pas avec notre système de délivrer des doses importantes en agent thérapeutique tout en ayant des formulations correctes (< 200 nm). Pour palier ce problème, nous avons donc choisi d'injecter à intervalle de temps régulier nos traitements pour maximiser les chances de voir un effet. La Figure 81 résume les différentes compositions des traitements délivrés aux différents groupes de souris.

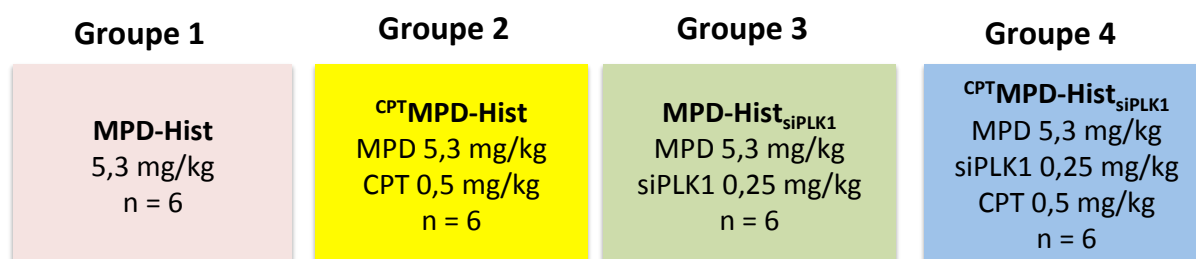


Figure 81 : Composition finale des traitements donnés aux différents groupes de souris.

V.1.2 Protocole expérimental

Dans un premier temps, les souris ont été anesthésiées à l'aide d'isoflurane 3 % contenu dans un mélange air-oxygène, puis 1×10^6 de cellules MDA-MB-231 ont été injectées en sous-cutanée afin de constituer la tumeur. Une fois que les tumeurs ont atteint un volume de 100 mm^3 , les souris ont été aléatoirement placées dans les groupes et les traitements ont été réalisés à hauteur de trois injections par semaine par souris. Pour cette première expérience, les injections ont été réalisées par injection péri-tumoral. Au final, chaque souris a reçu 12 injections espacées sur 28 jours. Au terme du traitement (ou avant en cas d'atteinte du point

limite), les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Juste avant le sacrifice et sous anesthésie locale, le plasma et les urines ont été collectés par ponction dans le cœur et dans la vessie respectivement, pour des analyses complémentaires tels que les dosages des marqueurs de toxicité ou hépatiques. Enfin, post-mortem, les tumeurs ont été prélevées et pesées (Figure 82).

Les souris ont été surveillées quotidiennement depuis la xénogreffe jusqu'au sacrifice. La mesure de l'évolution des tumeurs a été enregistrée trois fois par semaine par mesure des diamètres tumoraux au pied à coulisse. Le volume a été calculé selon l'équation suivante :

$$Volume\ tumoral = \frac{Grand\ diamètre}{2} * Petit\ diamètre^2$$

Le poids étant un indicateur de l'état général de la souris, les animaux ont également été pesés chaque semaine.

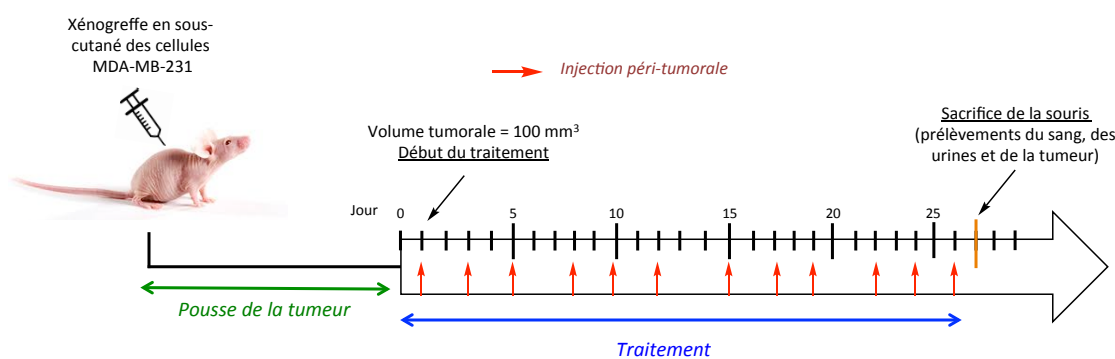


Figure 82: Protocole expérimental *in vivo*.

V.2 Résultats *in vivo*

Les mesures du volume tumoral des souris traitées, par injection successive en péri-tumoral, avec les différentes formulations sont présentées dans la Figure 83A. Le groupe contrôle, traité avec la micelle seule a montré une croissance tumorale rapide comparée aux groupes ayant reçu des traitements. La micelle seule ne semble donc pas avoir de propriétés anticancéreuses. De plus, l'augmentation de la masse corporelle des souris du groupe montre que celles-ci n'étaient pas en souffrance (Figure 84A). Aucune des souris du groupe contrôle n'a présenté d'effets secondaires visibles.

Par comparaison avec le groupe contrôle, l'administration du siPLK1 complexé avec la micelle a montré une légère diminution de la croissance tumorale qui s'est avérée être non significative après analyse statistique. En revanche, il est important de noter que les doses en

siARN injectées restent très faibles. Dans une expérience future, une augmentation de la quantité délivrée permettrait peut être d'atteindre un effet plus important.

Plus encourageant, les groupes de souris traités avec les systèmes ^{CPT}Micelle et ^{CPT}Micelle_{siPLK1} ont permis de stopper complètement la progression tumorale. En comparant le traitement par co-délivrance à la CPT encapsulée, on constate que les souris ayant reçu la combinaison des deux drogues montrent un effet plus homogène d'arrêt de la croissance tumorale. L'ensemble des souris a répondu au traitement de manière efficace.

L'analyse fine post-mortem de la taille des tumeurs de chaque groupe a permis de confirmer ces résultats (Figure 83B). Les tumeurs les plus petites ont bien été obtenues suite au traitement par co-délivrance des deux agents thérapeutiques.

De manière générale, la différence entre les groupes devient de plus en plus significative avec l'augmentation du temps de traitement.

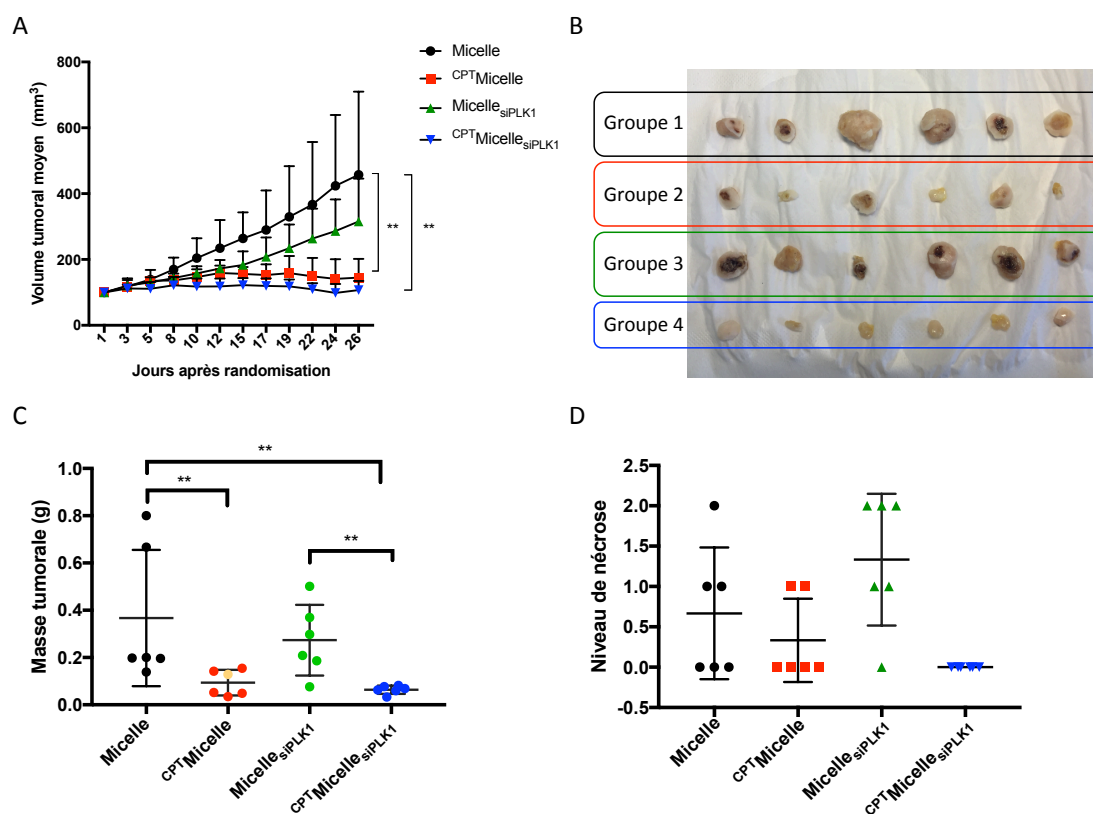


Figure 83 : A. Volumes tumoraux moyens des différents groupes de souris tout au long du traitement. Ces mesures sont données pour le groupe contrôle traité par le véhicule seul (Micelle) et pour les groupes traitées par ^{CPT}Micelle, Micelle_{siPLK1} et ^{CPT}Micelle_{siPLK1}. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des 6 souris/groupe. Les résultats statistiques ont été obtenus suite à un test Mann-Whitney (* significativement différent pour P<0,05, ** pour P<0,01). B. Photo des tumeurs pour chaque groupe. C. Masses tumorales pour les différents groupes obtenues post-mortem. Les résultats statistiques ont été obtenus par un test Mann-Whitney (significativement différent pour P<0,05) D. Taux de nécrose observé pour les différents groupes à la fin du traitement.

La pesée des tumeurs collectées post-mortem est également en adéquation avec les précédents résultats (Figure 83C). En effet, les tumeurs les plus lourdes font parties des groupes Micelle et Micelle_{siPLK1}. En moyenne, des tumeurs possédant des poids inférieurs à 100 mg ont été mesurées pour les deux autres groupes témoignant de l'efficacité du traitement.

Le niveau de nécrose (tissus dégradés apparaissant noirs) de chaque tumeur a été également déterminé selon l'appréciation de l'expérimentateur, en prenant pour référence une échelle définie comme suit : aucune nécrose n'est visible le chiffre 0 est attribué à la tumeur, une légère nécrose est notée 1 et enfin une nécrose importante est notée 2.

Les résultats sont présentés dans la Figure 83D. La visualisation de la nécrose peut également être observée sur les photos des tumeurs (Figure 83B). Le groupe contrôle (1) ainsi que le groupe ayant reçu ^{CPT}Micelle (2) présentent une très légère nécrose avec une moyenne au alentour de 0,5. Le niveau de nécrose le plus élevé a été observé chez les souris traitées avec le siPLK-1. Cette nécrose est probablement liée à une évolution tumorale rapide. En effet, pour survivre, la tumeur est capable de susciter la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Or cette angiogenèse n'est pas toujours suffisante et des phénomènes de nécrose, principalement due à un manque d'oxygène, vont apparaître.

Dans le cas de la combinaison des deux principes actifs, aucune nécrose n'est observée. La tumeur semble « inactive ».

Enfin, le suivi des masses corporelles des souris a montré que l'ensemble des souris présentait une augmentation de leur poids normal ce qui signifie que les traitements semblent être tolérés par les souris injectées (Figure 84).

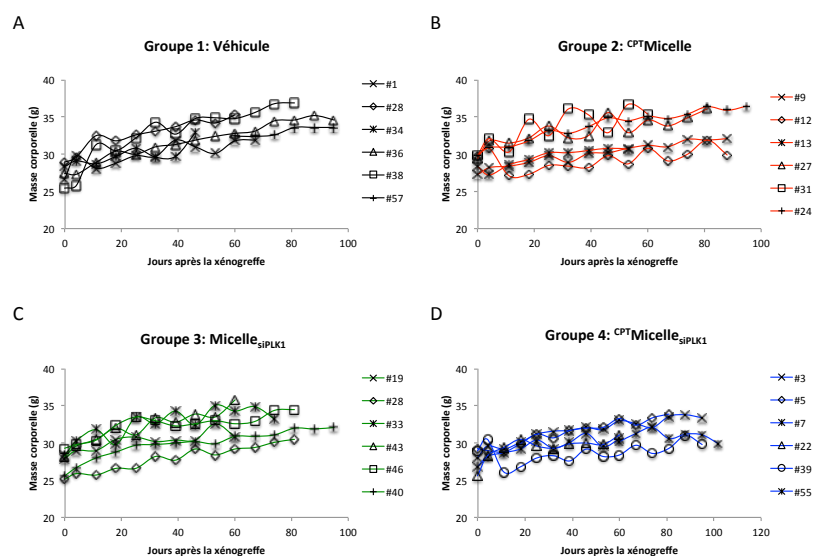


Figure 84: Courbe de poids depuis la xéno greffe jusqu'au sacrifice pour les souris des différents groupes. A. Groupe véhicule. B. Groupe ^{CPT}Micelle. C. Groupe Micelle_{siPLK1}. D. Groupe ^{CPT}Micelle_{siPLK1} (n = 6).

Pour compléter cette étude, nous avons vérifié les réponses toxicologiques en examinant les échantillons de plasma des différentes souris. Dans ce but, les concentrations de différents marqueurs de toxicité ont été mesurées (Figure 85).

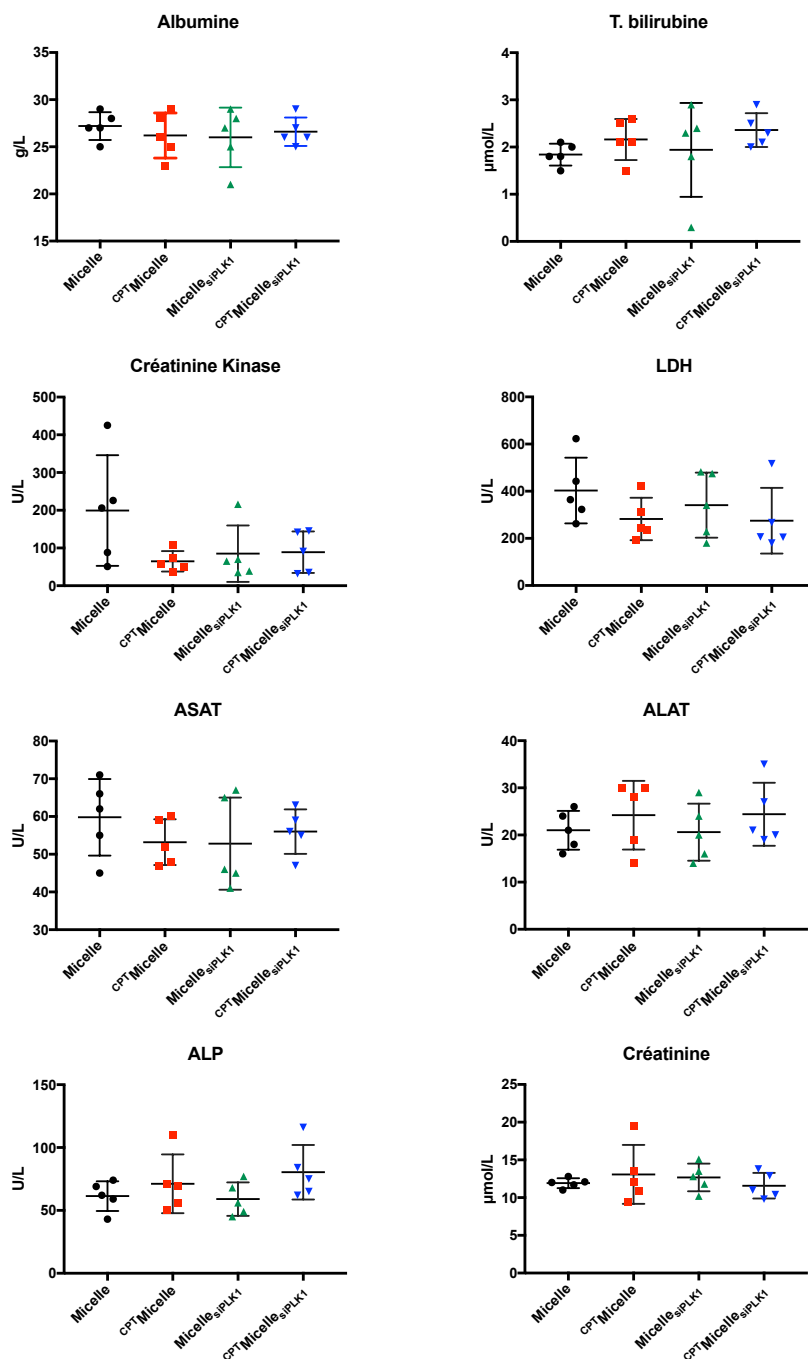


Figure 85 : Concentrations en albumine, total bilirubine, créatinine kinase, lactase dehydrogenase (LDH), alanine amino transférase (ASAT), aspartate amino transférase (ALAT), alcaline phosphatase (ALP) et créatinine présentés chez les différents groupes de souris. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes de 5 souris/groupe.

La concentration de la créatinine dans le sang est dépendante de la capacité d'élimination du rein. Une trop forte concentration témoigne d'un dysfonctionnement rénal. L'albumine est une protéine assurant le transport dans le sang de nombreuses substances. Son dosage permet de détecter notamment une déshydratation. La bilirubine totale présente dans le sang reflète la bonne activité du foie. L'augmentation de sa concentration démontre des lésions au niveau du foie tout comme le dosage des phosphatases alcalines (ALP). Les transaminases ASAT et ALAT sont quant à elles des enzymes possédant une forte activité métabolique. Leur augmentation indique des lésions cellulaires en particulier au niveau hépatique et cardiaque. L'enzyme LDH est également un marqueur tumoral et permet d'apprécier les lésions tissulaires.

A l'exception d'une augmentation de la créatinine kinase pour quelques souris traitées avec le véhicule seul (probablement due à la tumeur), aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations en protéines et en enzymes mesurées chez les souris des différents groupes. En comparant avec les valeurs obtenues avec des souris témoins (données apportées par l'institut clinique de la souris), on constate que les concentrations mesurées sont « normales » pour des souris, témoignant d'une absence de souffrance hépatique et cardiaque.

En raison des résultats encourageants obtenus, des expériences *in vivo* complémentaires ont été réalisées pour compléter cette étude afin d'y inclure d'autres contrôles. Dans cette seconde expérience, deux groupes comportant chacun 5 souris ont été traités avec :

- Groupe 5 : Camptothécine libre
- Groupe 6 : siPLK1 nu

Ces contrôles supplémentaires ont pour objectif de déterminer le rôle joué par la micelle et d'ainsi voir si le vecteur permet d'améliorer l'efficacité du traitement.

Le même protocole expérimental a été mis en place afin de pouvoir comparer ces deux expériences. Les mesures du volume tumoral des souris traitées avec ces deux nouvelles formulations sont présentées dans la Figure 86. En comparant deux à deux les effets induits par la CPT seule et ^{CPT}micelle, on constate qu'aucune différence significative n'est observée entre les différentes façons d'administrer la CPT que ce soit au niveau du volume ou de la masse tumorale (Figure 86A et C). En effet, la CPT libre (formulée dans le DMSO) induit une inhibition de la croissance tumorale quasi identique à celle du groupe traité avec ^{CPT}Micelle.

La micelle permet donc de véhiculer la camptothécine sans altérer l'efficacité de celle-ci. En revanche, le vecteur ne semble pas permettre une amélioration de l'effet thérapeutique.

De façon étonnante, le siPLK1 nu et les complexes $\text{Micelle}_{\text{siPLK1}}$ conduisent à des pousses tumorales similaires. La seule différence notable a été observée au niveau du taux de tissus nécrotiques. Les tumeurs ayant reçu le traitement $\text{Micelle}_{\text{siPLK1}}$ présentent un plus fort taux de nécrose comparé au traitement par le siPLK1 nu. Afin d'associer ce phénomène à l'action du siARN, il faudrait réaliser des coupes histologiques et déterminer le taux d'apoptose sans quoi aucune conclusion ne peut être affirmée.

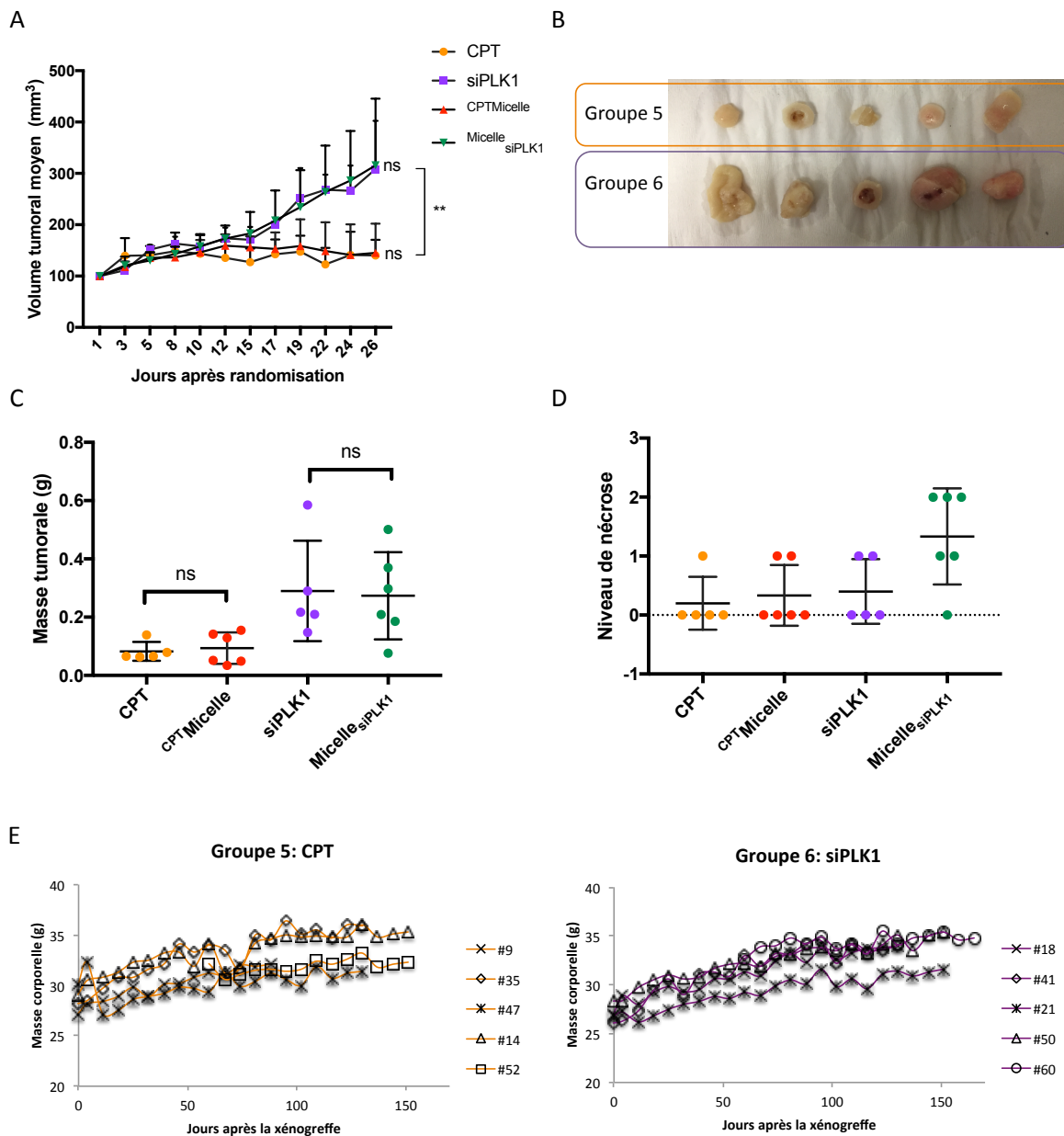


Figure 86 : A. Volumes tumoraux moyens des différents groupes de souris tout au long du traitement. Ces mesures sont données pour les groupes contrôles traités par la CPT libre et le siPLK1 libre et comparées à $\text{CPT}^{\text{Micelle}}$ et $\text{Micelle}_{\text{siPLK1}}$. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des 5 souris/groupe. Les résultats statistiques ont été obtenus suite à un test Mann-Whitney (significativement différent pour $P < 0,05$). B. Photo des tumeurs pour chaque groupe. C. Masses tumorales pour les différents groupes obtenues post-mortem. Les résultats statistiques ont été obtenus par un test Mann-Whitney (significativement différent pour $P < 0,05$). D. Taux de nécrose observé pour les différents groupes à la fin du traitement. E. Courbe de poids des souris traitées par la CPT ou le siPLK1 libres.

En conclusion, dans le cas d'une injection péri-tumorale, la micelle ne permet pas d'améliorer l'effet induit par le siARN et l'anticancéreux. En revanche, elle conserve leur efficacité.

Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a été déduit des expériences *in vitro*. Cependant, comme cela est le cas pour bon nombre d'expériences dans le domaine biomédical, cela souligne une fois de plus les grandes différences qu'il peut y avoir entre les expériences réalisées sur des cellules en 2D et les expériences réalisées sur animaux. On peut être étonné de l'effet du siPLK1 nu car les siARN sont supposés être rapidement dégradés et ne pas être internalisés efficacement dans les cellules. Mais ceci n'est pas unique : en effet, pour rappel, l'ADN nu n'est pas efficace *in vitro* mais injecté dans le muscle il peut permettre une expression quantifiable de gène rapporteur.

VI. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons démontré dans un premier temps, que notre système basé sur les micelles polydiacétyléniques étaient capables de délivrer un siARN d'intérêt thérapeutique mais également de pouvoir formuler des petites molécules hydrophobes tels que des anticancéreux. En combinant les propriétés de délivrance et de réservoir moléculaire, ce nanovecteur micellaire a permis de délivrer la CPT et le siPLK1 simultanément, offrant ainsi une amélioration de l'effet thérapeutique. Ces résultats *in vitro* ont donc permis d'envisager les micelles PDA en tant que vecteurs pour la thérapie combinatoire. Un effet synergique a pu être obtenu avec la combinaison CPT/siPLK1, or la combinaison PXL/siPLK1 s'est révélée moins efficace probablement à cause de mécanismes d'action trop similaires, entraînant ainsi une compétition plutôt qu'un effet coopératif entre les deux drogues. Afin de vérifier cette hypothèse, un panel d'anticancéreux devra être testé avec ce système pour essayer de tirer une relation entre le mécanisme et l'effet induit en thérapie combinatoire.

Dans un second temps, les micelles-PDA ont été évaluées chez le petit animal afin de transférer son application dans des conditions *in vivo*. Nous avons choisi de cibler une tumeur de xénotransgreffe par injection péri-tumorale. Le traitement siPLK1/micelle a induit une plus forte nécrose des tumeurs que le traitement avec le siARN nu seulement les courbes de l'évolution de la taille des tumeurs ne se distinguent pas l'une de l'autre. La CPT ainsi que la CPT/micelle ont permis une réduction de la tumeur. La micelle semble donc être un réservoir intéressant. Enfin le traitement par la combinaison des deux agents thérapeutiques a conduit à

un arrêt et parfois à une diminution de la croissance tumorale. Les tumeurs paraissent inactives car elles ne présentent pas de nécrose et probablement une faible angiogenèse. Afin de discriminer l'intérêt de la micelle pour le traitement du cancer du sein et affirmer que celle-ci permettrait d'augmenter la faible biodistribution de la camptothécine, il serait intéressant de tester ces formulations en injection *ip* et *iv*.

Malgré ces résultats positifs, la sensibilité au sérum reste une limite importante de notre système. Pour la suite, nous avons donc décidé de rendre notre système plus robuste en intégrant des anticorps qui pourront peut-être permettre d'une part une amélioration de la résistance aux protéines du sérum et d'autre part un ciblage actif.

Références

- (1) Dexter, D. L.; Leith, J. T. Tumor Heterogeneity and Drug Resistance. *J. Clin. Oncol.* **1986**, *4* (2), 244–257.
- (2) Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1805* (1), 105–117.
- (3) Bourhis, J.; Goldstein, L. J.; Riou, G.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Bénard, J. Expression of a Human Multidrug Resistance Gene in Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* **1989**, *49* (18), 5062–5065.
- (4) Biedler, J. L.; Riehm, H. Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies. *Cancer Res.* **1970**, *30* (4), 1174–1184.
- (5) Wang, Y.; Chen, Q.; Jin, S.; Deng, W.; Li, S.; Tong, Q.; Chen, Y. Up-Regulation of P-Glycoprotein Is Involved in the Increased Paclitaxel Resistance in Human Esophageal Cancer Radioresistant Cells. *Scand. J. Gastroenterol.* **2012**, *47* (7), 802–808.
- (6) Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (3), 219–234.
- (7) Meng, H.; Mai, W. X.; Zhang, H.; Xue, M.; Xia, T.; Lin, S.; Wang, X.; Zhao, Y.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Codelivery of an Optimal Drug/SiRNA Combination Using Mesoporous Silica Nanoparticles to Overcome Drug Resistance in Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *ACS Nano* **2013**, *7* (2), 994–1005.
- (8) Esmaeili, M. A. Combination of SiRNA-Directed Gene Silencing with Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Reverses Drug Resistance in Human Breast Cancer Cells. *J. Chem. Biol.* **2016**, *9* (1), 41–52.
- (9) Dong, H.; Yao, L.; Bi, W.; Wang, F.; Song, W.; Lv, Y. Combination of Survivin SiRNA with Neoadjuvant Chemotherapy Enhances Apoptosis and Reverses Drug Resistance in Breast Cancer MCF-7 Cells. *J. Cancer Res. Ther.* **2015**, *11* (4), 717–722.
- (10) Yang, H.; Ding, R.; Tong, Z.; Huang, J.; Shen, L.; Sun, Y. U.; Liao, J.; Yang, Z.; Hoffman, R. M.; Wang, C.; Meng, X. SiRNA Targeting of MDR1 Reverses Multidrug Resistance in a Nude Mouse Model of Doxorubicin-Resistant Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* **2016**, *36* (6), 2675–2682.
- (11) Li, T.; Shen, X.; Geng, Y.; Chen, Z.; Li, L.; Li, S.; Yang, H.; Wu, C.; Zeng, H.; Liu, Y. Folate-Functionalized Magnetic-Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug/Gene Codelivery To Potentiate the Antitumor Efficacy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (22), 13748–13758.
- (12) Gandhi, N. S.; Tekade, R. K.; Chougule, M. B. Nanocarrier Mediated Delivery of SiRNA/MiRNA in Combination with Chemotherapeutic Agents for Cancer Therapy: Current Progress and Advances. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *194*, 238–256.
- (13) Wang, M.; Wang, J.; Li, B.; Meng, L.; Tian, Z. Recent Advances in Mechanism-Based Chemotherapy Drug-SiRNA Pairs in Co-Delivery Systems for Cancer: A Review. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *157*, 297–308.
- (14) Yin, F.; Yang, C.; Wang, Q.; Zeng, S.; Hu, R.; Lin, G.; Tian, J.; Hu, S.; Lan, R. F.; Yoon, H. S.; Lu, F.; Wang, K.; Yong, K.-T. A Light-Driven Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma Using Gold Nanorods-Based Nanocarriers for Co-Delivery of Doxorubicin and SiRNA. *Theranostics* **2015**, *5* (8), 818–833.

- (15) Hanafi-Bojd, M. Y.; Jaafari, M. R.; Ramezani, N.; Abnous, K.; Malaekheh-Nikouei, B. Co-Delivery of Epirubicin and siRNA Using Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Enhances In Vitro and In Vivo Drug Efficacy. *Curr. Drug Deliv.* **2016**, *13* (7), 1176–1182.
- (16) Shen, J.; Yin, Q.; Chen, L.; Zhang, Z.; Li, Y. Co-Delivery of Paclitaxel and Survivin ShRNA by Pluronic P85-PEI/TPGS Complex Nanoparticles to Overcome Drug Resistance in Lung Cancer. *Biomaterials* **2012**, *33* (33), 8613–8624.
- (17) Gao, J.; Long, B.; Wang, Z. Role of Notch Signaling Pathway in Pancreatic Cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7* (2), 173–186.
- (18) Shen, S.; Sun, C.-Y.; Du, X.-J.; Li, H.-J.; Liu, Y.; Xia, J.-X.; Zhu, Y.-H.; Wang, J. Co-Delivery of Platinum Drug and siNotch1 with Micelleplex for Enhanced Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Biomaterials* **2015**, *70*, 71–83.
- (19) Pereira, S.; Lee, J.; Rubio, N.; Hassan, H. A. F. M.; Suffian, I. B. M.; Wang, J. T. W.; Klippstein, R.; Ballesteros, B.; Al-Jamal, W. T.; Al-Jamal, K. T. Cationic Liposome-Multi-Walled Carbon Nanotubes Hybrids for Dual siPLK1 and Doxorubicin Delivery In Vitro. *Pharm. Res.* **2015**, *32* (10), 3293–3308.
- (20) Gao, J.; Chen, H.; Yu, Y.; Song, J.; Song, H.; Su, X.; Li, W.; Tong, X.; Qian, W.; Wang, H.; Dai, J.; Guo, Y. Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Growth Using Immunoliposomes for Co-Delivery of Adriamycin and Ribonucleotide Reductase M2 siRNA. *Biomaterials* **2013**, *34* (38), 10084–10098.
- (21) Gandhi, N. S.; Tekade, R. K.; Chougule, M. B. Nanocarrier Mediated Delivery of siRNA/MiRNA in Combination with Chemotherapeutic Agents for Cancer Therapy: Current Progress and Advances. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *194C*, 238–256.
- (22) Godsey, M. E.; Suryaprakash, S.; Leong, K. W. Materials Innovation for Co-Delivery of Diverse Therapeutic Cargos. *RSC Adv.* **2013**, *3* (47), 24794–24811.
- (23) Zhao, J.; Feng, S.-S. Nanocarriers for Delivery of siRNA and Co-Delivery of siRNA and Other Therapeutic Agents. *Nanomed.* **2015**, *10* (14), 2199–2228.
- (24) Babu, A.; Munshi, A.; Ramesh, R. Combinatorial Therapeutic Approaches with RNAi and Anticancer Drugs Using Nanodrug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43* (9), 1391–1401.
- (25) Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P. Multifunctional Polymeric Micelles for Delivery of Drugs and siRNA. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*.
- (26) Sun, H.; Yarovoy, I.; Capeling, M.; Cheng, C. Polymers in the Co-Delivery of siRNA and Anticancer Drugs for the Treatment of Drug-Resistant Cancers. *Top. Curr. Chem. J.* **2017**, *375* (2), 24.
- (27) Zununi Vahed, S.; Salehi, R.; Davaran, S.; Sharifi, S. Liposome-Based Drug Co-Delivery Systems in Cancer Cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *71*, 1327–1341.
- (28) Qu, M.-H.; Zeng, R.-F.; Fang, S.; Dai, Q.-S.; Li, H.-P.; Long, J.-T. Liposome-Based Co-Delivery of siRNA and Docetaxel for the Synergistic Treatment of Lung Cancer. *Int. J. Pharm.* **2014**, *474* (1–2), 112–122.
- (29) Yao, Y.; Su, Z.; Liang, Y.; Zhang, N. PH-Sensitive Carboxymethyl Chitosan-Modified Cationic Liposomes for Sorafenib and siRNA Co-Delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 6185–6197.
- (30) Yang, T.; Li, B.; Qi, S.; Liu, Y.; Gai, Y.; Ye, P.; Yang, G.; Zhang, W.; Zhang, P.; He, X.; Li, W.; Zhang, Z.; Xiang, G.; Xu, C. Co-Delivery of Doxorubicin and Bmi1 siRNA by Folate Receptor Targeted Liposomes Exhibits Enhanced Anti-Tumor Effects in Vitro and in Vivo. *Theranostics* **2014**, *4* (11), 1096–1111.

- (31) Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P. Multifunctional Polymeric Micelles for Delivery of Drugs and siRNA. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*.
- (32) Fu, Y.; Kao, W. J. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-Degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7* (4), 429–444.
- (33) Feng, S.-S.; Chien, S. Chemotherapeutic Engineering: Application and Further Development of Chemical Engineering Principles for Chemotherapy of Cancer and Other Diseases. *Chem. Eng. Sci.* **2003**, *58* (18), 4087–4114.
- (34) Su, W.-P.; Cheng, F.-Y.; Shieh, D.-B.; Yeh, C.-S.; Su, W.-C. PLGA Nanoparticles Codeliver Paclitaxel and Stat3 siRNA to Overcome Cellular Resistance in Lung Cancer Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 4269–4283.
- (35) Patil, Y. B.; Swaminathan, S. K.; Sadhukha, T.; Ma, L.; Panyam, J. The Use of Nanoparticle-Mediated Targeted Gene Silencing and Drug Delivery to Overcome Tumor Drug Resistance. *Biomaterials* **2010**, *31* (2), 358–365.
- (36) Sun, T.-M.; Du, J.-Z.; Yao, Y.-D.; Mao, C.-Q.; Dou, S.; Huang, S.-Y.; Zhang, P.-Z.; Leong, K. W.; Song, E.-W.; Wang, J. Simultaneous Delivery of siRNA and Paclitaxel via a “Two-in-One” Micelleplex Promotes Synergistic Tumor Suppression. *ACS Nano* **2011**, *5* (2), 1483–1494.
- (37) Zheng, C.; Zheng, M.; Gong, P.; Deng, J.; Yi, H.; Zhang, P.; Zhang, Y.; Liu, P.; Ma, Y.; Cai, L. Polypeptide Cationic Micelles Mediated Co-Delivery of Docetaxel and siRNA for Synergistic Tumor Therapy. *Biomaterials* **2013**, *34* (13), 3431–3438.
- (38) Menjoge, A. R.; Kannan, R. M.; Tomalia, D. A. Dendrimer-Based Drug and Imaging Conjugates: Design Considerations for Nanomedical Applications. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (5–6), 171–185.
- (39) Hu, J.; Xu, T.; Cheng, Y. NMR Insights into Dendrimer-Based Host–Guest Systems. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 3856–3891.
- (40) Kaneshiro, T. L.; Lu, Z.-R. Targeted Intracellular Codelivery of Chemotherapeutics and Nucleic Acid with a Well-Defined Dendrimer-Based Nanoglobular Carrier. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5660–5666.
- (41) Xiao, Y.; Jaskula-Sztul, R.; Javadi, A.; Xu, W.; Eide, J.; Dammalapati, A.; Kunnimalaiyaan, M.; Chen, H.; Gong, S. Co-Delivery of Doxorubicin and siRNA Using Octreotide-Conjugated Gold Nanorods for Targeted Neuroendocrine Cancer Therapy. *Nanoscale* **2012**, *4* (22), 7185–7193.
- (42) Meng, H.; Liang, M.; Xia, T.; Li, Z.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and P-Glycoprotein siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line. *ACS Nano* **2010**, *4* (8), 4539–4550.
- (43) Zhang, Y.; Schwerbrock, N. M.; Rogers, A. B.; Kim, W. Y.; Huang, L. Codelivery of VEGF siRNA and Gemcitabine Monophosphate in a Single Nanoparticle Formulation for Effective Treatment of NSCLC. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2013**, *21* (8), 1559–1569.
- (44) Zitouni, S.; Nabais, C.; Jana, S. C.; Guerrero, A.; Bettencourt-Dias, M. Polo-like Kinases: Structural Variations Lead to Multiple Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (7), 433–452.
- (45) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Targeting Polo-like Kinase 1 for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (4), 321–330.
- (46) Judge, A. D.; Robbins, M.; Tavakoli, I.; Levi, J.; Hu, L.; Fronda, A.; Ambegia, E.; McClintock, K.; MacLachlan, I. Confirming the RNAi-Mediated Mechanism of Action of siRNA-Based Cancer Therapeutics in Mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (3), 661–673.

- (47) Janning, M.; Fiedler, W. Volasertib for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Review of Preclinical and Clinical Development. *Future Oncol. Lond. Engl.* **2014**, *10* (7), 1157–1165.
- (48) Spänkuch, B.; Kurunci-Csacsco, E.; Kaufmann, M.; Strebhardt, K. Rational Combinations of SiRNAs Targeting Plk1 with Breast Cancer Drugs. *Oncogene* **2007**, *26* (39), 5793–5807.
- (49) Li, Y.; Liu, R.; Yang, J.; Ma, G.; Zhang, Z.; Zhang, X. Dual Sensitive and Temporally Controlled Camptothecin Prodrug Liposomes Codelivery of SiRNA for High Efficiency Tumor Therapy. *Biomaterials* **2014**, *35* (36), 9731–9745.
- (50) Venditto, V. J.; Simanek, E. E. Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of the *in Vivo* Literature. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (2), 307–349.
- (51) Yao, D.; Li, S.; Zhu, X.; Wu, J.; Tian, H. Tumor-Cell Targeting Polydiacetylene Micelles Encapsulated with an Antitumor Drug for the Treatment of Ovarian Cancer. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2017**, *53* (7), 1233–1236.
- (52) Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (3), 621–681.
- (53) Morris, P. G.; Fournier, M. N. Microtubule Active Agents: Beyond the Taxane Frontier. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (22), 7167–7172.

Chapitre IV

-

Fonctionnalisation des micelles polydiacétyléniques pour un ciblage actif

Dans le chapitre précédent, nous avons développé des micelles PDA qui permettent une co-délivrance d'un siARN et d'un anticancéreux. Grâce à leur petite taille, nous avons supposé que ces nanovecteurs étaient capables d'entraîner un ciblage passif des tumeurs. Or, ils ne permettent pas un ciblage direct, dit actif des cellules cancéreuses. Dans la suite de nos travaux, nous avons donc décidé de décorer nos micelles avec des anticorps afin de permettre un ciblage cellulaire des cellules tumorales. De plus, la sensibilité au sérum restant une des principales limites de notre système, il est possible que les anticorps permettent, en masquant par exemple partiellement les charges cationiques de la micelle, une réduction des interactions avec les protéines plasmatiques.

Après une brève introduction sur les anticorps et leur utilisation en tant que biomolécules d'adressage, la construction et l'évaluation de micelles-PDA fonctionnalisées par un anticorps ciblant spécifiquement les cellules surexprimant les récepteurs HER2 seront présentées.

I. Les anticorps comme molécule d'adressage

I.1 Structure des anticorps

Les anticorps sont des macromolécules possédant une structure de base constituée de deux chaînes polypeptidiques lourdes identiques et de 2 chaînes légères polypeptidiques identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures. Ces différentes chaînes sont caractérisées par l'enchaînement de domaines homologues représentant des boucles peptidiques d'environ 60 à 70 résidus acides aminés. Les chaînes légères contiennent chacune deux domaines dont un variable et un constant alors que les chaînes lourdes sont composées de quatre domaines dont un seul variable (Figure 87).¹ Les anticorps, également appelés immunoglobulines (Ig), présentent différents fragments :

- Le fragment Fc ou fragment cristallisable, porteur des fonctions effectrices de l'anticorps. Il permet la liaison avec les récepteurs spécifiques du Fc et l'activation du complément.
- Les fragments Fab et F(ab')₂ sont responsables de la liaison avec l'antigène.
- Le fragment Fv est composé de la partie variable de la chaîne lourde et légère. C'est le plus petit fragment et il permet de conserver la spécificité de l'anticorps parental.

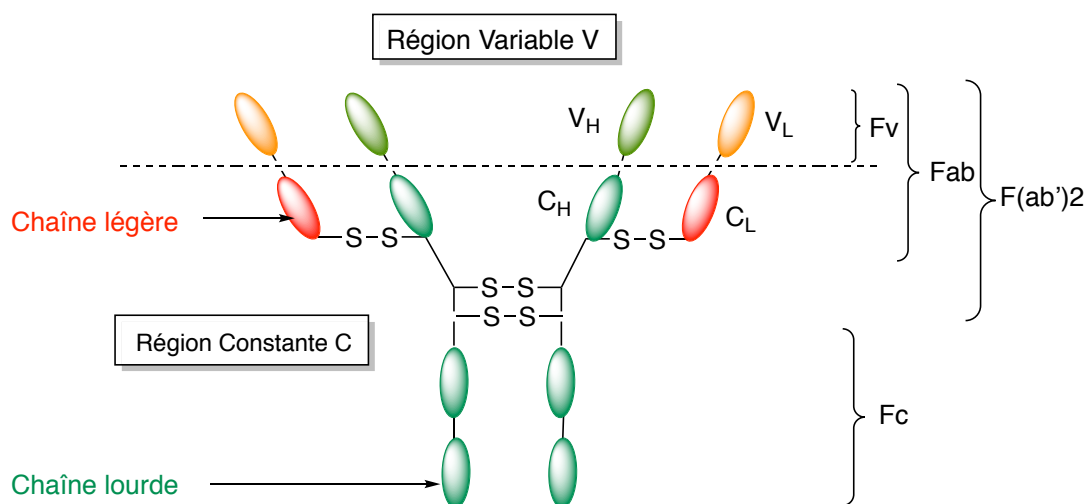


Figure 87 : Structure générale d'un anticorps.

Plusieurs classes d'anticorps sont distinguées en fonction de la nature de leurs chaînes lourdes. Ainsi, on retrouve les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD possédant respectivement une chaîne α , γ , μ , ϵ et δ .² Ces différences structurales permettent aux anticorps de jouer des rôles différents au sein des cellules (Tableau 13).

	Localisation	Proportion	Fonction
IgG	Sang	70 % - 75 %	Immunité contre les pathogènes
IgA	Muqueuses et sécrétions	10 % - 15%	Immunité contre les pathogènes et agglutination
IgM	Lymphocyte B et sang	10 %	Agglutination et activation des compléments
IgE	Basophiles et mastocytes	< 1 %	Allergies et protection contre les parasites
IgD	Lymphocyte B	< 1 %	Activation des lymphocytes B

Tableau 13 : Propriétés relatives aux différentes classes d'anticorps.

Les antigènes possèdent un ou plusieurs sites de liaison potentiels (épitopes) avec l'anticorps correspondant. Les anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène reconnaissent uniquement un épitope de cet antigène alors que les anticorps polyclonaux, mélange hétérogène d'anticorps monoclonaux reconnaissent différents épitopes d'un même antigène.

I.2 Utilisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Au cours des dernières années, les anticorps monoclonaux sont devenus un outil incontournable notamment pour le traitement des cancers³ en raison de leur faculté à reconnaître un antigène spécifique de manière régulière.

Les premiers anticorps monoclonaux ont été développés en 1975 par Köhler et Milstein.⁴ Très vite, ces anticorps de type murin se sont révélés très immunogènes et induisaient de nombreux effets secondaires chez l'homme. Pour pallier ce problème, il a donc fallu concevoir de nouveaux anticorps moins immunogènes. C'est ainsi que successivement par des techniques de biologie moléculaire, les anticorps chimériques, humanisés et humains ont été développés, permettant ainsi d'ouvrir la voie à la conception de nouveaux médicaments (Figure 88).^{5,6}

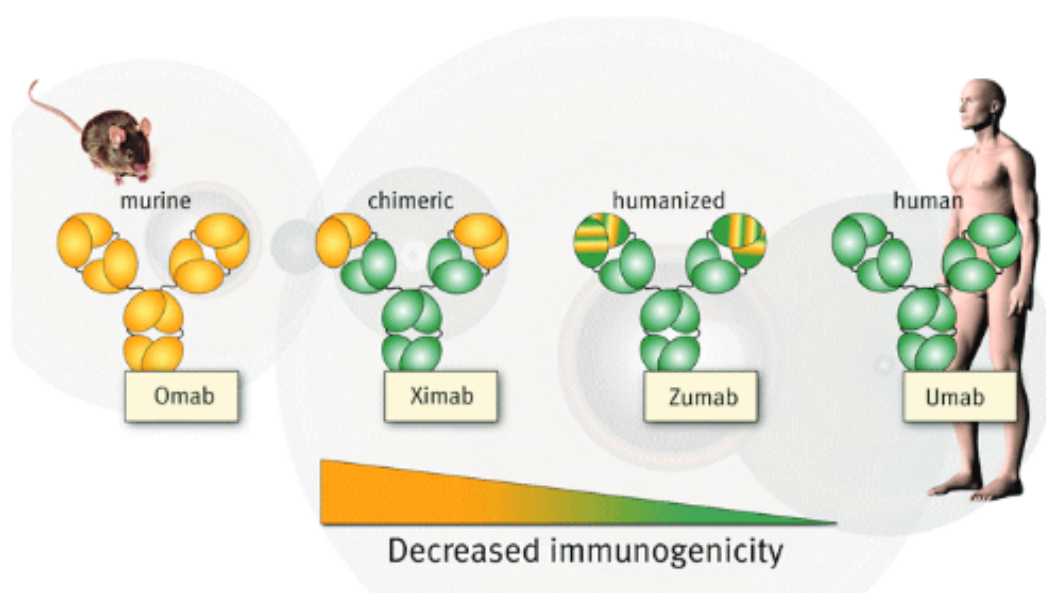


Figure 88 : Classification des différents anticorps monoclonaux (murin, chimérique, humanisé et humain) (d'après Joost Bakker, Genmab).

Le développement de ces anticorps a permis de véhiculer de manière ciblée des molécules d'intérêt tels que des isotopes radioactifs, des toxines⁷ ou encore des enzymes⁸ dans leurs sites d'action. On retrouve deux stratégies principales qui permettent de concevoir des anticorps (Ac) dits armés (Figure 89).

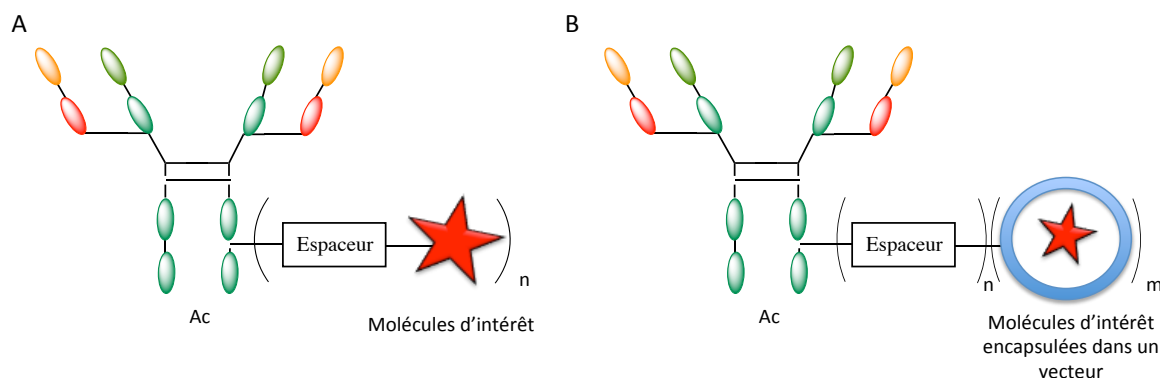


Figure 89 : Stratégies principales de ciblage par les anticorps monoclonaux. A. Stratégie directe : liaison de la molécule d'intérêt directement sur l'anticorps *via* un espaceur. B. Stratégie indirecte : encapsulation des molécules d'intérêt dans un vecteur lié de manière stable à l'anticorps.

Une première stratégie consiste à conjuguer directement les anticancéreux aux anticorps par liaison covalente (ADC *antibody-drug conjugate* en anglais) (Figure 89A).⁹ L'anticorps joue donc un double rôle puisqu'il est utilisé comme agent de ciblage mais également comme vecteur. Une fois le système formulé, les anticorps permettent l'internalisation des molécules d'intérêt par reconnaissance spécifique des récepteurs exprimés à la surface de la cellule. Afin d'obtenir un effet efficace, plusieurs critères doivent être pris en compte lors de la conception de ces anticorps armés. Tout d'abord, il est nécessaire de conjuguer la molécule d'intérêt sur l'anticorps de façon à ne pas interférer avec le site de liaison de l'antigène. En générale, ces couplages chimiques sont effectués sur la partie constante de l'anticorps. Puis les anticancéreux ainsi que les espaceurs utilisés doivent être stables dans la circulation sanguine de manière à ne pas être dégradés avant internalisation dans les cellules.

À l'heure actuelle, il y a plus de 40 ADC en phase clinique et trois sont déjà été acceptés sur le marché : le gemtuzumab-ozogamicin pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë, le brentuximab-vedotin pour les patients atteints d'un lymphome de Hodgkin et le trastuzumab - emtansine pour le traitement du cancer du sein métastasé.¹⁰

La deuxième approche consiste, quant à elle, à conjuguer indirectement les anticorps aux molécules anticancéreuses par le biais de nanoparticules tels que des liposomes, des polymères ou encore des micelles polymériques (Figure 89B).¹¹⁻¹⁴ Les molécules d'intérêt sont encapsulées dans le nanovecteur qui est lui-même lié à l'anticorps. Dans ce cas, l'anticorps devient un agent de fonctionnalisation qui permet le ciblage spécifique. L'intérêt de cette approche est multiple (Figure 90). Elle permet par exemple la protection des principes actifs dans le sang, l'utilisation d'anticancéreux divers (hydrophiles, hydrophobes, peu ou très toxiques) et l'augmentation de la concentration locale en principe actif comparée à

celle de l'anticorps car la nanoparticule permet un chargement plus important en agent cytotoxique. Pour ces deux approches, le problème majeur de la synthèse de ces édifices réside dans le contrôle du degré de conjugaison entre les différents éléments.

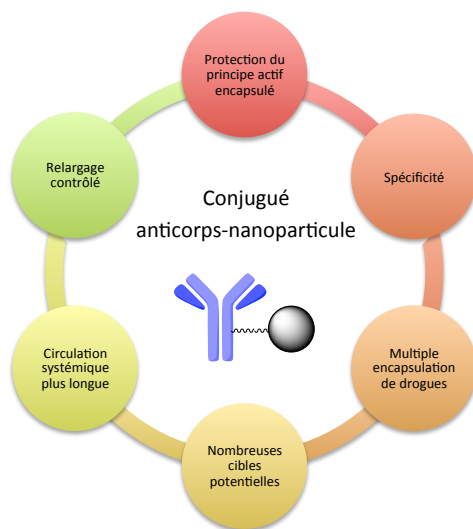


Figure 90 : Avantage des conjugués formés entre une nanoparticule et un anticorps

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes tournés vers la deuxième stratégie à savoir le couplage d'un anticorps sur un vecteur. En effet, nous avons souhaité développer les micelles polydiacétyléniques ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses après couplage à un anticorps.

I.3 Stratégies de conjugaison pour coupler un anticorps à une nanoparticule

Plusieurs stratégies ont été mises au point pour conjuguer les anticorps aux différentes fonctions réactives présentes à la surface des nanoparticules.¹⁵⁻¹⁷ La sélection de la stratégie adéquate n'est pas triviale car elle doit permettre de préserver les capacités de ciblage de l'anticorps ainsi que les propriétés de délivrance du nanovecteur. Les conjugaisons peuvent être répertoriées en deux classes, les stratégies de couplage covalent et non-covalent.

I.3.1 Conjugaison par couplage covalent

Dans les stratégies de conjugaison covalente, l'anticorps peut être directement greffé sur le vecteur (couplage direct) ou bien par l'intermédiaire d'un espaceur bi-fonctionnel (couplage indirect).

I.3.1.1 Couplage direct

Les deux méthodes de conjugaison directe des anticorps les plus couramment utilisées s'appuient sur des réactions chimiques réalisées sur les résidus lysines ou cystéines portés par l'anticorps.

Réactions sur les cystéines

Sur un anticorps monoclonal humain, il existe 4 ponts disulfures qui peuvent être utilisés comme site de conjugaison. Dans cette approche, la première étape consiste à réduire ces liaisons disulfures en utilisant par exemple le TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine) ou DTT (dithiothréitol) permettant ainsi de générer 2, 4, 6 ou 8 groupements thiols libres.

Ensuite, différents groupements électrophiles peuvent être additionnés afin d'obtenir les anticorps modifiés (Figure 91). Les réactions d'alkylation faisant intervenir un groupement maléimide ou haloacétyle sont les plus couramment utilisées.^{18,19} Elles permettent de créer une liaison thioéther.

On trouve également dans la littérature des vecteurs greffés aux anticorps par reconstruction d'un pont disulfure entre l'anticorps et la molécule d'intérêt.²⁰

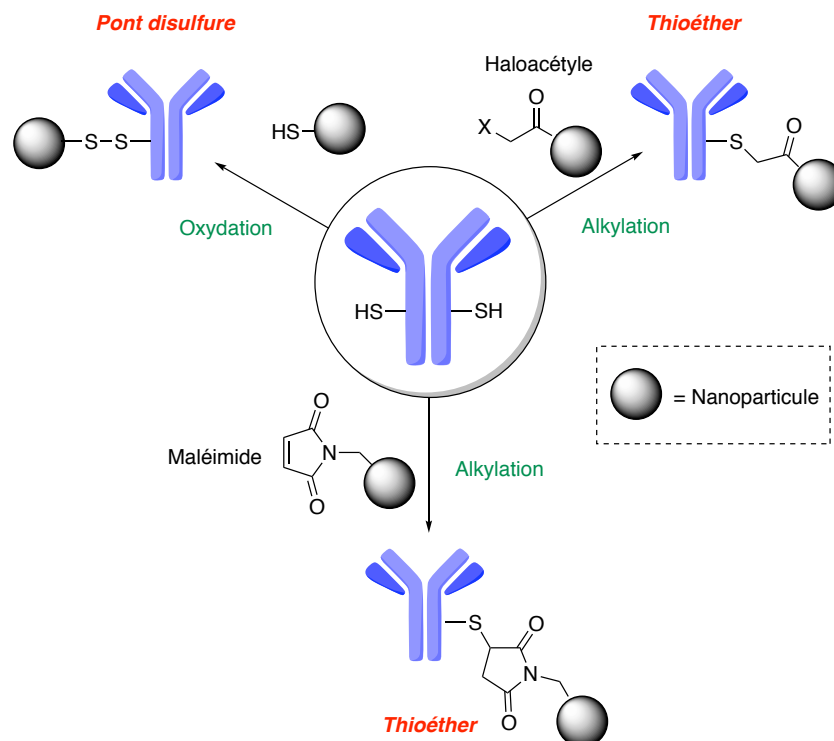


Figure 91 : Réactions couramment utilisées pour réaliser un couplage sur les cystéines.

Réaction sur les lysines

Les lysines étant présentes en quantité importante à la « surface » de l'anticorps (environ 90), elle sont également très utilisées pour la conjugaison. En général, celle-ci est réalisée *via* la création d'une liaison amide formée à partir d'un ester activé (NHS, pentafluorophénol...) et l'amine primaire du résidu lysine.^{21,22} La réaction peut également être réalisée avec un réactif isothiocyanate qui permet cette fois-ci d'obtenir une liaison thio-urée (Figure 92).

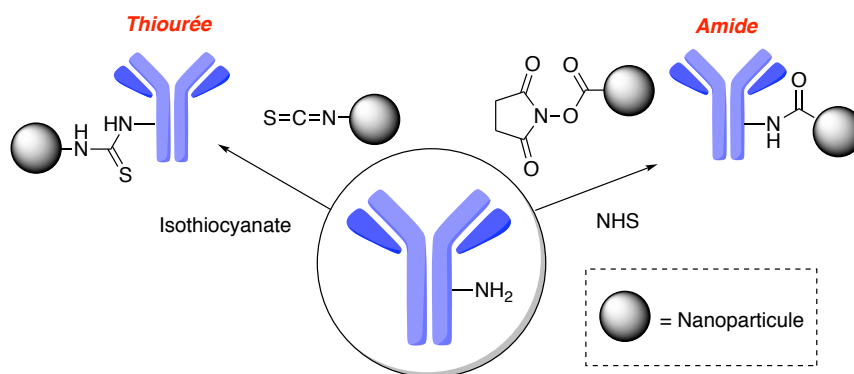


Figure 92 : Réactions couramment utilisées pour réaliser un couplage sur les lysines.

I.3.1.2 Couplage indirect

Si les groupements adéquats au couplage ne sont pas présents sur les vecteurs, ils peuvent être introduits grâce à des espaceurs homo- ou hétéro-bifonctionnels possédant respectivement deux groupements chimiques identiques ou différents (Figure 93).

Les agents homo-bifonctionnels tels que le glutaraldéhyde ou le subérimidate diméthyle peuvent être utilisés, par exemple, pour des couplages amine-amine.²³ Certains, tel que le dibromobimane, peuvent également être utilisés dans le but de stabiliser directement des ponts disulfures formés entre les différentes entités.²⁴

On retrouve également des espaceurs hétérobifonctionnels qui représentent un outil puissant pour la conjugaison anticorps-vecteur puisqu'ils permettent de faciliter cette dernière en donnant accès à une multitude de fonctions réactionnelles. Trois grandes classes de réaction sont classiquement utilisées : les réactions entre amine et thiol, acide carboxylique et amine et chimie « click ».

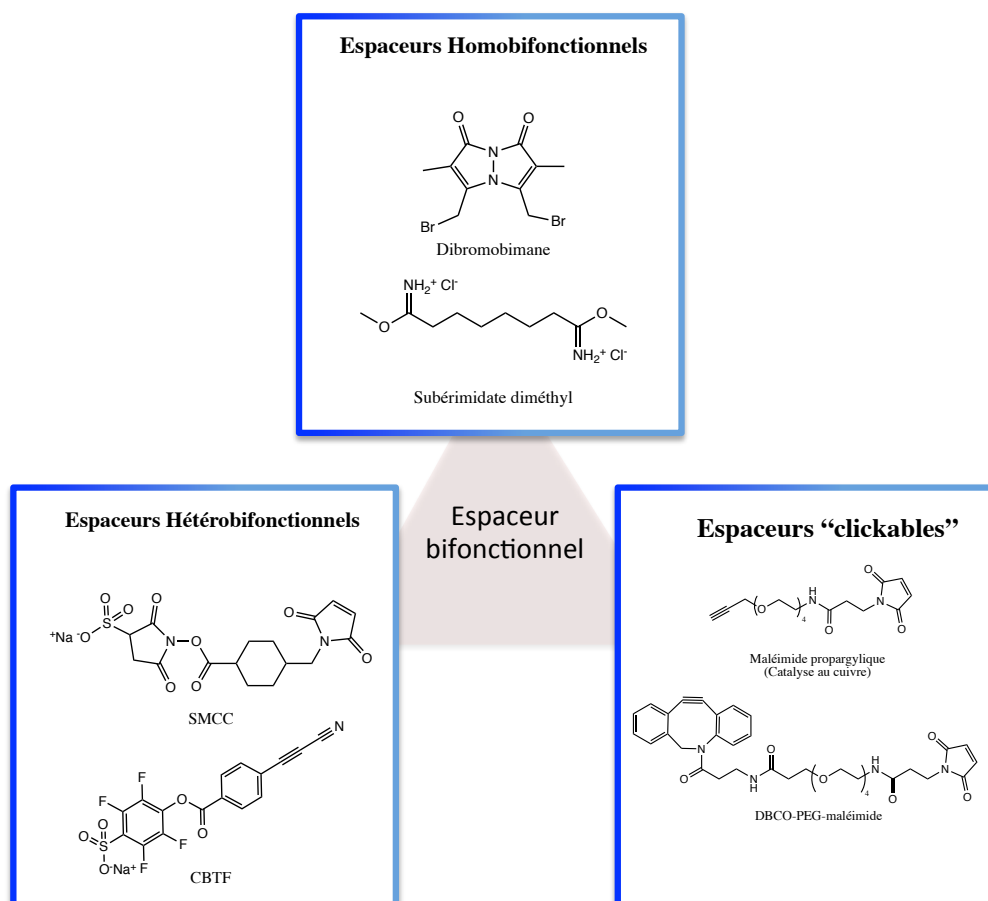


Figure 93 : Structures de quelques espaceurs bifonctionnels.

Ici, on pourrait citer comme espaceur le composé SMCC²⁵ (succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate) ou encore le CBTF²⁶ (4-((4-(cyanoéthynyl)benzoyl)oxy)2,3,5,6-tetrafluorobenzènesulfonate), récemment développé par notre unité de recherche (Syndivia/CNRS).

I.3.2 Association par couplage non-covalent

Un couplage non covalent peut également être réalisé pour associer l'anticorps à la nanoparticule. La simplicité et la rapidité de mise en œuvre sont les principaux avantages de cette stratégie. En effet, l'adsorption physique est une méthode d'association basée sur des forces attractives telles que les forces de van der Waals, les liaisons hydrogènes, l'hydrophobie ou encore les interactions électrostatiques et se réalise par mélange des deux composés.²⁷ Ainsi en exploitant ces phénomènes physiques naturels, il est possible de réaliser des couplages en s'appuyant sur l'affinité ligand-récepteur, l'hybridation de brins d'ADN ou encore la chélation (His-tag). Quelques exemples illustrant ces alternatives sont décrits dans la Figure 94.

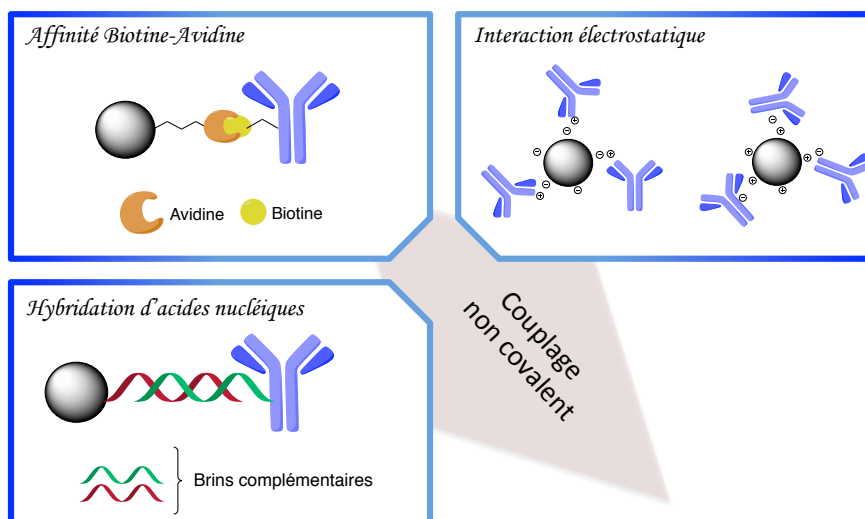


Figure 94: Exemples de couplage non covalent entre un anticorps et une nanoparticule.

Par exemple, Huang *et al.* ont réussi à conjuguer un anticorps monoclonal sur des nanoparticules en utilisant l'adsorption physique. En effet, l'anticorps anti-EGFR est lié par interaction électrostatique à des nanobilles d'or préalablement décorés avec du poly(styrènesulfonate). Ce conjugué a permis d'augmenter l'internalisation des nanobilles dans des cellules cancéreuses HOC 313 clone 8 comparé à celle dans les cellules saines résultant en une augmentation de la réponse en thérapie photothermale ce qui a permis de réduire l'énergie nécessaire pour causer la mort de ces cellules.²⁸

On retrouve également des couplages non-covalents basés sur la reconnaissance moléculaires : l'hybridation entre deux brins d'ADN complémentaires. A titre d'exemple, J. Lee *et al.* ont décrit la synthèse d'un conjugué anticorps-particule d'or s'appuyant sur ce phénomène. D'une part, la nanoparticule d'or est fonctionnalisée par un brin d'ADN. D'autre part un oligonucléotide comportant une modification thiol est conjugué par le biais de l'espaceur bifonctionnel SMCC à une streptavidine qui est par la suite fixée à un anticorps biotinylé. Enfin les deux parties sont connectées par hybridation des deux brins d'ADN complémentaire.²⁹

Une autre stratégie robuste basée sur la reconnaissance moléculaire s'appuie sur l'affinité entre la biotine et la streptavidine.^{30,31} Deux stratégies de conjugaison peuvent alors être mises en jeu:

- (i) L'anticorps est conjugué avec la streptavidine et le ligand avec la biotine puis les deux sont mélangés.³²
- (ii) L'anticorps biotinylé est tout d'abord incubé avec les cellules surexprimant l'antigène spécifique, suivie de l'addition de la streptavidine et du vecteur

biotinylé.³³ Cette stratégie multi-étapes faisant intervenir une étape de « pretargeting » a permis un ciblage hautement spécifique.

II. Contexte et objectifs

La surexpression du récepteur de facteur de croissance épidermique dans le cancer du sein est généralement associée à des cancers agressifs où le pronostic est en général mauvais. Le trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal humanisé spécifique des récepteurs HER2, a été approuvé pour le traitement du cancer gastrique et du sein.³⁴ Bien que ce traitement soit très efficace, les mécanismes de résistance primaire et acquise à l'anticorps restent un problème majeur. Récemment, des chercheurs ont développé un immuno-conjugué (trastuzumab-emtansine) capable d'inhiber la croissance des tumeurs résistantes.³⁵

Dans le cadre de ce projet, nous avons souhaité développer une immuno-micelle conçue à partir des micelles polydiacétyléniques et d'anticorps pour co-délivrer spécifiquement dans les cellules tumorales un siARN cytotoxique et un anti-tumoral.

Pour cela deux stratégies de synthèse ont été envisagées :

- (i) Une approche covalente permettant de lier l'anticorps à la micelle *via* l'utilisation d'espaces hétérobifonctionnels (Figure 95).

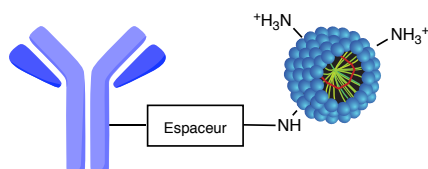


Figure 95 : Approche covalente.

- (ii) Une approche non-covalente permettant de lier par interaction électrostatique l'anticorps à la micelle cationique *via* l'utilisation d'un oligonucléotide anionique préalablement introduit sur l'anticorps (Figure 96).

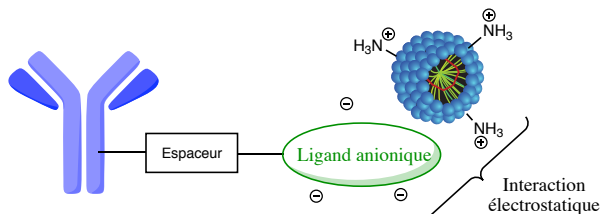


Figure 96 : Approche non covalente.

Une fois les plateformes développées, l'efficacité de ces systèmes a été testée *in vitro* sur des lignées cellulaires du cancer du sein.

III. Fonctionnalisation des micelles : approche covalente

Deux stratégies de couplage ont été étudiées. Cependant, par manque de temps, les résultats présentés dans cette partie sont des tests préliminaires qui devront être approfondis par la suite.

III.1 Couplage entre la micelle PDA fonctionnalisée par un alcyne et un anticorps-azoture par cyclo-addition azoture-alcyne tendu

La conception des immuno-conjugués est généralement réalisée par réaction directe entre deux molécules complexes, une protéine et un ester activé présent sur la molécule d'intérêt. Cependant, avec cette approche classique il est difficile de pouvoir prédire le résultat de la conjugaison en raison d'une stabilité et d'une réactivité imprévisible de l'ester activé, dépendant de la nature de l'espaceur et de la molécule. Par conséquent, il est nécessaire de réaliser une optimisation des conditions de conjugaison pour chaque changement de molécule. Pour contourner ces limitations, une stratégie de couplage en deux temps a été développée : la stratégie « plug and play ». Celle-ci est caractérisée par une première étape universelle de modification de l'anticorps, permettant un contrôle rigoureux de la conjugaison. Cette première modification sert ensuite de point d'ancrage pour l'introduction de molécules diverses.³⁶

Récemment, l'équipe du Dr. Wagner a développé une nouvelle stratégie « plug and play » basée sur l'acylation contrôlée de l'anticorps permettant de coupler ce dernier à diverses molécules d'intérêt par chimie bio-orthogonale (Figure 97).³⁷

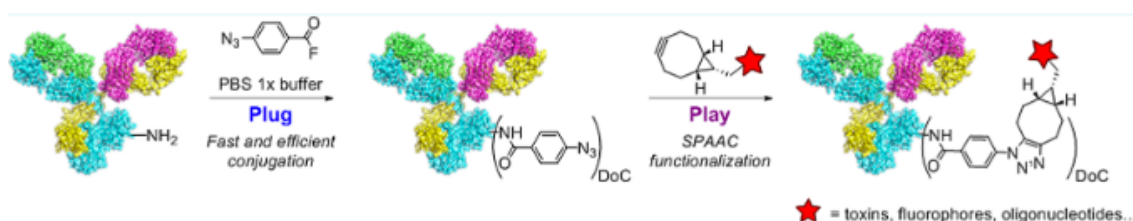


Figure 97 : Schéma de la stratégie « plug and play » du Dr. Wagner (d'après Dovgan et al. 2017).³⁷

Dans un premier temps, un groupement azoture est introduit sur l'anticorps natif par acylation des résidus lysines (Plug), puis il est conjugué à diverses molécules préalablement fonctionnalisées avec une bicyclononyne, par cycloaddition azoture-alcyne tendu (Play) (Figure 98). La versatilité de cette stratégie a été démontrée en conjuguant des toxines, des fluorophores ou encore des oligonucléotides.

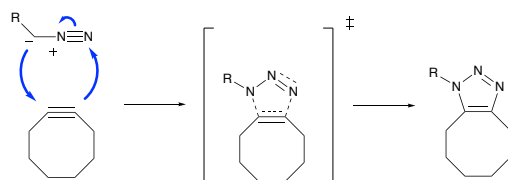


Figure 98 : Mécanisme de la cyclo-addition azoture-alcyne tendu.

En s'appuyant sur ces travaux, nous avons essayé de coupler de manière covalente la micelle préalablement modifiée par un alcyne tendu avec un anticorps possédant un groupement azoture (Figure 99).

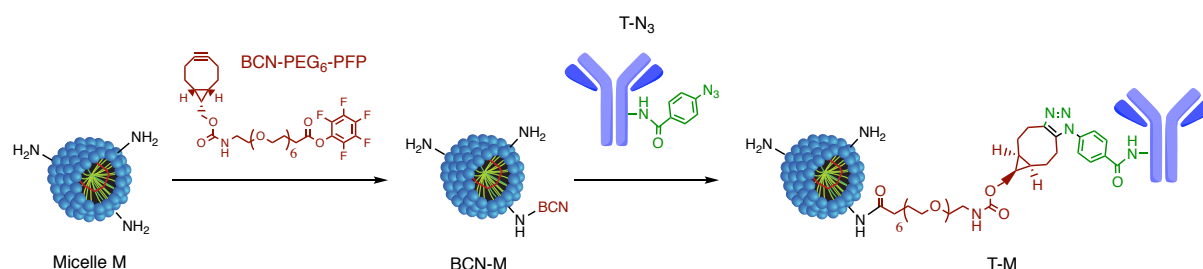


Figure 99 : Stratégie de synthèse. Conjugaison par cyclo-addition azoture-alcyne tendu.

La première étape consistait à greffer le groupement BCN-PEG₆-PFP (BiCycloNonyne-PEG₆-PentaFluoroPhenol) par couplage entre l'ester activé et les amines primaires de la micelle. L'espaceur hétérobifonctionnel BCN-PEG₆-PFP contenant un alcyne tendu ainsi qu'un ester activé a été synthétisé par l'équipe d'Alain Wagner. La synthèse totale ainsi que la caractérisation du composé sont décrits dans la publication *Dovgan et al. 2017*.³⁷

Pour la fonctionnalisation des micelles, le nombre d'équivalent des différents réactifs a été calculé en prenant pour référence la quantité de matière de monomères amines mise en jeu lors de la formulation des micelles.

Tout d'abord, la micelle (7 mM) est légèrement diluée dans un tampon phosphate salin (PBS, 100 mM, pH = 7,4), puis le composé BCN-PEG₆-PFP (0,1 éq./monomère amine) préalablement dissout dans le DMSO est ajouté et le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures (Figure 100). Afin de contrôler le greffage du BCN-PEG₆-PFP sur les micelles, nous avons ensuite fait réagir le conjugué micelle-BCN (BCN-M) avec un dérivé azoture fluorescent (TAMRA-PEG₆-N₃, 1,5 éq./éq. BCN-PEG₆-N₃ ajouté). En parallèle, un contrôle négatif consistant à mélanger le composé TAMRA-PEG₆-N₃ à la micelle non conjuguée au cycloalcyne est réalisé (Figure 100). Ce contrôle est nécessaire pour s'assurer que le fluorophore est bien greffé de manière covalente et non pas seulement encapsulé dans le cœur hydrophobe de la micelle.

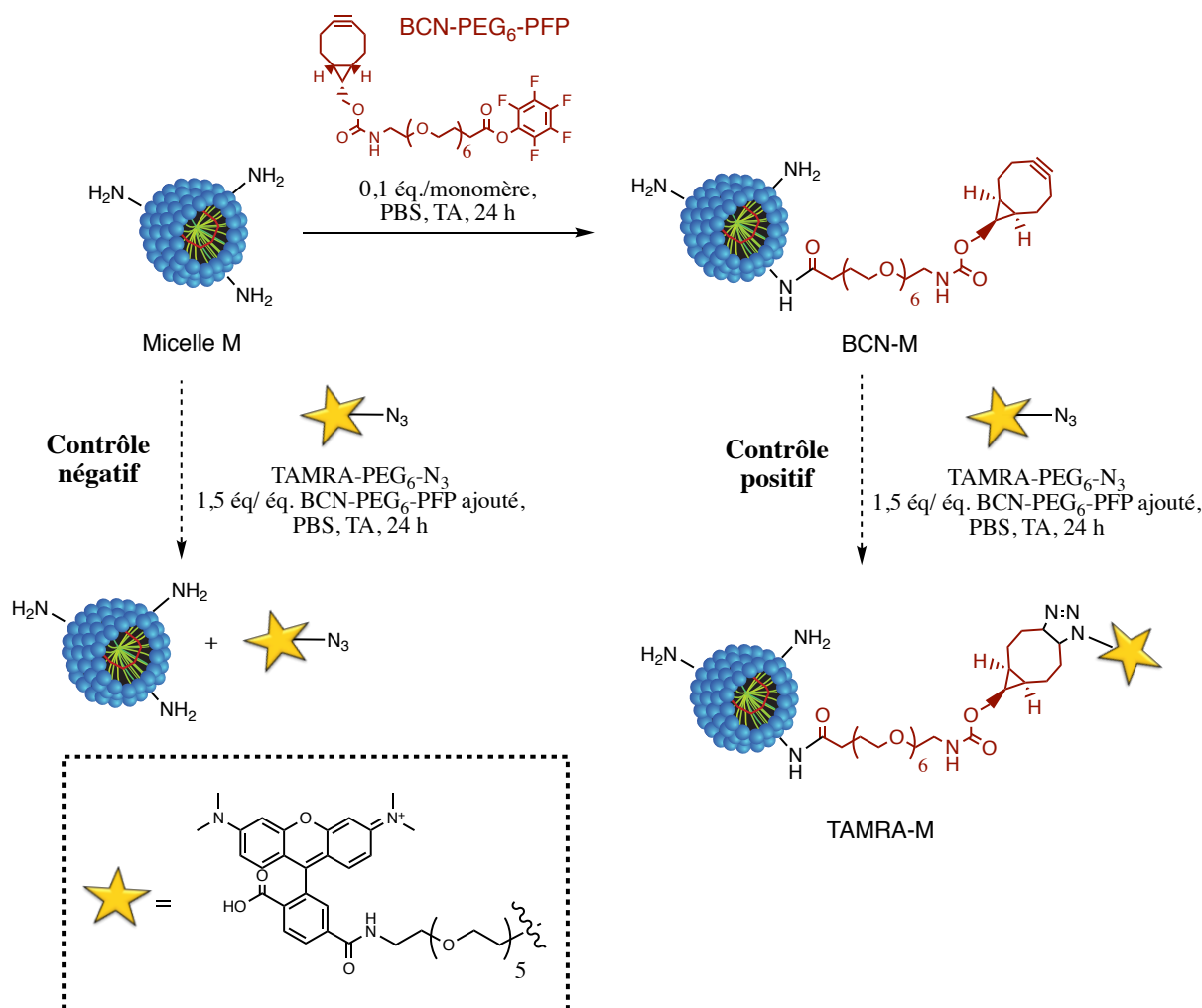


Figure 100 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation de la micelle par un bicyclononyne.

Après 24 heures de réaction, les solutions des deux réactions sont purifiées par gel filtration (Séphadex G-25). Deux fractions correspondant aux composés TAMRA-Micelle (TAMRA-M) et à l'excès de TAMRA-PEG₆-N₃ sont collectées, ce dernier éluant plus tardivement. De même pour la réaction contrôle, deux fractions correspondant cette fois-ci à la micelle seule et au TAMRA-PEG₆-N₃ sont obtenues après une élution similaire. Les fractions contenant les micelles sont reconnaissables par leur coloration jaune. Un spectre d'émission des différentes fractions a ensuite été enregistré (Figure 101).

Alors qu'aucune intensité de fluorescence n'est observée avec la première fraction récupérée suite à la réaction « contrôle négatif » (courbe noire), un signal à 580 nm correspondant au TAMRA est observé pour les deux fractions (TAMRA-M (courbe rouge et noir) et TAMRA-PEG₆-N₃ (courbe verte)), confirmant le couplage covalent entre la micelle et le BCN-PEG₆-PFP. Cependant, l'intensité de fluorescence du fluorophore de départ seul étant très importante par rapport à celle des fractions correspondant à la conjugaison, on en déduit que le couplage est faible (< 0,2 %). Ceci peut probablement s'expliquer par le caractère

hydrophobe du composé BCN-PEG₆-PFP qui limite sa solubilité dans l'eau et sa réaction avec les amines primaires situées sur la tête polaire de l'amphiphile. Cependant, en augmentant les équivalents de BCN-PEG₆-PFP introduits lors de la première étape, par exemple en mettant 0,2 éq., on assiste à une précipitation de la solution.

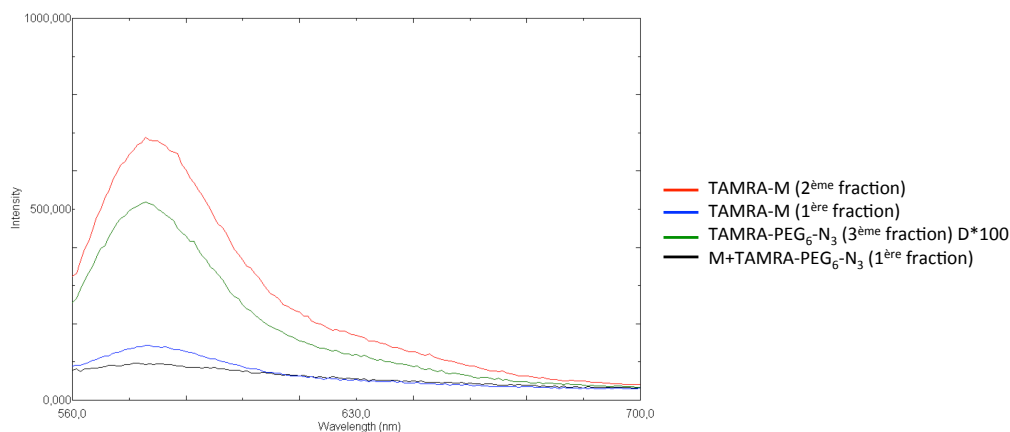


Figure 101 : Spectre de fluorescence des différentes fractions collectées. Les spectres correspondent aux TAMRA-M (rouge et bleu), TAMRA-PEG₆-N₃ dilué 100 fois (vert) et M+TAMRA-PEG₆-N₃ provenant de la réaction contrôlée (noir). Longueur d'onde d'excitation 553 nm.

Malgré ce faible degré de conjugaison du groupement BCN sur la micelle, nous avons réalisé la réaction entre l'anticorps-azoture (T-N₃, synthétisé par l'équipe d'Alain Wagner) et la micelle modifiée (BCN-M) en ajoutant 45 ou 90 équivalents de micelle modifiée (calculés en se basant sur la concentration en monomères amines ajoutés lors de la formulation en micelle) par rapport à l'anticorps.

Afin de confirmer la réaction de couplage entre les deux molécules, un gel SDS-PAGE a été réalisé (Figure 102). Les deux échantillons T-N₃ et T-M ont été préparés en conditions dénaturante et réductrice. Après migration des composés dans le gel, les bandes ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie. Aucune différence de migration n'est observée entre les différentes conditions reflétant l'absence de conjugaison entre les deux molécules.

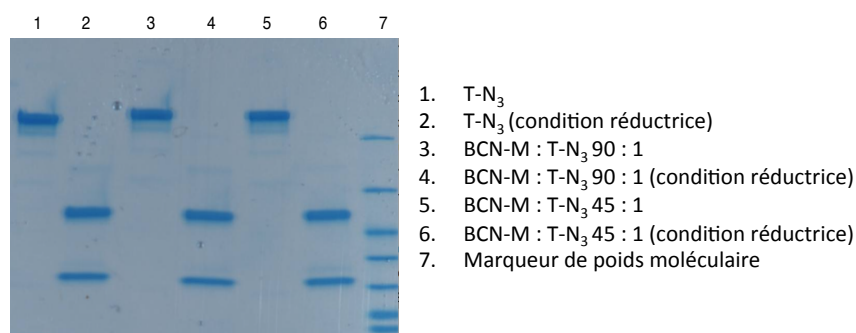


Figure 102 : Analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

En résumé, en raison du caractère hydrophobe du composé BCN-PEG₆-PFP, le couplage avec la micelle semble difficile. Deux alternatives peuvent alors être envisagées pour contourner le problème. La première consiste à rendre le BCN-PEG₆-PFP plus hydrophile en remplaçant par exemple l'ester activé pentafluorophénol par un analogue sulfonate ou en augmentant le nombre de motif éthylène glycol. La deuxième approche consisterait quant à elle à inverser la stratégie de synthèse en introduisant le groupement azoture sur la micelle et la bicyclononyne sur l'anticorps (Figure 103).

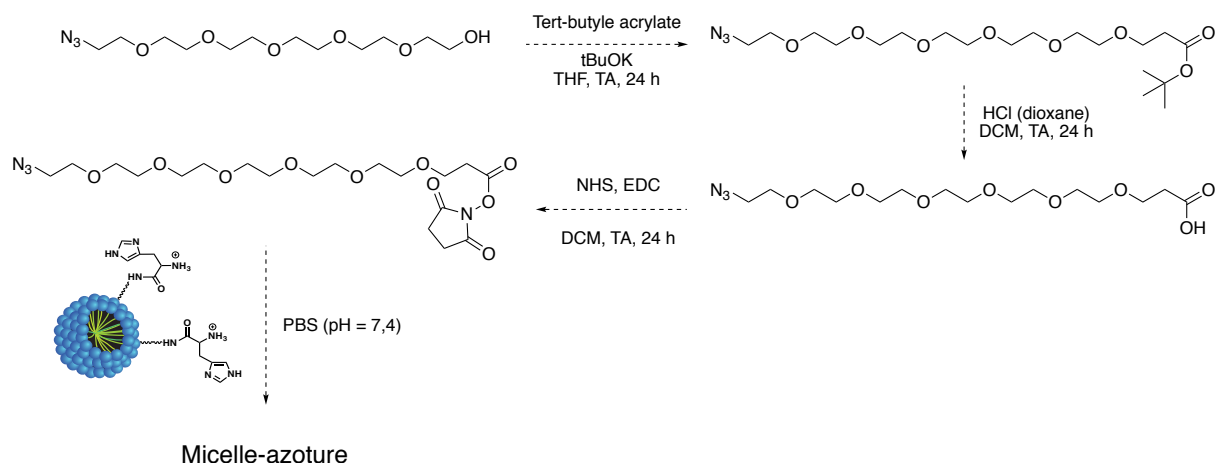


Figure 103 : Schéma réactionnel de fonctionnalisation de la micelle par un groupement azoture.

En effet, un azoture est moins hydrophobe qu'une bicyclononyne et sera ainsi moins sujet à s'insérer dans la cavité hydrophobe de la micelle. Cette stratégie n'a pas pu être abordé pendant mon travail de thèse.

III.2 Couplage entre la micelle PDA fonctionnalisée par un thiol et l'anticorps *via* l'utilisation d'un espaceur bifonctionnel

Une autre stratégie de couplage a été envisagée en utilisant un espaceur bi-fonctionnel : le CBTF. Ce dernier contient un ester activé qui peut réagir avec des fonctions amines primaires et un groupement 3-arylpropionitrile (APN) capable de réagir avec des thiols. Tout d'abord, les amines primaires présentes sur la tête polaire de la micelle sont couplées au réactif de Traut afin d'ajouter des fonctions thiols libres. En parallèle, les résidus lysines de l'anticorps sont couplés au réactif CBTF par une liaison amide. Une fois les deux réactions terminées, l'anticorps et la micelle modifiés sont mélangés pour donner le composé T-M par réaction des thiols sur l'APN (Figure 104). Ce conjugué est ensuite purifié sur colonne Biospin (30000 Da) et la concentration de l'anticorps est mesurée par UV avec un appareil nanodrop.

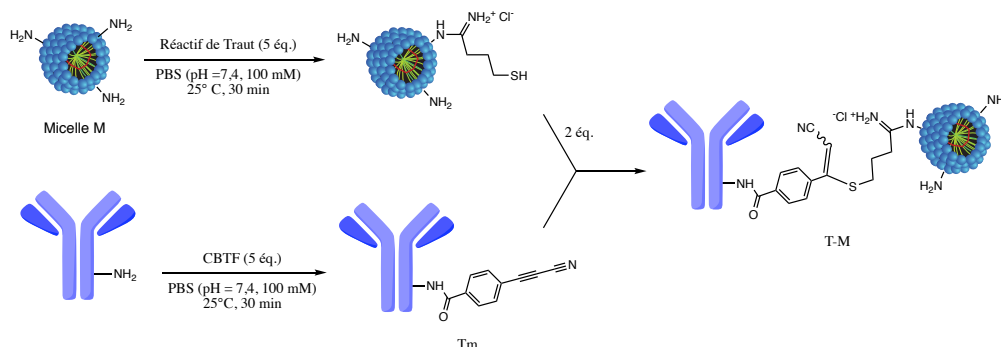


Figure 104 : Schéma réactionnel du couplage entre la micelle modifiée par un thiol et le CBTF couplé à l'anticorps.

Afin de confirmer la réaction de couplage entre les deux molécules, un gel SDS-PAGE a été réalisé (Figure 105). Les deux conjugués d'anticorps T_m et T-M ont été analysés en condition dénaturante et réductrice. Après migration des bioconjugués dans le gel, les bandes ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

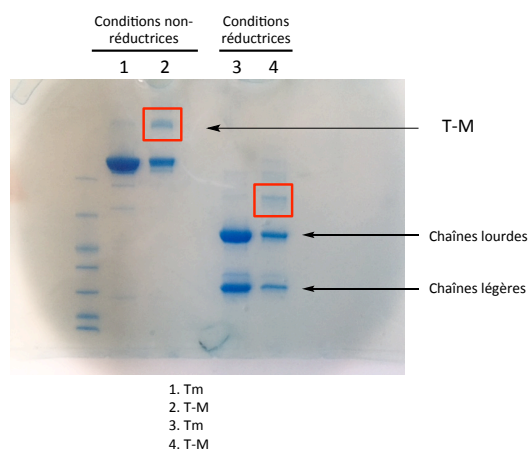


Figure 105 : Analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

En comparant la migration dans le gel de l'anticorps modifié avant et après réaction avec la micelle, on observe l'apparition d'une nouvelle bande avec un poids moléculaire plus important. Il est probable que cette bande représente l'immuno-micelle. Cependant, il reste encore une quantité importante d'anticorps non couplé.

Comme mentionné précédemment, ces travaux nous pas été poursuivi faute de temps.

Pour la suite, il serait donc intéressant, dans un premier temps, de renouveler cette réaction en chauffant à 37°C afin de favoriser le couplage et dans un deuxième temps d'essayer d'autres espaceurs bi-fonctionnels tel que le SMCC.

III.3 Conclusions et perspectives

Dans cette partie, deux stratégies de conjugaison par couplage covalent entre l'anticorps et la micelle ont été envisagées. La première stratégie s'appuyait sur une réaction de cyclo-addition entre la micelle modifiée par un groupement comportant un alcyne tendu et un anticorps-azoture. Alors que l'étape de fonctionnalisation de la micelle semble avoir eu lieu, aucune réaction avec l'anticorps n'a été observée. Une des difficultés majeures repose sur le caractère hydrophobe du BCN-PEG₆-PFP limitant sa solubilité dans l'eau et pouvant induire son encapsulation dans la micelle.

La deuxième approche consistait quant à elle, à lier les deux entités par l'intermédiaire d'un espaceur hétérobifonctionnel (CBTF). Une faible conjugaison entre l'anticorps et la micelle a pu être observée par électrophorèse mais la majorité de l'anticorps de départ était encore présent. Ces essais préliminaires ont permis de voir la difficulté de conjuguer la micelle polymérisée à l'anticorps de manière covalente. Pour la suite, il sera nécessaire de faire varier plusieurs paramètres tels que la nature de l'espaceur, la température de réaction ainsi que les solvants pour réussir à obtenir une conjugaison robuste. De plus, les micelles polymérisées sont difficilement caractérisables par les outils classiques d'analyse limitant le suivi et le contrôle des étapes de conjugaison. Une intention toute particulière sera donc dédiée à la recherche de nouvelles méthodes de caractérisation.

Suite aux difficultés rencontrées pour conjuguer de manière covalente la micelle à l'anticorps, nous avons développé une méthode basée sur une approche non-covalente de manière à éviter les modifications chimiques sur la micelle. Les avantages de cette approche résident dans la simplicité de la mise en œuvre mais également dans sa versatilité. En effet, si le système est basé sur des interactions de charge, il est envisageable de construire un système universel de ciblage pouvant être appliqué aux vecteurs cationiques.

IV. Fonctionnalisation des micelles : approche non covalente

IV.1 Conception du système

Afin de contourner les difficultés rencontrées lors de la fonctionnalisation de la micelle, nous avons imaginé une conjugaison entre la micelle et l'anticorps par une approche non-covalente. Les résultats obtenus dans les chapitre II et III ont permis de montrer que la micelle

cationique était capable de complexer des oligonucléotides anioniques. Partant de cette observation, nous avons dans un premier temps, synthétisé par la méthode « plug and play » décrite dans la partie précédente un conjugué anticorps-oligonucléotide que nous avons ensuite mélangé avec la micelle afin de créer des interactions électrostatiques entre les deux entités.

Cette stratégie se démarque d'une part par sa simplicité de conception mais également par son caractère universel. En effet, si la preuve de concept est apportée avec les micelles polydiacétyléniques, d'autres vecteurs cationiques pourraient également être adressés.

IV.2 Construction de l'immuno-micelle par interaction électrostatique

IV.2.2 Construction du conjugué anticorps-oligonucléotide

La construction du conjugué anticorps-oligonucléotide a été réalisée en deux étapes selon la stratégie « plug and play ». Dans un premier temps, un oligonucléotide amino-modifié a été conjugué au groupement BCN-PEG₆-PFP. Dans un deuxième temps, le conjugué oligonucléotide-BCN ainsi formé a été couplé à l'anticorps azoture.

Synthèse de l'oligonucléotide modifié (BCN-ON)

La synthèse de l'oligonucléotide couplé au BCN (BCN-ON) a été réalisée par couplage peptidique mettant en jeu un oligonucléotide fluorescent (du côté 3') fonctionnalisé par une amine en 5' et le réactif BCN-PEG₆-PFP (Figure 106). Le conjugué BCN-ON a été isolé avec un rendement de 60% après précipitation dans l'acétone et purification par HPLC.

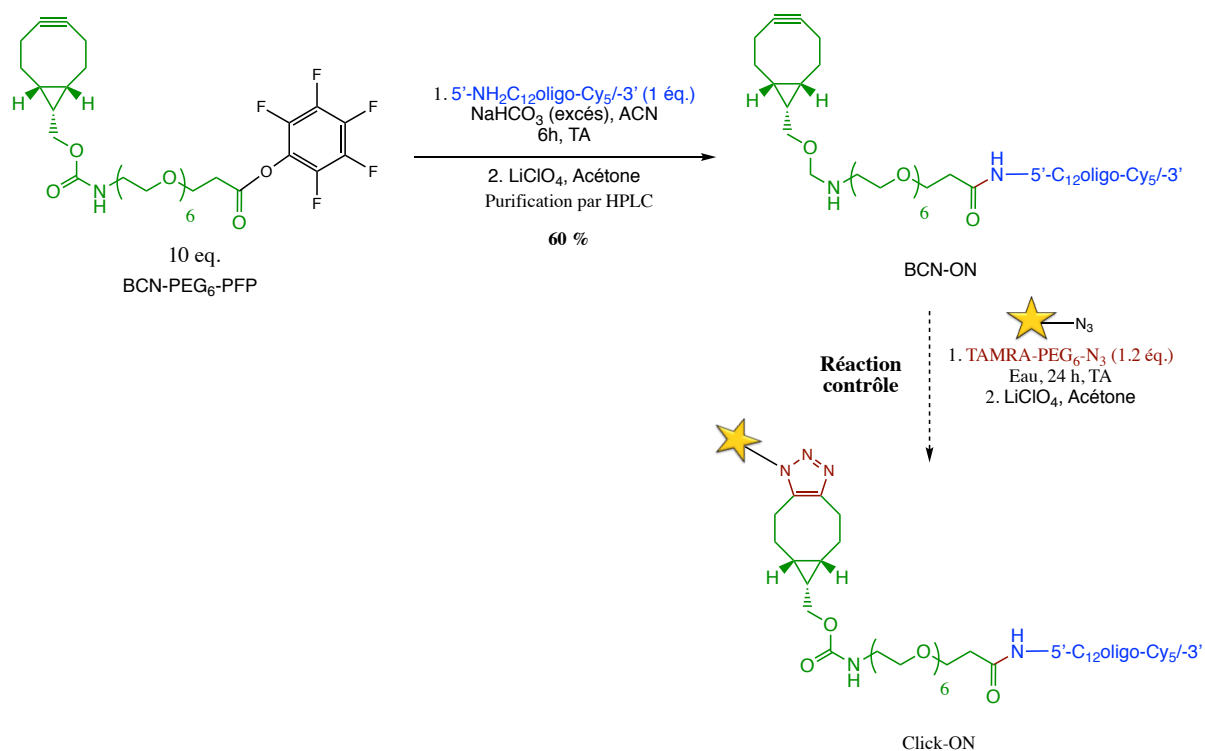


Figure 106: Synthèse de l'oligonucléotide modifié BCN-ON.

Pour s'assurer que le couplage entre les deux molécules ait bien eu lieu et que ce dernier n'empêche pas la réactivité de l'alcyne tendu, une réaction contrôle a été réalisée avec le dérivé azoture TAMRA (TAMRA-PEG₆-N₃). Pour cela, le conjugué BCN-ON a été mis en réaction avec un léger excès TAMRA-PEG₆-N₃. Après 24h d'incubation, l'excès d'azoture a été éliminé par précipitation de l'oligonucléotide dans l'acétone.

Le suivi de la conjugaison de l'oligonucléotide ainsi que celui de la réaction contrôle a été réalisé par HPLC. Les chromatogrammes sont présentés dans la Figure 107. La longueur d'onde du détecteur est réglée à 260 nm, absorbance caractéristique de l'oligonucléotide. On remarque qu'après conjugaison, le composé BCN-ON est plus retenu sur la colonne phase inverse en raison du caractère hydrophobe du motif cycloalcyne introduit sur l'oligonucléotide (Figure 107B). Après réaction avec le composé fluorescent, on observe la formation d'un nouveau pic plus polaire témoignant de la réactivité de BCN-ON vis à vis des azotures (Figure 107C).

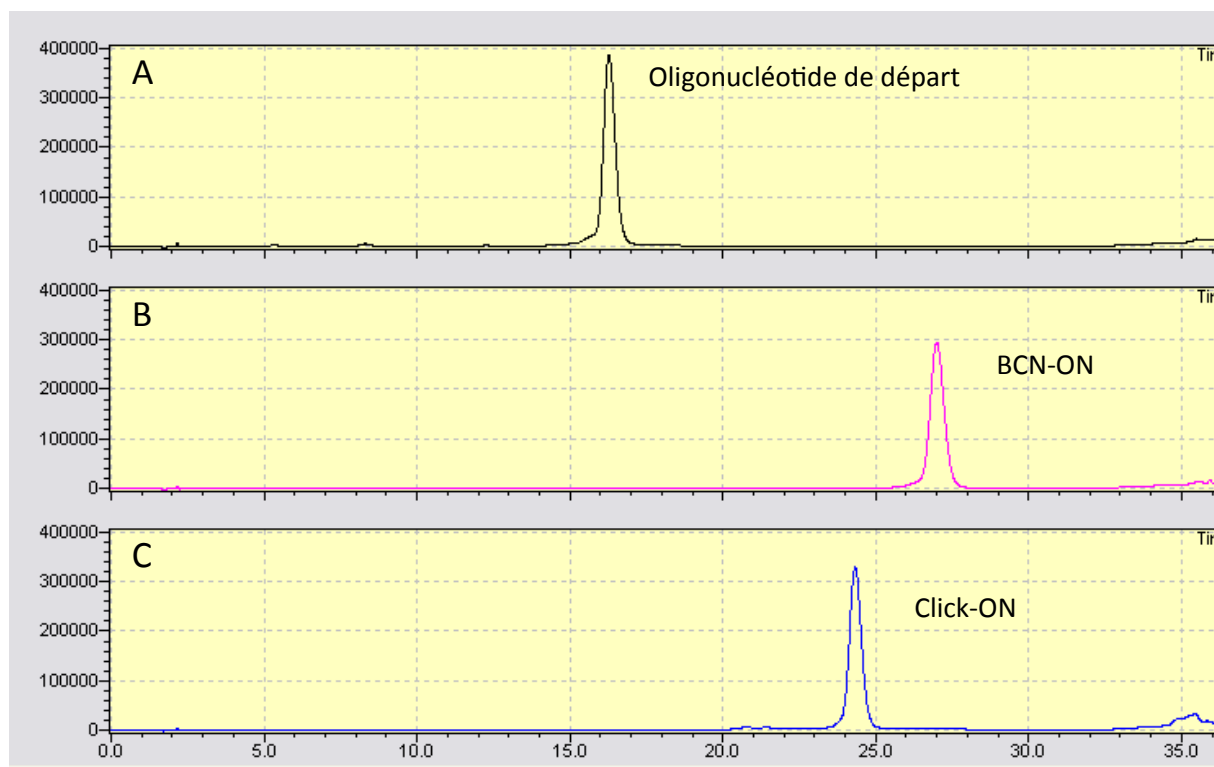


Figure 107 : A. Suivi HPLC de l'oligonucléotide de départ. B. Suivi HPLC de la réaction entre l'oligonucléotide de départ et BCN-. C. Suivi HPLC de la réaction de click. Détecteur = 260 nm.

Les produits purifiés BCN-ON et Click-ON ont ensuite été analysés par spectrophotométrie UV (Figure 108). Le spectre du composé BCN-ON présente un pic à 260 nm représentatif de l'oligonucléotide ainsi qu'un signal caractéristique du fluorophore Cy5 avec un maximum d'absorbance observé entre 650-670 nm. Après la réaction de click entre la bicyclononyne et l'azoture-PEG₆-TAMRA, on observe l'apparition d'un nouveau pic d'absorbance caractéristique du TAMRA à 560 nm témoignant du succès de la réaction. Les spectres enregistrés confirment donc les résultats obtenus en HPLC.

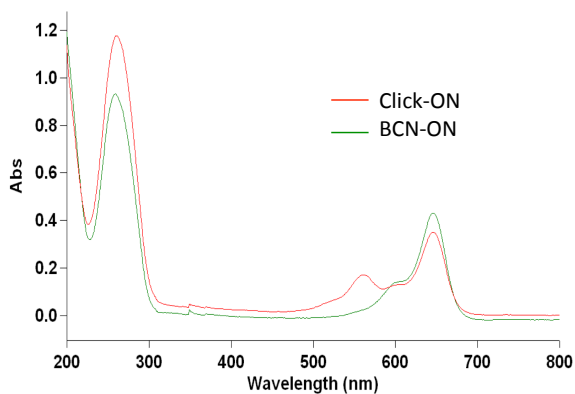


Figure 108 : Spectres d'absorption de BCN-ON (vert) et click-ON (rouge).

Synthèse du conjugué anticorps

Parallèlement, la modification de l'anticorps par un groupement azoture a été réalisée par Igor Dovgan (équipe d'Alain Wagner, UMR7199). Un résumé de la synthèse est décrit dans cette partie mais l'intégralité des données et des techniques utilisées sont détaillées dans la publication Dovgan *et al.* 2017.

L'anticorps trastuzumab (T) a été conjugué en couplant 3 équivalents d'ABF (*4-azidobenzoyl fluoride*) sur les lysines pour donner T-N₃. Le degré de conjugaison (DC) peut être déterminé à partir des données obtenues en MS native.³⁷ Dans notre cas, un DC₁ (indice de combinaison entre l'anticorps et ABF) de l'ordre de 2,6 a été obtenu. L'étape suivante consistait à coupler l'anticorps modifié T-N₃ à l'oligonucléotide BCN-ON par une réaction de cycloaddition azoture-alcyne tendu (Figure 109).

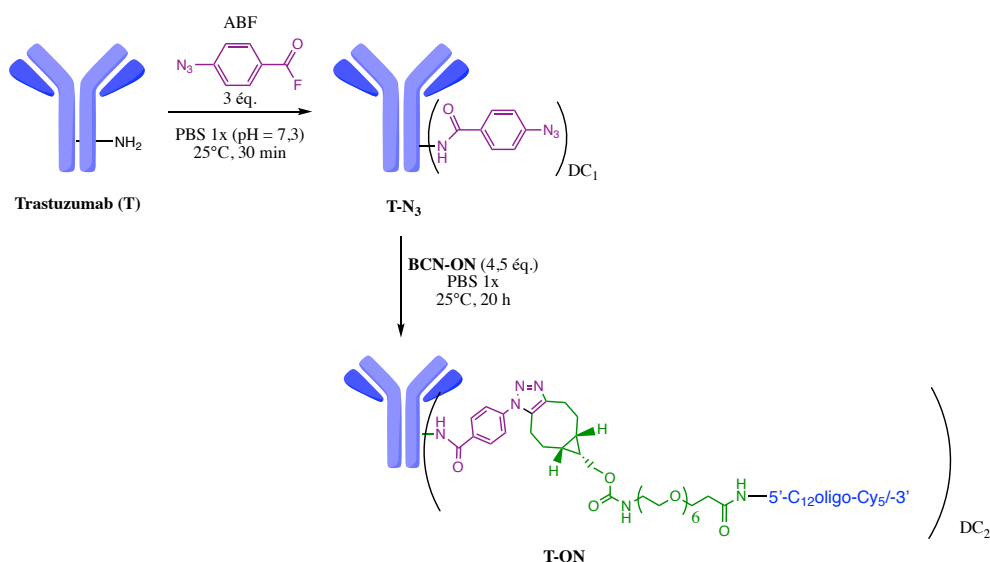


Figure 109 : Synthèse du conjugué anticorps-oligonucléotide.

Le conjugué anticorps-oligonucléotide T-ON a ensuite été purifié par chromatographie d'exclusion stérique afin de séparer le conjugué anticorps du composé BCN-ON libre, introduit en excès. Deux fractions ont été obtenues correspondant respectivement à T-ON et à BCN-ON (Figure 110A).

Enfin, l'efficacité de la réaction de « click » a été vérifiée en réalisant un gel SDS-PAGE. Ce dernier a été révélé par le bleu de Coomassie et par excitation à la longueur d'onde du Cy5. Les différentes bandes observées entre les deux modes de visualisation concordent, témoignant du couplage entre l'oligonucléotide et l'anticorps (Figure 110B). La moyenne des intégrations des intensités de chaque bande de fluorescence permet de calculer le DC₂ (indice

de conjugaison entre l'anticorps modifié et l'oligonucléotide) après réaction et il s'avère que celui-ci est identique à DC₁ confirmant la haute efficacité de cette réaction bio-orthogonale.

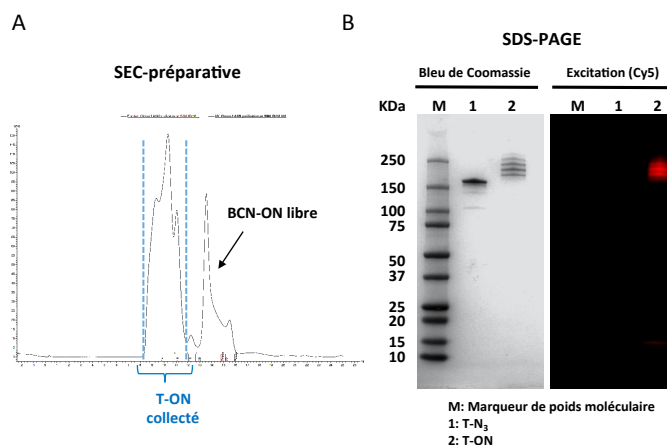


Figure 110 : A. Purification de T-ON par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). B. Electrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE. Visualisation par bleu de Coomassie et par excitation à la longueur d'onde du Cy5. Les résultats sont montrés pour le marqueur de poids moléculaire (M), T-N₃ (2) et T-ON (3).

La stratégie « plug and play » nous a donc permis de synthétiser de manière efficace et relativement rapide un agent de fonctionnalisation anionique, capable de cibler les récepteurs HER2 surexprimés à la surface des cellules tumorales. La partie anionique de ce ligand permettra de lier par interaction électrostatique des vecteurs cationiques.

Cette stratégie va également nous permettre de moduler notre système dans le sens où nous aurons la possibilité de faire varier les ratios entre l'anticorps, les micelles et le principe actif. En vue d'évaluations *in vitro*, cette synthèse a également été réalisée sur le rituximab, anticorps monoclonal chimérique ciblant spécifiquement les récepteurs CD20 présents à la surface des lymphocytes B. Le conjugué rituximab-oligonucléotide (R-ON) jouera donc le rôle de contrôle négatif pour les expériences de ciblage des récepteurs HER2 puisqu'il ne possède aucune affinité avec ce dernier.

IV.2.2 Formulation des immuno-micelles

La formulation des immuno-micelles a été réalisée en additionnant les micelles MPD-Hist sur les conjugués T-ON (Trastuzumab-ON) ou R-ON (Rituximab-ON) préalablement dilué dans le tampon HEPES glucose 5 %. Dans ce chapitre les micelles MPD-Hist seront abrégées M pour plus de visibilité.

Lors de cette étape, il est possible de faire varier le ratio entre l'anticorps et la micelle afin d'obtenir un système plus ou moins chargé positivement.

La solution est ensuite incubée à température ambiante pendant 15 min minimum afin de favoriser les interactions entre l'oligonucléotide anionique et la micelle cationique (Figure 111).

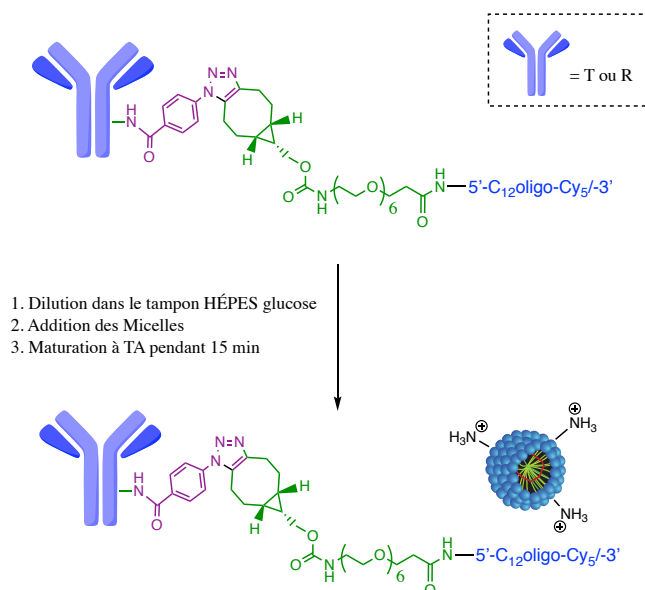


Figure 111 : Protocole pour la formation des immuno-micelles.

La caractérisation de l'immuno-conjugué a ensuite été réalisée par électrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide (Figure 112). Cette technique va nous permettre d'une part de prouver que la micelle est capable de complexer l'anticorps modifié par un oligonucléotide et d'autre part de trouver le ratio minimum permettant une complexation totale.

De même que pour les expériences réalisées avec la micelle (Chapitre II), un tampon tris-acétate (pH = 7,5) a été utilisé afin de conserver les amines primaires de la micelle protonnées. De plus, un gel natif sans condition dénaturante a été utilisé car le détergent SDS étant anionique, il est susceptible de rentrer en compétition avec l'oligonucléotide et ainsi empêcher la complexation avec ce dernier. Les échantillons sont formulés comme indiqué dans le tableau suivant.

	T	T-ON	M	T : M			T-ON : M		
Puits	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N/P	/	/	/	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3	1,1	5,6	11
T (μL) (0,1 mg/mL)	10	0	0	10	10	10	0	0	0
T-ON (μL) (0,1 mg/mL)	0	10	0	0	0	0	10	10	10
Micelles (μL) (1 mg/mL)	0	0	3,5	0,4	1,8	3,5	0,4	1,8	3,5

Tableau 14 : Conditions finales utilisées pour le gel électrophorèse.

Les résultats ont montré, tout d'abord, que dans ces conditions la micelle ainsi que le trastuzumab natif ne migraient pas (Lignes 2 et 4 de la Figure 112). En effet, le point isoélectrique de l'anticorps étant de 8,5, il est chargé positivement à pH= 7,5. Par conséquent, les micelles ne devraient pas être en mesure d'interagir avec l'anticorps nu à ce pH. En ce qui concerne les complexes formés entre l'anticorps modifié (T-ON) et la micelle, plusieurs ratios N/P (charge positive globale/charge négative globale) ont été testés.

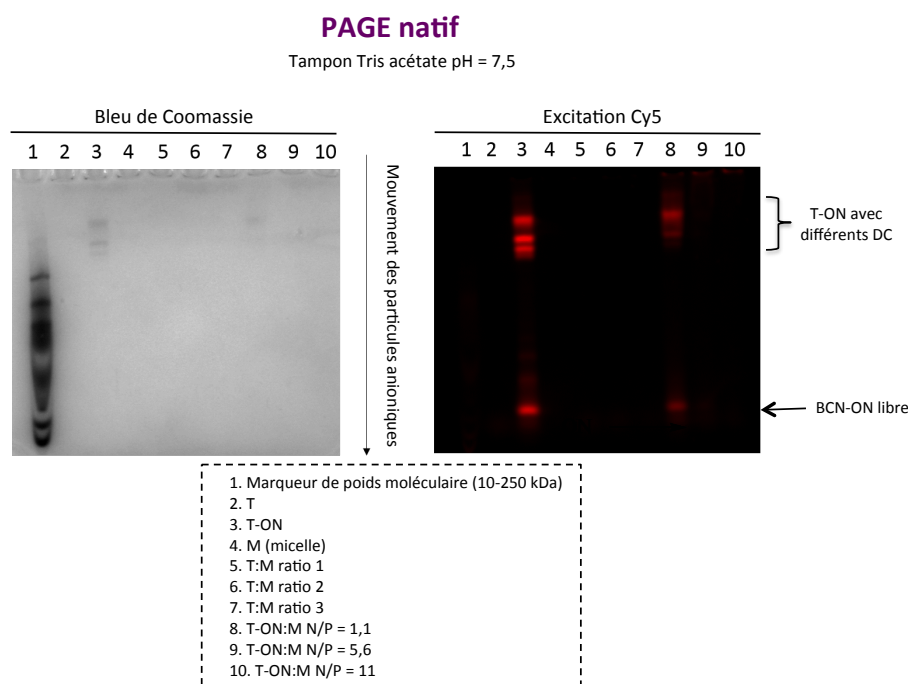


Figure 112 : Complexation de la micelle avec T et T-ON à différents ratios molaires. Analyse par électrophorèse sur gel natif de polyacrylamide avec le tampon tris-acétate pH = 7,5 comme tampon migrateur.

On constate que pour un ratio N/P de 1,1, la micelle n'est pas capable de complexer la totalité de T-ON puisque ce dernier migre toujours dans le gel (Ligne 8). Plus encourageant, lorsque nous augmentons les ratios N/P en faveur de la micelle, celle-ci est capable de complexer entièrement le conjugué T-ON. En revanche, aucune fluorescence n'est observée dans les puits. La micelle semble donc « éteindre » la fluorescence du Cy5 après complexation. Ces résultats nous permettent donc de confirmer la formation des immuno-micelles par interaction électrostatique.

IV.2.3 Complexation de siARN avec l'immuno-micelle

L'intérêt de la conception de l'immuno-micelle était de pouvoir délivrer sélectivement d'une part un anticancéreux mais également un siARN dans les cellules cancéreuses HER2+. Afin de valider la faisabilité de cette application, il a tout d'abord été nécessaire de contrôler que

l'immuno-micelle était capable de complexer un siARN. Pour cela, nous avons réalisé un gel natif de polyacrylamide dans les mêmes conditions que précédemment en ajoutant cette fois-ci un siARN-Cy5 et le conjugué T-ON à différents ratios (Figure 113).

Précédemment, nous avons défini un ratio N/P traduisant la charge globale du complexe siARN/micelle, de la manière suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{monomère}) * 1 (\text{mol})}{n(\text{siRNA}) * 42 (\text{mol})}$$

Avec 42 représentant le nombre de phosphates présents dans le siARN.

Dans le cas présent, des charges négatives sont également apportées par l'oligonucléotide attaché à l'anticorps. Nous avons donc déterminé un nouveau ratio, appelé N/Pg (N/P global), prenant en compte les différents éléments anioniques. Il se calcule de la manière suivante :

$$\frac{N}{P}^g = \frac{n(\text{monomère}) * 1 (\text{mol})}{n(\text{siRNA}) * 42 + n(\text{ON}) * 37 * DC}$$

Avec 37 le nombre de bases présentes dans l'oligonucléotide du conjugué T-ON et DC le degré de conjugaison de l'oligonucléotide à l'anticorps (ici 2,6).

La quantité de T-ON est fixée et une concentration croissante de micelle est ajoutée, on constate que T-ON est totalement complexé par la micelle à N/Pg de 1,9 (Ligne 5 Figure 113).

Lorsqu'on rajoute une quantité fixe de siARN-Cy5 (25 pmol), il faut atteindre un ratio supérieur à 4 pour voir la disparition totale de la micelle témoignant de la complexation totale de l'anticorps et du siARN sur la micelle (Lignes 9 et 10).

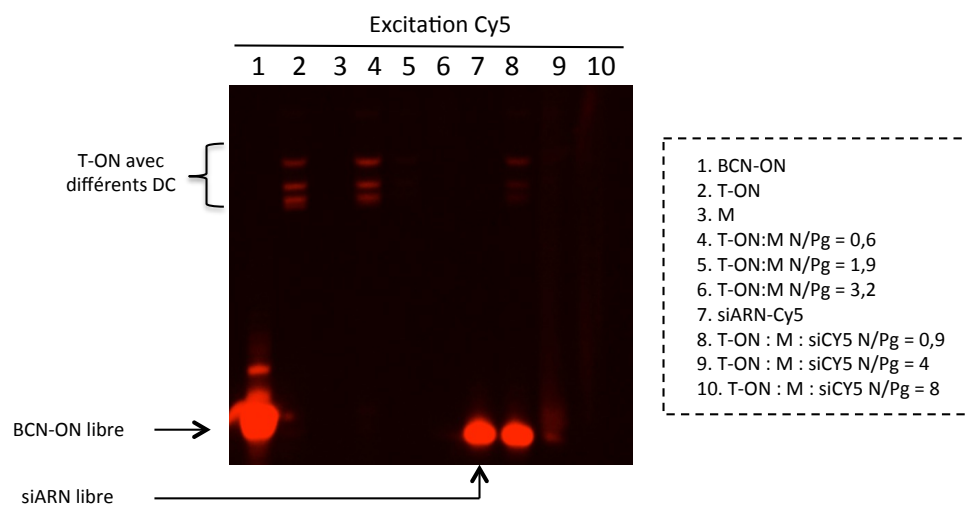


Figure 113 : Complexation de siARN et de l'immuno-micelle à différents ratios molaires. Analyse par électrophorèse sur gel natif de polyacrylamide avec le tampon tris-acétate pH = 7,5 comme tampon migrateur.

En résumé, la micelle est capable de se lier de manière efficace à l'anticorps par interaction électrostatique tout en gardant sa capacité à complexer le siARN à la surface. Dans la suite du projet, nous avons testé ces immuno-micelles en délivrance de siPLK1 et en camptothécine afin d'évaluer les propriétés de ciblage de ce vecteur.

IV.3 Evaluation *in vitro* de l'efficacité de l'immuno-micelle

Afin d'évaluer les propriétés de ciblage de ce système, nous avons utilisé deux lignées cellulaires du cancer du sein. Les cellules SKBR-3 surexprimant de manière importante les récepteurs HER2, elles devraient être ciblées par le vecteur immuno-micelle alors que les cellules MDA-MB-231, lignée exprimant très peu les récepteurs HER2, représentent le contrôle négatif.

IV.3.1 Evaluation *in vitro* de la délivrance de siPLK1

Une première série de tests biologiques a été réalisée dans le but de vérifier la capacité de l'immuno-micelle à délivrer le siPLK1 dans les cellules tumorales surexprimant les récepteurs HER2.

Afin de connaître l'influence de la conjugaison avec l'anticorps sur l'efficacité et la spécificité du système, nous avons dû tester quatre formulations :

- (i) M_{siPLK1} correspondant à la formulation du siPLK-1 complexés à MPD-Hist
- (ii) $M_{\text{siPLK1}} + \text{ON}$ correspondant à la formulation du siPLK-1 et de ON complexés à MPD-Hist
- (iii) $\text{T-ON-}M_{\text{siPLK1}}$ correspondant à la formulation du siPLK1 complexé à l'immuno-micelle
- (iv) $\text{T-ON-}M_{\text{siCTL}}$ correspondant à la formulation du siCTL complexé à l'immuno-micelle

Ces quatre formulations seront schématisées comme décrits dans la Figure 114.

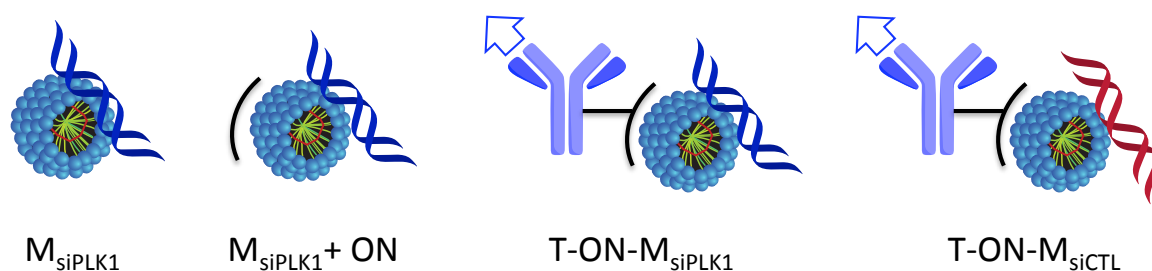


Figure 114 : Représentation schématique des formulations M_{siPLK1} , $M_{\text{siPLK1}} + \text{ON}$, $\text{T-ON-}M_{\text{siPLK1}}$ et $\text{T-ON-}M_{\text{siCTL}}$

Les différentes formulations sont obtenues en ajoutant la micelle ou l'immuno-micelle à une solution de siARN dilué dans le tampon HEPES glucose.

Les quantités ajoutées ont été calculées de façon à avoir pour chaque formulation un ratio N/P de 10 entre la micelle et le siARN. De plus, pour les formulations T-ON- M_{siARN} , un ratio N/Pg de 6 a été fixé suite aux résultats obtenus en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 113), qui démontre une complexation totale à partir d'un N/Pg supérieur à 4. Pour compenser les charges apportées par l'anticorps-ON et ainsi obtenir une charge globale identique, ON a été ajouté aux complexes M_{siARN} afin d'atteindre également un N/Pg de 6 et cette formulation a été comparée à l'analogue sans ON (Tableau 15).

N/p	M_{siARN}			$M_{\text{siARN}}+\text{BCN-ON}$			T-ON- M_{siARN}		
	10	10	10	6	6	6	6	6	6
siARN (5 μM)	10 nM	20 nM	50 nM	10 nM	20 nM	50 nM	10 nM	20 nM	50 nM
ON (5 μM)	-	-	-	9,6 nM	19,2 nM	48 nM	9,6 nM	19,2 nM	48 nM
M (1,4 mM)	4,2 μM	8,4 μM	21 μM	4,2 μM	8,4 μM	21 μM	4,2 μM	8,4 μM	21 μM
T (0,2 mg/mL)	-	-	-	-	-	-	2,9 nM	5,8 nM	14,6 nM

Tableau 15 : Concentrations ajoutées pour les différentes formulations.

Après 1 heure de maturation des complexes, ces derniers sont ajoutés sur les cellules en absence de sérum. Quatre heures après le début de l'expérience, 10 % de sérum sont ajoutés. Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur les deux lignées cellulaires (SKBR-3 et MDA-MB-231) en parallèle. L'évaluation de la délivrance du siPLK1 est indirectement mesuré par un test de viabilité cellulaire (test MTT, Figure 115).

On constate premièrement que M_{siPLK1} est légèrement moins toxique que $M_{\text{siPLK1}}+\text{ON}$. Or à la plus forte concentration, l'oligonucléotide seul (ON) n'apporte aucune toxicité. On en conclue donc que le ratio N/P a un impact sur l'efficacité du système. En effet, en fonction de la charge globale du système, des objets différents sont obtenus ce qui peut influencer l'efficacité de transfection. Pour la suite, les immuno-micelles seront donc comparées aux systèmes non ciblant possédant la même charge globale.

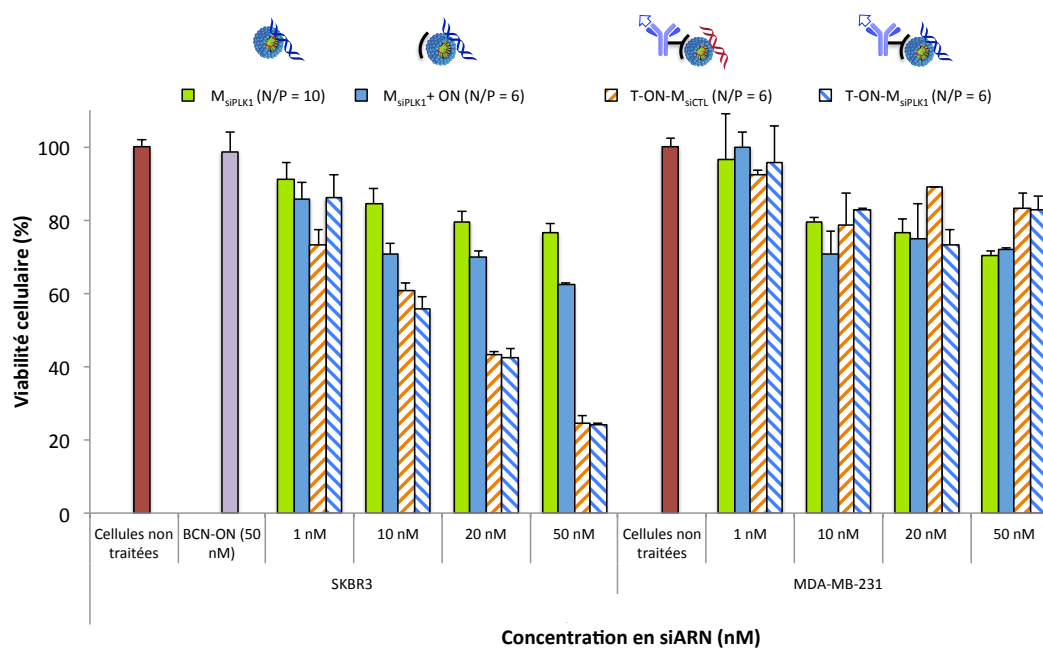


Figure 115 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection en absence de sérum de siPLK1/siCTL avec l'immuno-micelle et la micelle non modifiée après 48h d'incubation sur les SKBR3 et les MDA-MB-231. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN à un N/Pg de 6. Les résultats obtenus suite à un test MTT ainsi que les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

Sur les cellules SKBR-3, les résultats montrent que l'immuno-conjugué T-ON-M_{siPLK1} permet d'induire une mort cellulaire plus importante que le système non ciblant M_{siPLK1} + ON et ce de manière plus significative lorsque la concentration en siARN augmente. Cependant, on constate qu'il n'y a pas de différence notable entre les effets induits par les formulations ciblées avec le siCTL (T-ON-M_{siCTL}) et le siPLK1 (T-ON-M_{siPLK1}). L'immuno-micelle semble donc avoir une toxicité intrinsèque qui serait responsable de cette baisse de viabilité cellulaire. Contrairement à nos attentes, l'anticorps entraîne probablement une internalisation plus élevée de la micelle induisant ainsi une toxicité plus importante. Dans ce système la micelle conjuguée semble se comporter comme un agent cytotoxique. Cette hypothèse sera étudiée plus amplement dans la suite du chapitre.

Par comparaison avec les résultats obtenus sur les cellules HER2+, une très faible baisse de la viabilité cellulaire est observée avec l'immuno-micelle sur les cellules MDA-MB-231 (négative pour ce récepteur). En effet, aucune différence significative d'efficacité n'est observée entre les 3 différents systèmes sur cette lignée cellulaire. Le ciblage induit par la fonctionnalisation avec l'anticorps semble donc bien être dirigé contre les cellules HER2+.

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'impact du sérum sur l'efficacité du système en matière de ciblage. D'autre part, on s'est demandé si la présence de l'anticorps pouvait permettre de réduire la sensibilité des micelles au sérum en réduisant les interactions entre celles-ci et les protéines plasmatiques. Dans ce but, nous avons étudié l'influence de

l'anticorps sur le système micellaire en présence de sérum. L'expérience précédente a donc été répétée mais cette fois-ci en présence de sérum (Figure 116). Des résultats similaires à ceux observés en absence de sérum ont été obtenus. En effet, sur les cellules SKBR-3, la viabilité cellulaire est largement diminuée avec l'immuno-conjugué par rapport au vecteur micelle. Sur les MDA-MB-231, aucune inhibition n'est constatée.

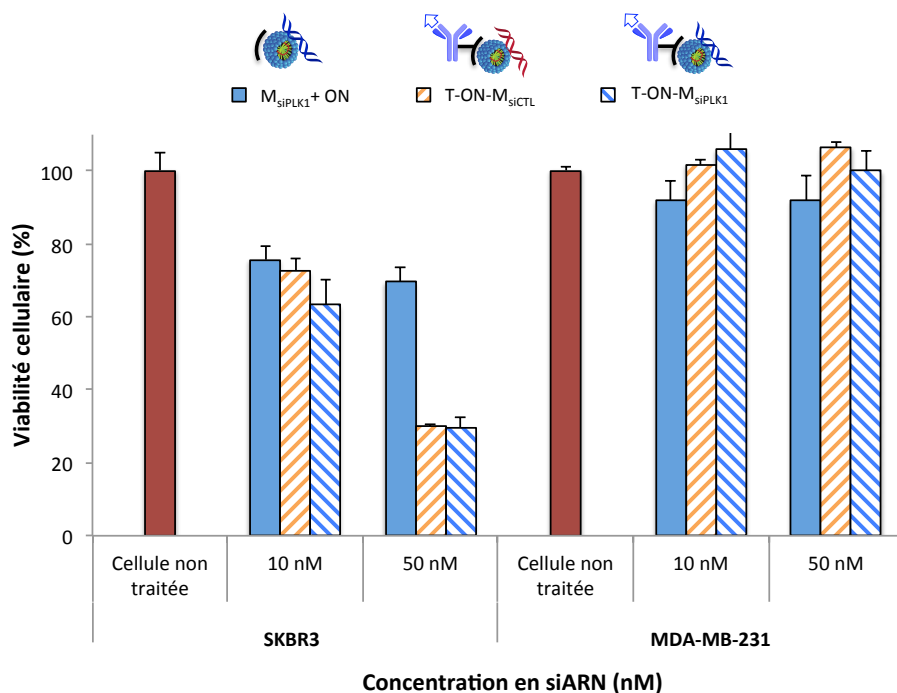


Figure 116 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection en présence de sérum (10 %) de siPLK1/siCTL avec l'immuno-micelle et la micelle après 48h d'incubation sur les SKBR3 et les MDA-MB-231. Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN à un N/Pg de 6. Les résultats obtenus suite à un test MTT ainsi que les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

La présence du sérum ne semble donc pas altérer la spécificité induite par la micelle fonctionnalisée par l'anticorps et continue d'induire une cytotoxicité indépendamment de la séquence du siARN transporté. Des résultats identiques ont également été obtenus en présence de 50 % de sérum.

En résumé, la différence d'efficacité de l'immuno-micelle observée entre les cellules HER2 positive (SKBR-3) et HER2 négative (MDA-MB-231) a montré que le greffage par interaction électrostatique de l'anticorps sur le vecteur permettait bien d'induire un ciblage. Néanmoins, le nouvel objet formé est cytotoxique et semblerait masquer l'effet propre du siPLK1. Pour la suite, afin de mieux comprendre l'origine de la toxicité observée, nous avons décidé tout d'abord de contrôler l'effet induit par le véhicule seul T-ON-M en absence d'agents cytotoxiques. Puis, afin de confirmer le ciblage cellulaire précédemment observé, nous avons ajouté un autre contrôle négatif, l'immuno-micelle formée à partir d'un anticorps

(rituximab) n'ayant aucune affinité connue avec les récepteurs surexprimés à la surface des cellules SKBR-3.

Etude la toxicité intrinsèque de l'immuno-micelle

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la micelle deviendrait toxique après fonctionnalisation avec l'anticorps, la toxicité intrinsèque des différentes immuno-micelles a été évaluée sur les cellules SKBR-3 en présence de 10% de sérum. L'expérience consistait à comparer la toxicité induite par ces quatre formulations :

- (i) T+M représentant le mélange entre le trastuzumab natif et la micelle
- (ii) T-ON-M représentant le complexes entre le conjugué trastuzumab-oligonucléotide et la micelle
- (iii) R+M représentant le mélange entre le rituximab natif et la micelle (contrôle négatif pour la lignée cellulaire SKBR3)
- (iv) R-ON-M représentant le complexe entre le conjugué rituximab-oligonucléotide et la micelle (Contrôle négatif pour la lignée cellulaire SKBR3)

Ces formulations seront schématisées comme décrits dans la Figure 117.

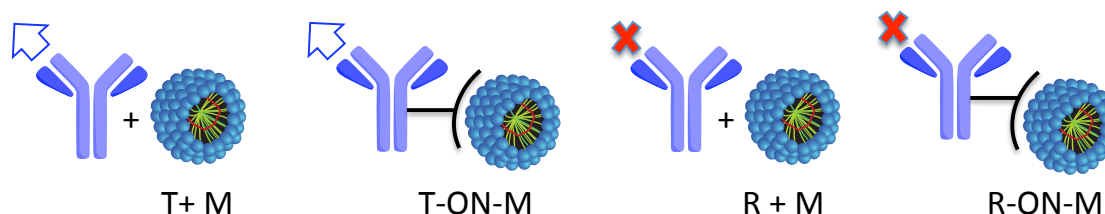


Figure 117 : Représentation schématique des formulations T+M, T-ON-M, R+M et R-ON-M.

Plusieurs paramètres ont été étudiés tels que la concentration en micelle, la concentration en anticorps et le facteur de dilution. Les résultats obtenus suite aux tests MTT sont présentés dans la Figure 118.

- Influence de la concentration en micelle : À l'exception des fortes quantités en micelles (1,2 et 1,8 μL), une très faible diminution de la viabilité cellulaire est observée avec T+M et R+M. Au contraire, les immuno-conjugués complexés T-ON-M et R-ON-M induisent une forte augmentation de la mort cellulaire. Ces résultats démontrent que la toxicité provient bien des complexes immuno-micelles. Bien que la différence entre T-ON-M et R-ON-M soit significative, on observe une baisse de la viabilité cellulaire avec le rituximab qui n'a pas d'affinité avec les récepteurs présents

sur les cellules SKBR-3. Cette effet, a priori inattendu, a cependant déjà été observé dans la littérature et est souvent attribué à la non spécificité. En effet, le ciblage améliore la sélection des cellules mais ne permet pas une spécificité totale. Il est également possible que la micelle soit capable de faire internaliser le complexe par endocytose. Ainsi deux voies d'internalisation seraient possibles, l'une promue par la charge positive de la micelle et l'autre par l'affinité des anticorps envers les récepteurs.

Nous avons donc démontré qu'en ajoutant un oligonucléotide anionique, une interaction avec la micelle était possible et que l'objet résultant possédait un effet différent que celui induit par la micelle seule sur les cellules.

- Concentration en anticorps: Lorsque la concentration en micelle est constante et qu'on augmente celle de l'anticorps, la viabilité cellulaire diminue plus avec T-ON-M qu'avec R-ON-M. Plus la quantité d'anticorps est importante, plus il y a induction de toxicité. Pour les vecteurs non complexés T+M et R+M, une faible cytotoxicité est à nouveau mesurée, confirmant les résultats précédents. De même, la différence significative entre les deux immuno-complexes est maintenue en faveur du conjugué trastuzumab.
- Facteur de dilution: la dilution permet de réduire la toxicité des différents systèmes, cette toxicité est donc concentration dépendante. Afin de réduire la toxicité induite par le système, il semble donc préférable de réduire les concentrations en micelles.

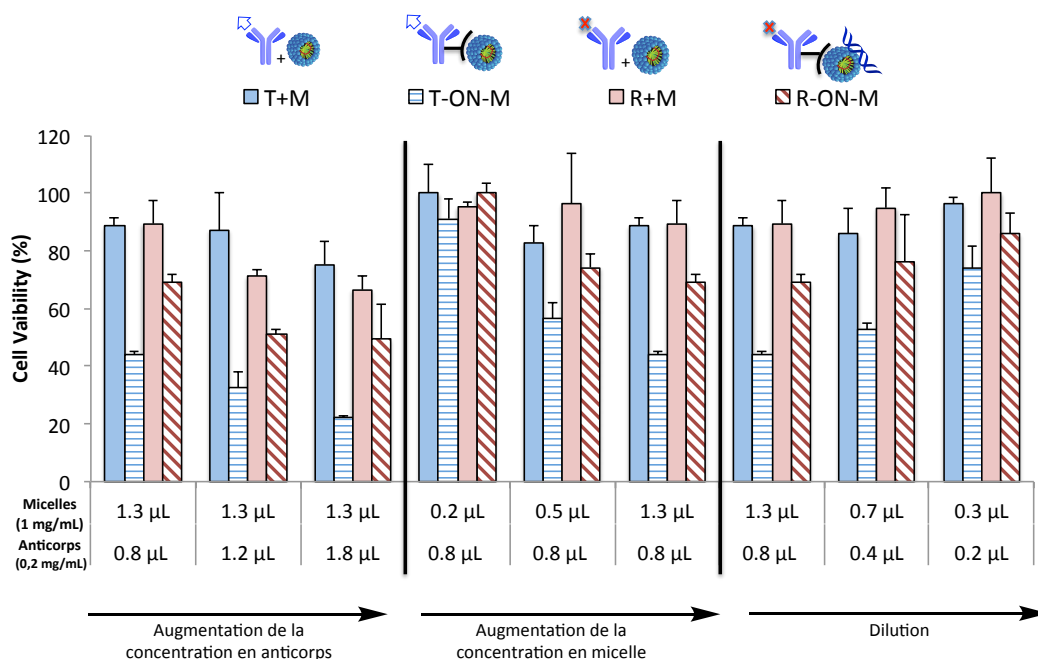


Figure 118 : Etude de l'influence de la concentration en micelle et en anticorps ainsi que du facteur dilution sur la cytotoxicité intrinsèque du vecteur en présence de sérum (10 %).

Suite aux conclusions tirées de l'expérience précédente, nous avons essayé de transférer le siPLK1 en diminuant la concentration en micelle et en conservant les quantités d'anticorps et de siARN, abaissant ainsi le ratio N/Pg (Figure 119). Nous avons également introduit un contrôle supplémentaire en transfectant le siCTL avec le système ciblant et le système non ciblant à savoir les micelles non fonctionnalisées.

En réalisant cette expérience, nous avons espéré observer une différence significative entre l'effet induit par le « système ciblant » délivrant le siPLK1 comparé au « système ciblant » délivrant le siCTL.

Néanmoins, le même phénomène que précédemment a été observé. Les systèmes T-ON-M_{siCTL} et T-ON-M_{siPLK1} ont permis d'induire une mort cellulaire deux fois supérieures à celles engendrées par les systèmes non ciblés mais aucune différence notable n'a été observée selon la nature du siARN délivré. La diminution de la concentration en micelle n'a donc pas permis d'augmenter l'inhibition spécifique.

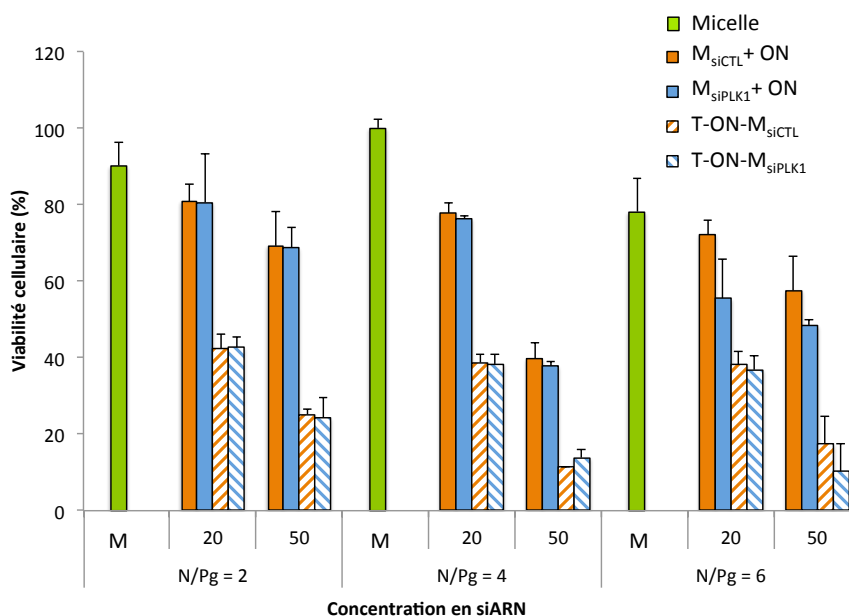

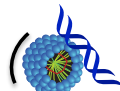


Figure 119 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec l’immuno-micelle et la micelle après 48h d’incubation sur les SKBR3 en présence de sérum (10 %). Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en micelle et donc à différents N/Pg. Les résultats obtenus suite à un test MTT ainsi que les écarts-types présentés, correspondent aux moyennes des triplicats.

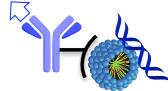
En revanche, on constate que le même problème de spécificité est obtenu avec le système non ciblant en présence de sérum ce qui signifie que la toxicité apportée par l’immuno-micelle n’est pas la seule cause de la baisse de la viabilité cellulaire et de la non spécificité observées. En comparant les résultats obtenus avec les différents systèmes, il s’semblerait que l’ajout de l’oligonucléotide puisse être à l’origine de ce phénomène (Tableau 16).



M_{siPLK1}



M_{siPLK1}+ON



T-ON-M_{siPLK1}

siPLK1	+	+	++
siCTL	-	+	++

Tableau 16 : Toxicité induite sur les cellules SKBR3 avec les différents systèmes délivrant siPLK1 ou siCTL. (-) peu ou pas toxique ; (+) toxique ; (++) très toxique.

L’oligonucléotide utilisé étant un petit segment ADN simple brin, il est possible qu’une fois vectorisé par la micelle à l’intérieur du cytoplasme, il induise pour des raisons encore inconnues, une toxicité responsable de la non-spécificité observée. Pour vérifier cette hypothèse, l’oligonucléotide sera vectorisé par la micelle en absence de siARN. Ces expériences sont actuellement en cours.

Si cette hypothèse s'avère véritable, plusieurs possibilités s'offrent à nous pour contourner ce problème. Afin de conserver le système déjà synthétisé, il suffirait d'hybrider le brin ADN avec son complémentaire pour le rendre double-brin. Si cette solution ne résout pas le problème, on utilisera alors un biopolymère anionique.

Par la suite, nous avons augmenté la concentration en siARN afin d'amplifier la visualisation de l'activité liée au siPLK1. De façon encore plus prononcée, on observe un ciblage efficace par le trastuzumab puisque les micelles-rituximab n'ont montré aucune toxicité (Figure 120). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre le siCTL et le siPLK1 vectorisé.

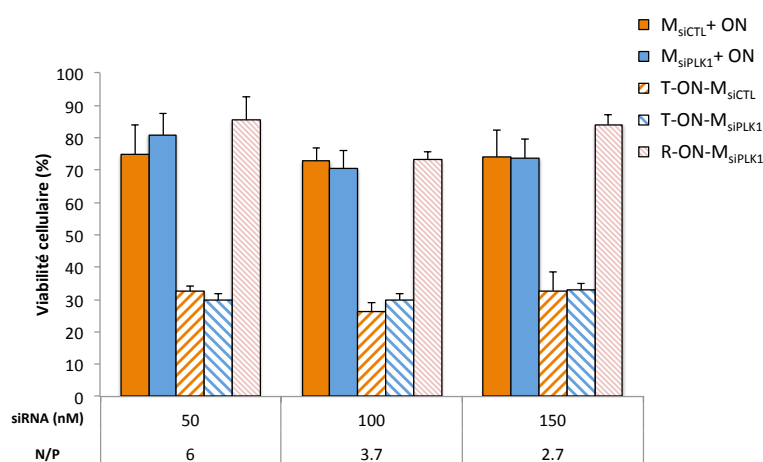


Figure 120 : Evaluation de la cytotoxicité induite par la transfection de siPLK1/siCTL avec les immuno-conjugués et la micelle après 48h d'incubation sur les cellules SKBR-3 en présence de sérum (10 %). Les résultats sont donnés pour différentes concentrations en siARN et donc à différents N/Pg. Les résultats obtenus suite à un test MTT ainsi que les écarts-types présentés, correspondent aux moyennes des triplicats.

IV.3.2 Analyse par microscopie confocale

Afin de visualiser l'internalisation des différents systèmes de transfection sur les cellules SKBR-3 et MDA-MB-231, des expériences de microscopie confocale ont été réalisées (Figure 121). Cette technique permet d'exciter de façon séquentielle plusieurs fluorophores et d'ainsi de visualiser les différents éléments fluorescents séparément sur différentes coupes optiques de la cellule. Le conjugué anticorps-oligonucléotide étant marqué par un fluorophore Cy5, nous avons utilisé un siARN contrôle (n'induisant normalement pas de toxicité) possédant un groupement Cy3 de façon à co-localiser les différentes émissions de fluorescence observées.

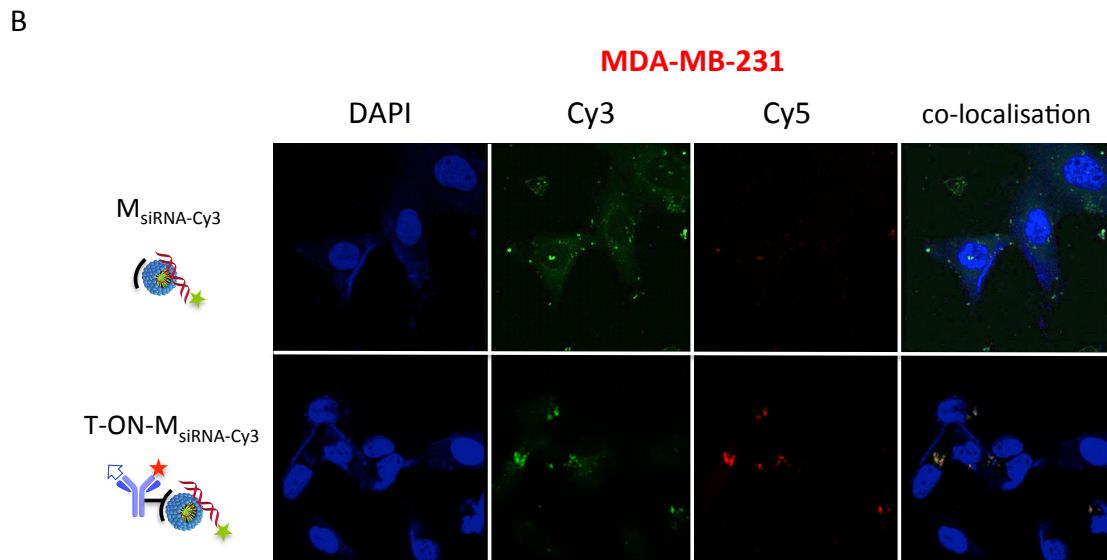
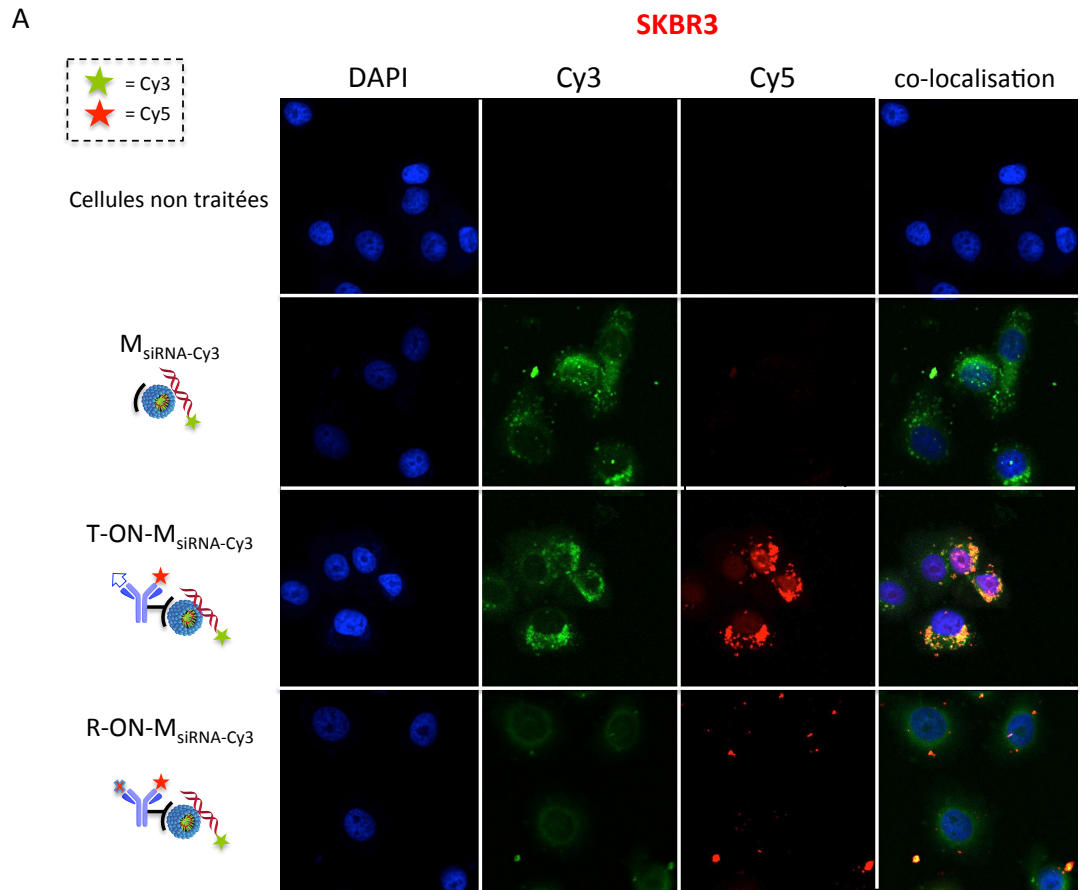


Figure 121 : Analyse par microscopie confocale de l'internalisation. (A) SKBR-3 non traitées et traitées avec $M_{siARN-Cy3}$, T-ON- $M_{siARN-Cy3}$ et R-ON- $M_{siARN-Cy3}$. (B) MDA-MB-231 traitées avec $M_{siARN-Cy3}$, T-ON- $M_{siARN-Cy3}$. Bleu : Laser 405 nm (DAPI), vert : Laser 561 nm (Cy3), rouge : Laser 635 nm (Cy5). Objectif : 63x. Taille de l'image : 367.83 μm \times 367.83 μm

Les différents complexes sont préparés dans les mêmes conditions que pour les expériences biologiques ($N/Pg = 6$, siARN : 50 nM) et incubés pendant 1 heure à température ambiante avant d'être déposés sur les cellules préalablementensemencées dans des chambres spécialement conçues pour la microscopie confocale. Après 3 heures d'incubation à 37°C en présence de 10 % de sérum, les cellules sont lavées avec du PBS à plusieurs reprises puis fixées à l'aide de formaldéhyde. Après 30 minutes, une étape de lavage est de nouveau réalisée puis les noyaux des cellules sont marqués à l'aide de DAPI. Les différentes conditions sont ensuite observées au microscope.

Après 3 heures d'incubation, on constate premièrement que sur les cellules SKBR-3, $M_{siARN-Cy3}$ émet une fluorescence diffuse autour du noyau reflétant une forte internalisation contrairement à celle observée sur les cellules MDA-MB-231 qui est plus faible. Les SKRB-3 permettent donc une plus forte internalisation des micelles, même en présence de sérum (Figure 21A).

Une différence très similaire a également été observée entre les 2 lignées pour l'immuomicelle T-ON- $M_{siARN-Cy3}$. De plus, une coloration jaune apparaît lorsqu'on superpose l'émission de fluorescence du Cy5 greffé sur l'anticorps et le Cy3 fixée sur le siARN reflétant une co-localisation parfaite entre ces deux molécules. Au contraire avec le contrôle négatif R-ON- $M_{siARN-Cy3}$, une faible émission de fluorescence est observée. La formulation de l'immuomicelle avec le rituximab diminue significativement l'internalisation de ces objets. L'entrée dans les cellules SKBR-3 du conjugué non covalent trastuzumab-micelle (T-ON- $M_{siARN-Cy3}$) se fait donc de manière sélective.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur les cellules MDA-MB-231, des intensités de fluorescence moins importantes sont observées pour les deux formulations (Figure 121B). Ces résultats sont en accord avec les tests de cytotoxicité présentés précédemment. En effet, en présence de sérum cette lignée cellulaire avait montré une résistance plus importante à l'internalisation des micelles. Il serait donc pertinent de répéter cette expérience en absence de sérum dans le but d'observer une diminution de l'internalisation de T-ON- $M_{siARN-Cy3}$ comparée à $M_{siARN-Cy3}$.

IV.3.3 Délivrance de la camptothécine

En parallèle des transfections de siARN, nous avons étudié la délivrance d'anticancéreux par l'immuno-conjugué. Nous avons choisi de conserver la camptothécine comme anti-tumoral modèle.

Afin de connaître l'influence de la conjugaison avec l'anticorps sur l'efficacité et la spécificité du système, nous avons testé plusieurs formulations :

- (i) La micelle **M**
- (ii) La drogue libre **CPT**
- (iii) **^{CPT}M** correspondant à l'encapsulation de la camptothécine dans la micelle
- (iv) **T-ON-^{CPT}M** correspondant à l'encapsulation de la CPT dans la micelle conjuguée au trastuzumab modifié avec l'oligonucléotide
- (v) **R-ON-^{CPT}M** correspondant à l'encapsulation de la CPT dans la micelle conjuguée au rituximab modifié avec l'oligonucléotide
- (vi) micelle

Ces formulations seront schématisées comme illustré ci-dessous :

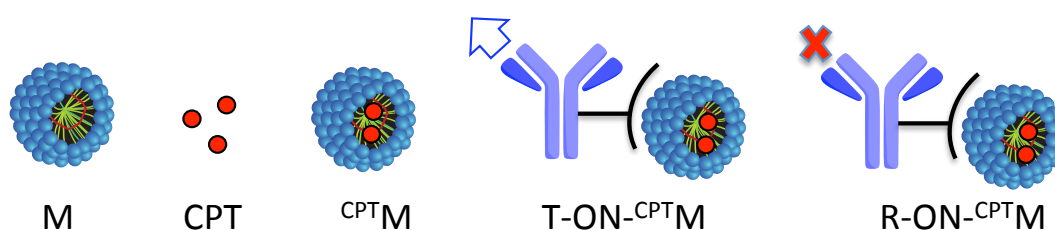


Figure 122 : Représentation schématique de la micelle M, la camptothécine CPT et des formulations ^{CPT}M, T-ON-^{CPT}M et R-ON-^{CPT}M.

La drogue libre est solubilisée dans un minimum de DMSO puis diluée dans le milieu de culture afin d'obtenir les différentes concentrations souhaitées. Pour les autres formulations faisant intervenir la camptothécine, celle-ci est tout d'abord encapsulée par sonication dans la micelle préalablement formulée et polymérisée (ratio massique 1:10), puis la micelle est mise en présence ou non de l'anticorps modifié. Après 1 heure de maturation à température ambiante, les complexes sont ajoutés sur les cellules préalablementensemencées et contenant 50 % de sérum. Pour les formulations micellaires (i), (iii), (iv) et (v), une quantité identique de micelle a été ajoutée. Après 48 heures, la viabilité cellulaire est déterminée au moyen d'un test MTT (Figure 123).

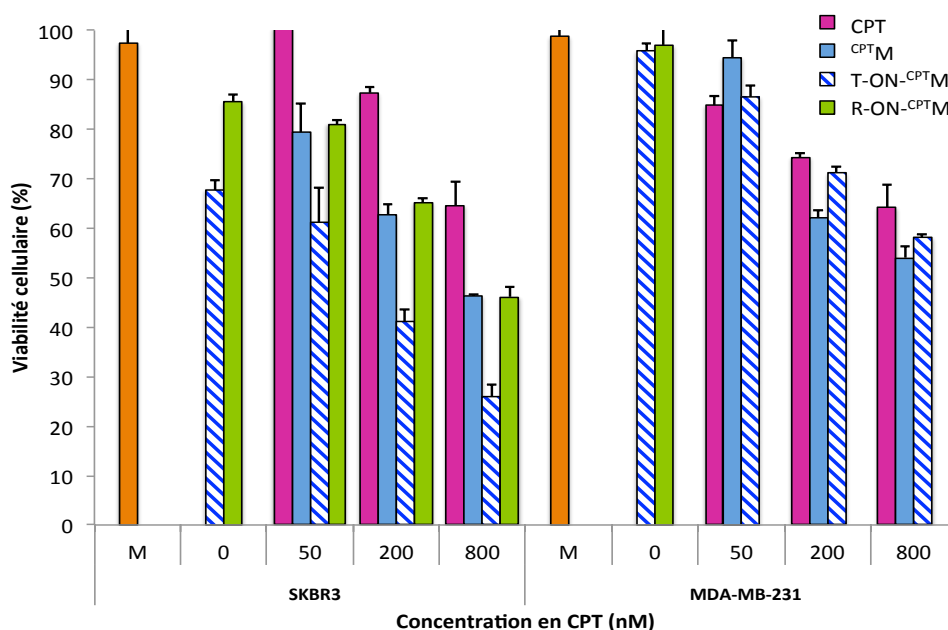


Figure 123 : Viabilité cellulaire obtenue au moyen d'un test MTT, 48 h après l'addition de M, CPT, CPT^M, T-ON-CPT^M et R-ON-CPT^M sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 à différentes concentrations en CPT dans 50% de sérum. Les résultats et les écarts-types présentés correspondent aux moyennes des triplicats.

En ce qui concerne les cellules SKBR-3, on constate d'abord qu'en absence de CPT la micelle seule n'induit pas de toxicité alors que ses analogues conjugués aux anticorps induisent une baisse de la viabilité cellulaire. Cette diminution est cependant moins importante en présence de rituximab que du trastuzumab. L'hypothèse selon laquelle l'anticorps révèle une toxicité de la micelle est donc encore une fois vérifiée.

Après encapsulation de la CPT, on constate une baisse de la viabilité cellulaire pour toutes les formulations et ce de manière concentration dépendante. Toutefois, des différences importantes sont observées entre les formulations. T-ON-CPT^M s'avère de façon attendue être la formulation la plus toxique. Par exemple, pour 200 nM de CPT, la viabilité cellulaire pour CPT^M et R-ON-CPT^M est d'environ 60 % alors qu'elle chute à 40 % pour T-ON-CPT^M.

Sur la lignée cellulaire MDA-MB-231, aucune toxicité n'est observée pour les différentes formulations en absence de la drogue. Comme pour les SKBR-3, l'encapsulation de la CPT dans les différentes formulations entraîne une baisse de la viabilité cellulaire. Cet effet est néanmoins beaucoup moins prononcé sur cette lignée que sur les SKBR-3. De plus, sur les cellules MDA-MB-231 aucune différence significative n'est constatée entre T-ON-CPT^M, CPT^M et CPT.

D'une manière générale, l'immuno-micelle trastuzumab est plus efficace sur les cellules SKBR-3 en raison d'un ciblage actif des récepteurs HER2. Ce ciblage reste donc intact après encapsulation d'un anti-tumoral.

IV.4 Conclusions et perspectives

Dans cette partie, nous avons développé une méthode d'adressage des micelles polydiacétyléniques cationiques par interaction non covalente avec un anticorps-oligonucléotide. L'efficacité de cette immuno-micelle a ensuite été testée pour la délivrance ciblée de siARN et d'anticancéreux dans les cellules surexprimant le récepteur HER2.

En comparant deux lignées cellulaires différentes, une lignée HER2 positive (SKBR3) et une autre HER2 négative (MDA-MB-231), nous avons montré que la toxicité induite par l'immuno-micelle était bien cellule-dépendante. En effet, une mort cellulaire très importante a été observée sélectivement sur les cellules surexprimant le récepteur ayant une affinité avec l'anticorps utilisé ce qui témoigne du ciblage actif. Pour conforter ce résultat un anticorps (Rituximab) ne ciblant pas les récepteurs HER2 a également été testé sur cette même lignée positive (SKBR3). Les résultats ont montré que la mort cellulaire engendrée était également anticorps-dépendant, confirmant la présence d'un ciblage cellulaire efficace.

Des résultats encourageants ont été obtenus en délivrance d'un anticancéreux modèle, la camptothécine. Cependant, l'augmentation de l'internalisation de la micelle due à la présence de l'anticorps a révélé une toxicité handicapant l'analyse des résultats notamment pour la transfection de siARN, également basé sur la mesure d'une cytotoxicité engendrée.

Pour la suite, il serait important dans un premier temps d'essayer de comprendre l'origine de la toxicité accrue de l'immuno-micelle afin de la diminuer. Dans un deuxième temps, on pourrait réaliser l'étude de l'inhibition d'une protéine par l'action d'un siARN vectorisé par l'immuno-micelle en prenant pour modèle le gène de la luciférase. Ainsi, comme expliqué dans le chapitre II, l'efficacité de la transfection pourra être quantifiée par luminescence. Si aucune inhibition spécifique n'est détectée, un autre vecteur cationique pourra alors être conjugué par interaction électrostatique à l'anticorps pour vérifier si la toxicité est encore présente. L'intérêt principal d'un système de ciblage basé sur des interactions non covalentes réside dans sa versatilité. En effet, nous avons choisi d'étudier l'efficacité de ciblage sur nos micelles polydiacétyléniques mais n'importe quel autre vecteur de transfection cationique pourrait être conjugué par interaction électrostatique à l'anticorps modifié, rendant ce système universel.

A long terme, en rajoutant un degré de complexité, une troisième approche pourrait également être envisagée. Celle-ci serait alors fondée sur l'hybridation d'oligonucléotide simple brin. Ce processus naturel d'appariement serait mis à profit pour conjuguer une nanoparticule à l'anticorps (Figure 124).

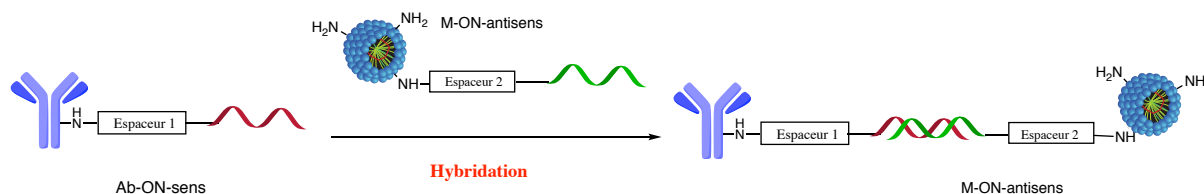


Figure 124 : Couplage non-covalent réalisé par hybridation de deux oligonucléotides complémentaires.

D'une part, l'anticorps comme décrit dans ce chapitre serait fonctionnalisé avec un oligonucléotide sens. Puis en parallèle, la micelle devrait être décorée avec un oligonucléotide antisens complémentaire du premier. Pour cela plusieurs stratégies pourraient être envisagées tels qu'un couplage thiol-maléimide ou une cycloaddition azoture-alcyne tendu. Enfin, les deux parties seraient liées de manière non-covalente en hybridant les deux oligonucléotides. Cette approche permettrait notamment d'augmenter la spécificité entre l'anticorps et la micelle.

Références

- (1) Kennedy, P. J.; Oliveira, C.; Granja, P. L.; Sarmiento, B. Monoclonal Antibodies: Technologies for Early Discovery and Engineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *0* (0), 1–15.
- (2) Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D. L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (1), 1–26.
- (3) Zafir-Lavie, I.; Michaeli, Y.; Reiter, Y. Novel Antibodies as Anticancer Agents. *Oncogene* **2007**, *26* (25), 3714–3733.
- (4) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497.
- (5) Scheen, A. J. NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES DIFFÉRENTS TYPES D'ANTICORPS MONOCLONAUX. *RMLG Rev. Médicale Liège* **2009**, *64* (5–6).
- (6) Carter, P. J. Potent Antibody Therapeutics by Design. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6* (5), 343–357.
- (7) Parslow, A. C.; Parakh, S.; Lee, F.-T.; Gan, H. K.; Scott, A. M. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Biomedicines* **2016**, *4* (3).
- (8) Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Begent, R. H. J. Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) for Cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4* (11), 1777–1789.
- (9) Tsuchikama, K.; An, Z. Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries. *Protein Cell* **2016**, 1–14.
- (10) Chudasama, V.; Maruani, A.; Caddick, S. Recent Advances in the Construction of Antibody-Drug Conjugates. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (2), 114–119.
- (11) Sofou, S.; Sgouros, G. Antibody-Targeted Liposomes in Cancer Therapy and Imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5* (2), 189–204.
- (12) Déas, O.; Angevin, E.; Cherbonnier, C.; Senik, A.; Charpentier, B.; Levillain, J. P.; Oosterwijk, E.; Hirsch, F.; Dürrbach, A. In Vivo-Targeted Gene Delivery Using Antibody-Based Nonviral Vector. *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13* (9), 1101–1114.
- (13) Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N.; Gao, Z.; Papahadjopoulos-Sternberg, B. Immunomicelles: Targeted Pharmaceutical Carriers for Poorly Soluble Drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (10), 6039–6044.
- (14) Allen, T. M. Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (10), 750–763.
- (15) Yao, H.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2).
- (16) Werengowska-Cieć Wierz, K.; Wiś Niewski, M.; Terzyk, A. P.; Furmaniak, S. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System <https://www.hindawi.com/journals/acmp/2015/198175/> (accessed Aug 21, 2017).
- (17) Zhao, M.; Sun, Y.; Zhu, X.; Chen, D.; Feng, S.; Guo, S.; Li, W. Antibody-Targeted Immunocarriers for Cancer Treatment. **2016**.
- (18) Anhorn, M. G.; Wagner, S.; Kreuter, J.; Langer, K.; von Briesen, H. Specific Targeting of HER2 Overexpressing Breast Cancer Cells with Doxorubicin-Loaded Trastuzumab-Modified Human Serum Albumin Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2321–2331.
- (19) Park, J. W.; Hong, K.; Carter, P.; Asgari, H.; Guo, L. Y.; Keller, G. A.; Wirth, C.; Shalaby, R.; Kotts, C.; Wood, W. I. Development of Anti-P185HER2

- Immunoliposomes for Cancer Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92 (5), 1327–1331.
- (20) M, S. S.; N, K.; M, S. Conjugation of Anti-My9 Antibody to Stealth Monensin Liposomes and the Effect of Conjugated Liposomes on the Cytotoxicity of Immunotoxin. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2001**, 76 (3), 285–295.
- (21) Maruyama, K.; Takizawa, T.; Yuda, T.; Kennel, S. J.; Huang, L.; Iwatsuru, M. Targetability of Novel Immunoliposomes Modified with Amphipathic Poly(Ethylene Glycol)s Conjugated at Their Distal Terminals to Monoclonal Antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1234 (1), 74–80.
- (22) Ou, Z.; Wu, B.; Xing, D.; Zhou, F.; Wang, H.; Tang, Y. Functional Single-Walled Carbon Nanotubes Based on an Integrin $\alpha v \beta 3$ Monoclonal Antibody for Highly Efficient Cancer Cell Targeting. *Nanotechnology* **2009**, 20 (10), 105102.
- (23) Torchilin, V. P.; Khaw, B. A.; Smirnov, V. N.; Haber, E. Preservation of Antimyosin Antibody Activity after Covalent Coupling to Liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, 89 (4), 1114–1119.
- (24) Yao, V. J.; D'Angelo, S.; Butler, K. S.; Theron, C.; Smith, T. L.; Marchiò, S.; Gelovani, J. G.; Sidman, R. L.; Dobroff, A. S.; Brinker, C. J.; Bradbury, A. R. M.; Arap, W.; Pasqualini, R. Ligand-Targeted Theranostic Nanomedicines against Cancer. *J. Controlled Release* **2016**, 240, 267–286.
- (25) Guo, Y.; Werbel, T.; Wan, S.; Wu, H.; Li, Y.; Clare-Salzler, M.; Xia, C.-Q. Potent Antigen-Specific Immune Response Induced by Infusion of Spleen Cells Coupled with Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl Cyclohexane)-1-Carboxylate (SMCC) Conjugated Antigens. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, 31, 158–168.
- (26) Kolodych, S.; Koniev, O.; Baatarkhuu, Z.; Bonnefoy, J.-Y.; Debaene, F.; Cianféroni, S.; Van Dorsselaer, A.; Wagner, A. CBTF: New Amine-to-Thiol Coupling Reagent for Preparation of Antibody Conjugates with Increased Plasma Stability. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (2), 197–200.
- (27) Sidorov, I.; Prabakaran, P.; Dimitrov, D. Non-Covalent Conjugation of Nanoparticles to Antibodies via Electrostatic Interactions—A Computational Model. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2007**, 4, 1–5.
- (28) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (6), 2115–2120.
- (29) Niemeyer, C. M.; Ceyhan, B. DNA-Directed Functionalization of Colloidal Gold with Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (19), 3685–3688.
- (30) Palanca-Wessels, M. C.; Booth, G. C.; Convertine, A. J.; Lundy, B. B.; Berguig, G. Y.; Press, M. F.; Stayton, P. S.; Press, O. W. Antibody Targeting Facilitates Effective Intratumoral siRNA Nanoparticle Delivery to HER2-Overexpressing Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, 7 (8), 9561–9575.
- (31) Ko, Y. T.; Bhattacharya, R.; Bickel, U. Liposome Encapsulated Polyethylenimine/ODN Polyplexes for Brain Targeting. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2009**, 133 (3), 230–237.
- (32) Ko, Y. T.; Bhattacharya, R.; Bickel, U. Liposome Encapsulated Polyethylenimine/ODN Polyplexes for Brain Targeting. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2009**, 133 (3), 230–237.
- (33) Xiao, Z.; McQuarrie, S. A.; Suresh, M. R.; Mercer, J. R.; Gupta, S.; Miller, G. G. A Three-Step Strategy for Targeting Drug Carriers to Human Ovarian Carcinoma Cells in Vitro. *J. Biotechnol.* **2002**, 94 (2), 171–184.

- (34) Singla, H.; Ludhiadch, A.; Kaur, R. P.; Chander, H.; Kumar, V.; Munshi, A. Recent Advances in HER2 Positive Breast Cancer Epigenetics: Susceptibility and Therapeutic Strategies. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**.
- (35) Trail, P. A.; Dubowchik, G. M.; Lowinger, T. B. Antibody Drug Conjugates for Treatment of Breast Cancer: Novel Targets and Diverse Approaches in ADC Design. *Pharmacol. Ther.* **2017**.
- (36) Maruani, A.; Smith, M. E. B.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.; Caddick, S. A Plug-and-Play Approach to Antibody-Based Therapeutics via a Chemoselective Dual Click Strategy. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6645.
- (37) Dovgan, I.; Ursuegui, S.; Erb, S.; Michel, C.; Kolodych, S.; Cianférani, S.; Wagner, A. Acyl Fluorides: Fast, Efficient, and Versatile Lysine-Based Protein Conjugation via Plug-and-Play Strategy. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (5), 1452–1457.

Conclusion Générale

Durant ces travaux de thèse, plusieurs amphiphiles diacétyléniques munis de têtes polaires variées ont été synthétisés. A partir de ces monomères, des auto-assemblages sous forme micellaire ont été formulés et étudiés. Les analyses réalisées par DLS ont révélé que la nature de la tête greffée et le temps de polymérisation ne jouaient pas un rôle discriminant dans la taille des micelles.

Les micelles ainsi formées ont ensuite été évaluées en délivrance de siARN sur des cellules modèles exprimant le gène de la luciférase. Bien que plusieurs des composés synthétisés soient actifs, nos efforts se sont concentrés sur le plus prometteur d'entre eux à savoir la micelle comportant des têtes polaires histidines. Les tests biologiques réalisés *in vitro* ont également mis en valeur l'intérêt de la polymérisation. Celle-ci améliore la stabilisation des micelles et permet également de réduire la cytotoxicité intrinsèque du véhicule. Suite à ces observations, une étude poussée a été réalisée par RMN-DOSY afin de caractériser et de comprendre les différences structurales apportées par la polymérisation. Cette expérience nous a permis notamment de quantifier la population de monomères libres dans les différentes formulations et d'établir une relation entre la toxicité sur les cellules et le pourcentage de polymérisation. Ainsi, après dialyse exhaustive des micelles, une toxicité moins importante a été observée *in vitro*. L'avantage de ces systèmes dialysés réside donc dans une optimisation de la biocompatibilité de ces objets, expliquée par la diminution de la population de monomères libres supposés responsables de la cytotoxicité.

Enfin dans cette première partie, nous avons mis en évidence deux phénomènes probablement impliqués dans la rupture de l'endosome lors de la délivrance de siARN avec ces micelles : l'effet « éponge à protons » et l'expansion micellaire qui provoque une déstabilisation membranaire. La synthèse de molécules fonctionnalisées par une double histidine a permis de conserver l'activité biologique de vectorisation des systèmes micellaires formés. Néanmoins, l'ajout d'une deuxième histidine sur la tête polaire n'a pas apporté de net avantage par rapport à une simple fonctionnalisation des monomères.

L'ensemble de ces travaux sur les micelles-histidines a fait l'objet d'un dépôt de brevet, d'une publication et d'un chapitre de livre en cours de soumission.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité exploiter ces mêmes micelles pour une application en thérapie combinatoire. Elles permettent une encapsulation relativement efficace (10%) de la camptothécine améliorant ainsi sa « solubilisation » dans l'eau. Dans un second

temps la co-délivrance de cet anticancéreux avec un siARN antiprolifératif (siPLK1) a permis d'obtenir un effet synergique justifiant l'intérêt de ces vecteurs.

L'analyse par DLS de ces objets micelles-siRNA-drogue a permis d'optimiser la formulation conduisant à des tailles n'excédant pas 100 nm. Cette taille nanométrique serait essentielle pour envisager potentiellement un ciblage passif par effet EPR lors d'utilisations thérapeutiques en cancérologie. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser des expériences de biodistribution afin d'apprécier le temps de circulation de ces nanoparticules et visualiser leur accumulation au niveau de la tumeur.

Au cours de ces expériences *in vitro*, une des limites de notre système a été mise en évidence : la sensibilité des micelles au sérum. Celle-ci peut s'expliquer par la charge positive globale du système. Par la suite, il serait donc intéressant de réaliser des co-formulations entre les micelles histidines et par exemple des micelles polydiacétyléniques PEGylées afin d'introduire un caractère furtif au vecteur, pouvant réduire ce phénomène d'adsorption.

L'évaluation préliminaire *in vivo* réalisée par injection locale des différents agents thérapeutiques, délivrés individuellement ou simultanément par la micelle a permis de confirmer que leurs activités thérapeutiques étaient conservées. Afin d'évaluer le bénéfice de ces vecteurs *in vivo*, d'autres expériences devront être réalisées avec des doses moins importantes et potentiellement d'autres voies d'administration (ip et iv).

La dernière partie de mes travaux s'articulait autour de la fonctionnalisation des micelles-PDA par des agents de ciblage. Nous nous sommes tournés vers un système original, simple et versatile, basé sur les interactions électrostatiques entre un vecteur cationique et un anticorps modifié par un oligonucléotide anionique. La preuve de concept a été réalisée sur les micelles histidines.

Nous avons tout d'abord délivré un siPLK1 à l'aide de l'immuno-micelle sur des cellules surexprimant ou non les récepteurs HER2, ayant une affinité avec l'anticorps utilisé lors de la formulation du système. Les résultats obtenus ont montré un ciblage cellulaire efficace en faveur des cellules récepteur-positives (HER2+). Cependant, les objets formés étant toxiques, il a été difficile de tirer une conclusion quant à l'effet induit par le siPLK1. Pour faciliter la lecture des résultats, nous allons utiliser des lignées cellulaires HER2 positives ou négatives comportant également le gène de la luciférase. Ainsi, la toxicité induite par le vecteur micelle-oligo-anticorps et l'efficacité du siARN pourront être distinguées. De plus, l'oligonucléotide greffé sur l'anticorps étant de l'ADN simple brin, il pourrait une fois vectorisé par la micelle,

engendrer une « réponse immunitaire » et ainsi être en partie responsable de la non spécificité observée entre les différents siARN délivrés. Par la suite, des tests *in vitro* complémentaires seront réalisés pour comprendre le rôle exact de l'association oligonucléotide-anticorps pour distinguer l'effet biologique apporté par l'oligonucléotide. Si cet oligonucléotide ADN se révèle toxique pour les cellules, un autre biopolymère polyanionique pourra alors être utilisé (l'acide polyglutamique par exemple).

En parallèle, des expériences de délivrance d'anticancéreux ont également été réalisées. Dans ce cas, en plus d'un ciblage cellulaire notable, une amélioration de l'efficacité de l'anticancéreux a été observée lorsqu'il est délivré avec l'immuno-micelle par comparaison avec le système micellaire ou la drogue seule.

Enfin, la fonctionnalisation de la micelle avec l'anticorps a également permis de réduire la sensibilité du vecteur au sérum, point limite observé précédemment.

L'optimisation de ce système est toujours en cours d'étude dans notre laboratoire.

Partie expérimentale

I. Materials	218
<i>I.1 Reagents and solvents</i>	218
<i>I.2 Nucleic acid sequences</i>	218
<i>I.3 Buffering solutions</i>	219
II. Analysis	219
<i>II.1 Chromatographic methods</i>	219
<i>II.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H, ¹³C NMR)</i>	219
<i>II.3 Mass spectroscopy</i>	220
<i>II.4 UV-visible spectra</i>	220
<i>II.5 Fluorescence spectra</i>	220
<i>II.6 Sonication</i>	220
<i>II.7 DOSY-NMR experiments</i>	220
<i>II.8 Microscopy analysis</i>	221
II.8.1 Cellular uptake of siRNA/Micelle complexes	221
II.8.2 Visualization of the effect of siPLK-1 on nuclei	221
II.8.3 Micelles characterization by Transmission Electron Microscopy (TEM)	222
II.8.4 Cellular uptake of immuno-micelles by confocal microscopy analysis	222
<i>II.9 Size and zêta potential measurements</i>	223
II.9.1 General parameters	223
II.9.2 Size distribution of siRNA complexes	223
II.9.3 Micelle swelling	223
<i>II.10 Gel retardation assay</i>	224
II.10.1 Agarose gel	224
General protocol	224
Complex stability	224
II.10.2 Polyacrylamide gel	225
SDS-PAGE	225
NuPAGE	226
<i>II.11 Primary amine quantification (TNBS)</i>	226
<i>II.12 Critical Micelle Concentration (CMC) determination</i>	227
<i>II.13 Potentiometric titrations</i>	227
<i>II.14 Drug encapsulation ratio</i>	228
III. Formulations	229

III.1 Micelle formulation	229
III.2 siRNA/micelle complexation	229
III.3 Anti-tumoral drug encapsulation	229
IV. Surfactant synthesis	230
Synthesis of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pentacos-10,12-diyanoate (compound 1)	230
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxamine (compound 2)	231
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-L-histidine (compound 3)	232
Synthesis of C ₁₆ trioxa-L-histidine (compound 3')	233
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-L-tyrosine (compound 4)	234
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-L-pyridin (compound 5)	235
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-L-Alanine (compound 6)	236
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-L-Valine (compound 7)	237
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-Hist-Hist (compound 8)	238
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-glycine (compound 9)	239
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-RM43 (compound 10)	240
Synthesis of C ₂₅ diynetrioxa-RM45 (compound 11)	240
V. Immuno-micelle synthesis	242
V.1 Preparation of immuno-micelle via SPAAC reaction	242
V.2 Preparation of immuno-micelle via amine-thiol coupling	242
V.3 Preparation of immuno-micelle via non-covalent interaction	243
V.3.1 Preparation of oligonucleotide-BCN (BCN-ON)	243
V.3.2 Preparation of antibody-oligonucleotide conjugate (T-ON)	244
V.3.3 Formulation of immuno-micelle (T-M)	244
VI. In vitro experiments	245
VI.1 Cell culture	245
VI.2 Luc-siRNA transfection	245
VI.2.1 In absence of serum	245
VI.2.1 In serum	246
VI.3 Quantification of the luciferase gene silencing	246
VI.4 MTT cytotoxicity assay	246
VI.5 Transfection in the presence of bafilomycin A1	247
VI.6 siPLK-1 transfection	247
VI.7 Co-delivery efficiency	248
VI.8 Combinaison index	248
VI.9 Immuno-micelle system evaluation	248

VII. *In vivo* Experiments

250

I. Materials

I.1 Reagents and solvents

Unless indicated, all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, Merck or Acros Organics and used without further purifications. All the solvents were purchased from Sigma-Aldrich or VWR-Prolabo.

Experiments requiring anhydrous conditions were realized under atmosphere of argon in flame-dried glassware.

Synthesis involving photosensible compounds were carried out away from light in amber glassware.

I.2 Nucleic acid sequences

Nucleic acids were synthesized by Eurogentec or IDT and provided in annealed form and HPLC purified.

Sequences are as follows:

siLuc	sense: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A <i>TT</i> -3' antisense: 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG <i>TT</i> -3'
siPLK1	sense: 5'-AGA UCA CCC UCC UUA AAU AUU-3' antisense: 5'-UAU UUA AGG AGG GUG AUC UUU-3'
siCTL	sense: 5' -CGU ACG CGG AAU ACU UCG <i>ATT</i> -3' antisense: 5'-U CGA AGU AUU CCG CGU ACG <i>TT</i> -3'
siRNA-Cy5	sense: 5'- Cy5-CUU ACG CUG AGU ACU UCG <i>ATT</i> -3' antisense: 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG <i>TT</i> -3'
siRNA-Cy3	sense: 5'- Cy3-CUU ACG CUG AGU ACU UCG <i>ATT</i> -3' antisense: 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG <i>TT</i> -3'
ON	5'-/5AmMC12/CCG AAG ATA CGA ATT CGG GTG TTC TGC TGG TAG TGG TCG G/3Cy5Sp/-3'

With in bold, the 2'-OMethylated modified ribonucleotides

I.3 Buffering solutions

All buffering solutions were prepared as described below.

- HBG 20 mM pH 7.5 (10 mM Hepes, 10 mM Hepes-Na and 5% glucose w/v)
- HEPES 20 mM pH 7.5 (10 mM Hepes, 10 mM Hepes-Na)
- Tris-acetate 40 mM pH 7.5 (Tris-base 1 M, concentrated acetic acid)

TBE 10x was purchased from Invitrogen.

PBS was obtained from Sigma-Aldrich.

II. Analysis

II.1 Chromatographic methods

Reaction monitoring was controlled with analytical thin layer chromatography (TLC) using 60F-254 silica gel plates purchased from Merck.

Visualization was achieved under 254 nm and/or 365 nm UV light and by immersion in a solution of vanillin, ninhydrine or phosphomolybdic acid.

Purifications by column chromatography were realized using silica gel 60 from Merck (0.063-0.2 mm; 70-230 mesh ASTM).

II.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H , ^{13}C NMR)

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature on the following spectrometer: Bruker Advance 400 (NMR ^1H : 400 MHz and NMR ^{13}C : 75 MHz).

Recorded shifts were reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent (CHCl_3 : ^1H 7.26 ppm; ^{13}C 77.16 ppm, MeOH ^1H 3.31 ppm; ^{13}C : 49.0 ppm). Data were represented as follows, chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet and m = multiplet), coupling constant (J in Hz), integration and attribution.

NMR spectra were obtained using the commercial software NMRnotebook.

II.3 Mass spectroscopy

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and Low-resolution mass spectra (LCMS) using an Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with an Agilent HPLC 1200 SL.

II.4 UV-visible spectra

UV-visible spectra were recorded on Cary 100 Varian spectrophotometer using the Cary Win UV software (modules: scan and simple reads).

II.5 Fluorescence spectra

Fluorescence was quantified on a RF-5301 PC spectrofluorophotometer (Shimadzu).

II.6 Sonication

Sonication steps were realized in an ultrasound bath Fisher Scientific FB15047.

II.7 DOSY-NMR experiments

The solution of polymerized micelles, non-polymerized micelle or dialyzed polymerized micelle was evaporated in speed vacuums. The remaining solid was solubilized in deuterated methanol and analyzed in DOSY-NMR experiments.

1D-¹H and 2D-DOSY experiments were carried out at 300 K on a 600 MHz Bruker Avance III NMR spectrometer with 5 mm DOTY probe delivering up to 500 G / cm gradients.

The DOSY spectra are obtained by applying an Inverse Laplace Transform (ILT) along the diffusion axis, using the commercial software NMRnotebook.

The measured diffusion coefficients were calculated from the Stokes Einstein relation for the diffusion of spherical particles through a liquid:

$$D = \frac{k \beta T}{6 \pi \eta r(h)}$$

The percentage of covalently bridged surfactants versus monomer molecules could be calculated from peak integration from the 2D-plot.

II.8 Microscopy analysis

II.8.1 Cellular uptake of siRNA/Micelle complexes

Twenty-four hours prior to transfection, A549-luc cells were seeded at a density of 1.2×10^4 cells per well in Lab-tek® II chamber slide from Thermo Fisher. Complexes were formed by adding 0.5 μL of 7 mM solution of micelle on Cy5-labeled siRNA (35 ng/well which correspond to a final concentration of 10 nM) pre-diluted in HBG. Samples were mixed and incubated one hour at room temperature. 50 μL of the complexes were added onto the cells in absence of serum in 250 μL RPMI 1640 medium. After 4 h of incubation, 30 μL of fetal bovine serum (Eurobio Les Ulis, France) were added to obtain 10% serum concentration. After 24h, the medium was replaced by fresh phenol red free medium and fluorescence microscopy was performed on a fluorescence microscope Leica FW 4000 at 37°C using Cy5 standard filter.

II.8.2 Visualization of the effect of siPLK-1 on nuclei

Twenty-four hours prior to transfection, 2.5×10^4 HeLa cells were seeded per well in 24-multiwell tissue culture plates. Complexes were formed between siPLK1 or siCTL and MPD-hist (N/P = 5.6), by adding the micelles to different amounts of siPLK-1 pre-diluted in HBG to obtain final concentrations of 10, 100 and 200 nM. Samples were mixed and incubated one hour at room temperature. One hundred microliters of the complexes were added onto the cells in absence of serum in 500 μL DMEM. After 4h of incubation, 60 μL of fetal bovine serum were added to obtain 10% serum concentration. Forty-eight hours after transfection, the medium was removed and the cells were washed 3 times in PBS. Ice-cold MeOH to cover the cells was added to fix the cells. Fifteen minutes after, cells were washed again and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a solution of Hoechst 33342 in deionized water (5 mg/mL) were added. After 30 min of incubation at room temperature, fluorescence microscopy was performed on an Axio Vert A1 microscope (Zeiss) using DAPI standard filter.

II.8.3 Micelles characterization by Transmission Electron Microscopy (TEM)

Sample preparation: complexes were formed in 10 mM HEPES buffer at 1 mg/mL micellar concentration and at N/P values of 50 (the same as determined to be optimal for siRNA delivery). Control micellar solution was also diluted in 10 mM HEPES buffer at pH = 7.5.

Grids were prepared at one-hour complexation time.

Observation: the samples of micellar solutions as well as the complexes formed with siRNA were analyzed by a low voltage transmission electron microscope at 5 kV, the benchtop Low-voltage Electron Microscope LVEM5 by DeLong instruments. Observation at low voltage 5000 V (compared to 50-10 kV in classical TEM) permits the direct observation of objects composed of light elements with high contrast without using heavy metal staining or shadowing. This way native structures of organic materials that exist in solution can be observed directly. For optimum contrast we used ultrathin carbon grids with 3 - 4 nm thickness, the Ultrathin C Type-A grids from TED Pella INC. The protective formvar layer was removed by dipping the grids in chloroform following manufacturer's instructions. The carbon grids were then ionized in a Glow discharge system ELMO for EM grids (Cordouan technologies). A glow discharge treatment with air renders the hydrophobic carbon film surface negatively charged and hydrophilic, which allows for optimal wetting with the sample solutions and attachment of analyzed nanomaterial (that is positively charged in our case). The parameters used are as follows: 25 second flow of plasma discharge at 0.1 – 0.15 mbar atmosphere and 1.2 – 1.4 mA. Ionized grids were treated for 1 minute with 5 μ L samples at 1 mg/mL surfactant concentration, dried over filter paper and analyzed directly without further preparation with the LVEM5 in TEM mode at 150 000 – 200 000-fold magnification.

II.8.4 Cellular uptake of immuno-micelles by confocal microscopy analysis

Twenty-four hours prior to transfection, SKBR3 and MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in Lab-tek® II chamber slide from Thermo Fisher. Complexes were formed by adding different amounts of immuno-micelle or micelle on siRNA-Cy3 diluted in HBG in order to obtain a final concentration of siRNA of 50 nM (N/Pg = 6). Samples were mixed and incubated one hour at room temperature. 40 μ L of the complexes were added onto the cells in 200 μ L DMEM medium supplemented by 10% of serum. After 3 h of incubation, the medium was removed and the cells washed twice with PBS. Cells were

fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS. After 30 min of incubation at room temperature, cells were rinsed with cold PBS and then deionized water. The chamber was removed and cells were coverslipped using an aqueous mounting medium containing DAPI (fluoroshield from Sigma). Confocal microscopy was performed on a Leica SPE confocal microscope 11506513 (Lasers used: DAPI 405 nm, Cy3 561 nm and Cy5 635 nm, objective 63x), Image size: 367.83 μm \times 367.83 μm .

II.9 Size and zêta potential measurements

II.9.1 General parameters

The hydrodynamic diameters of the micelles or complexes were determined by using the Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instruments) with the following specifications: material index of refraction: 1.43 (liposome); sampling time = 55 s; refractive index of HBG 1.337 or water 1.33; viscosity of HBG: 1.1557 or water 0.8872; temperature = 25°C by using micro-cuvettes of 90 μL for size. The values correspond to average size \pm standard deviation of three runs.

For zêta potential measurements, the same instrument was used with the appropriated cuvettes (1 mL) and an effective voltage of 70 V. If the sample is sufficiently concentrated, size and zêta measurements can be made on the similar sample

II.9.2 Size distribution of siRNA complexes

Complexes were prepared by mixing 2 μL of micelle (7 mM) with increasing amounts of siRNA in HBG (Hepes buffered glucose) (pH 7.5). The resulting complexes have N/P ratios ranging from 5 to 50. After 1-hour incubation at room temperature, size distribution of the complexes was determined by DLS.

II.9.3 Micelle swelling

100 μL of micelles/siRNA complexes at N/P 40 were prepared in HBG (pH = 7.4). After 1 hour of incubation at room temperature, increasing volumes of acetic acid (200 mM) were added to the preformed complexes in order to lower the pH progressively. Size distributions of the complexes were determined after each addition of acid by DLS. Titration of HBG with acetic acid, such as performed for siRNA-complex acidification, was recorded with a pH-meter PHM210 from MeterLab.

II.10 Gel retardation assay

II.10.1 Agarose gel

General protocol

Complexes were prepared by mixing 300 ng of siRNA with increasing amount of vector in HBG (pH 7.5). The resulting complexes have different N/P ratio, which are defined by the amount of positive charges of the micelles (N) and the number of phosphate groups of the siRNA (P). The complexes were incubated for 1 hour at 25 °C. Loading buffer (3 μ L, TBE or T-A containing 30% glycerol) was added in each sample. 20 μ L of samples were deposited on the gel. All samples were electrophoresed (80 V, 30 min) in a 1.3 % (w/v) agarose gel in TBE or in T-A running buffer, stained with Sybersafe and visualized on an UV transilluminator using a Gel Documentation System (Bio-Rad).

Complex stability

- In 10% serum

100 μ L of micelle/siRNA complexes containing 4 μ g of siLuc at N/P 10 and 40 were prepared in HBG (Tableau 17). After 1 hour incubation at room temperature, an equal volume of RPMI supplemented with 20% FBS was added and incubated at 37°C. The same experiment was performed with free siLuc as control. At each time interval (0 min, 1h, 2h, 4h and 24h), 20 μ L of the mixture was removed and stored at -20°C. The stability of the complexes in serum was then analyzed by gel electrophoresis (100 V, 30 min) with 1.3 % agarose gel in Tris-Acetate running buffer (pH=7.5) stained with SybersafeTM and visualized on an UV transilluminator using a Gel Documentation System (Bio-Rad).

N/P =10		
	Complex (μ L)	Control (μ L)
siLuc (100 μ M)	3	3
MPD-Hist (7 mM)	18	0
HBG (20 mM)	79	97
N/P =40		
	Complex (μ L)	
siLuc (100 μ M)	3	
MPD-Hist (7 mM)	70.2	
HBG (20 mM)	26.8	

Tableau 17: Calculation for complexes formation for serum stability experiment

- In presence of polyanionic polymers

Micelle/siRNA complexes containing 0.4 μg of siLuc at N/P 10 and 40 were prepared and incubated 1 hour before being mixed with increasing concentrations of dextran sulfate (MW=500,000 g/mol) for 2h at 25°C (Tableau 18). S/P ratio was defined as the molar ratio of sulfate groups in dextran sulfate to phosphate groups in siRNA. Complex stability in presence of the polyanionic polymer was then analyzed by gel electrophoresis (100 V, 30 min) with 1.3 % agarose gel in Tris-Acetate running buffer (pH=7.5) stained with Sybersafe™ and visualized on an UV transilluminator using a Gel Documentation System (Bio-Rad).

N/P =10						
S/P	0	1	2	3	5	10
siluc (5 μM) μL	6	6	6	6	6	6
MPD-Hist (7 mM) μL	-	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
HBG 20 mM) μL	14	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3
Dextran (1 μM) μL	0	0.4	0.8	1.2	2	4
N/P =40						
S/P	0	1	2	3	5	10
siluc (5 μM) μL	6	6	6	6	6	6
MPD-Hist (7 mM) μL	-	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
HBG 20 mM) μL	14	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
Dextran (1 μM) μL	-	0.4	0.8	1.2	2	4

Tableau 18: Calculation for complexes formation for stability in presence of polyanionic polymer experiment.

II.10.2 Polyacrylamide gel

SDS-PAGE

Reducing and non-reducing SDS-PAGE was performed on 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel (Bio-Rad) following standard lab procedures.

To samples containing micelle, antibody or antibody conjugates (10 μL , 0.1 mg/mL in H₂O) was added 4 μL of loading buffer (4x reducing or non-reducing Laemmli SDS sample buffer, Alfa Aesar) and heated at 100 °C for 7 minutes (Tableau 19). 10 μL of each sample were deposited on the gel. The gel was then run at constant voltage (200 V) for 30 min using SDS 1x as a running buffer. Fluorescence was visualised on GeneGenius bio-imaging system (Syngene) with appropriate filter prior to staining with Coomassie Blue.

	T	T-ON	M	T : M			T-ON : M		
N/P	/	/	/	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3	1,1	5,6	11
T (μL) (0,1 mg/mL)	10	0	0	10	10	10	0	0	0
T-ON (μL) (0,1 mg/mL)	0	10	0	0	0	0	10	10	10
Micelles (μL) (1 mg/mL)	0	0	3,5	0,4	1,8	3,5	0,4	1,8	3,5

Tableau 19: Calculation for the formulation of immune-micelle for electrophoresis gel.

NuPAGE

Native gel was performed using Tris-acetate 3-8% NuPAGE gel (Invitrogen).

Samples were prepared by mixing increasing amounts of micelle (1 mg/mL) with antibody or antibody-oligonucleotide conjugate (10 μL , 0.1 mg/mL in H_2O) supplemented or not by siRNA (5 μL , 5 μM in H_2O) in HBG. The resulting complexes have different N/Pg ratio, which are defined by the amount of positive charges of the micelles (N) and the number of phosphate groups of the siRNA and the oligonucleotide (P). Loading buffer (10 μL , T-A containing 30% glycerol) was added in each sample. 10 μL of samples were deposited on the gel. The gel was then run at constant voltage (220 V) for 40 min using tris-acetate buffer (40 mM, pH=7.5) as a running buffer. Fluorescence was visualised on GeneGenius bio-imaging system (Syngene).

II.11 Primary amine quantification (TNBS)

20-300 $\mu\text{g/mL}$ of solution of surfactant were prepared in reaction buffer (0.1 M sodium bicarbonate, pH=8.5). 10 μL of a 1% solution of TNBS in methanol were added to 990 μL reaction buffer for every mL required. Then 250 μL working solution of TNBS was added to 500 μL of each sample and standards and were mixed. All the samples were incubated for 2 h at 37°C. To stop the reaction 250 μL 10% SDS and 125 μL 1N HCl were added. The absorbance was measured at 335 nm on a Cary 100 Varian spectrophotometer.

II.12 Critical Micelle Concentration (CMC) determination

The CMC values were determined by using the pyrene inclusion method as described. This method makes use of the environment specific fluorescence of pyrene probe as a detection of organized lipidic environment.

A set of dilutions in water were prepared from 10 mM stock solution of micelles ranging from 2 mM to 1 μ M. 1 μ L of 1 mM DMSO solution of Pyrene was added to 1 mL of each sample and strongly stirred. Samples were left for 2 hours until fluorescence measurement.

Fluorescence spectra were recorded on a RF-5301 from Shimadzu Corporation at 339 nm UV excitation wavelength at 5 nm band pass. The relative intensities at 373 nm and 384 nm were recorded. The ratios of the relative fluorescence intensities $I_{373\text{nm}}/I_{384\text{nm}}$ were plotted against log of millimolar concentrations. CMC is deduced from the inflexion point in the obtained graph.

II.13 Potentiometric titrations

The carbonate-free 0.1 M NaOH used for titration was prepared from a standardized 1 M solution (Merck). 0.1 M HCl was from Fluka. Water was deionized on a Millipore Milli-Q apparatus and boiled to remove traces of dissolved CO₂. The ionic strength was kept constant ($I = 0.1$) by addition of NaCl of the highest purity (> 99%; Merck). Potentiometric titrations were performed with a Radiometer Autoburette ABU901 and a Radiometer pH-meter PHM240 connected to a computer. The combined glass electrode was standardized with 10⁻² M HCl and its slope determined from a refinement of the titration curves of HCl solutions. All measurements were performed within a thermo-regulated cell at 25.0 \pm 0.5 °C.

0.05 M HCl (0.05 mL) was added to a 5 mM solution (MeOH/H₂O 80/20) of monomers (0.5 mL) or to a 5 mM aqueous solution of micelles. The so-obtained solutions were titrated by incremental addition of 6 mM NaOH (0.01 mL). For a classical titration, 120-150 points (volume of titrant, pH) were recorded. Macroscopic protonation constants were determined by using the Hyperquad program.

Stepwise macroscopic protonation can be defined by a stepwise constant K_{ih} related to equilibrium (1) and Equation (2). Those protonation constants K_{ih} are deduced from the refined β_{ih} values by Equation (3)



$$K_{lh} = \frac{[\text{LH}_h^{(1-h)-}]}{[\text{LH}_{h-1}^{(2-h)-}][\text{H}^+]} \quad (2)$$

$$\beta_{lh} = \prod_{i=1}^h K_{lh} \quad (3)$$

The uncertainties are estimates of the standard deviation as calculated by Hyperquad for the macroconstants.

These experiments were performed with the help of Dr. Nassera Tounsi⁴.

II.14 Drug encapsulation ratio

Various volumes of a solution of CPT (0.2 mg/mL) in DMSO were freeze-dried under vacuum in order to obtain the desired amounts of drug. Then, 100 μL of MPD-Hist (0.5 mg/mL) were added into each sample, and the mixtures were sonicated for 2 hours before being filtrated through a 0.45 μm filter to remove the non-encapsulated CPT. Fluorescence was quantified before and after filtration on a RF-5301 PC spectrofluorophotometer (Shimadzu) with the following wavelength: $\lambda_{\text{Ex}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 440 \text{ nm}$.

⁴ Laboratoire d'innovation thérapeutique - UMR7200, Illkirch-Graffenstaden

III. Formulations

III.1 Micelle formulation

The formation of micelles was performed by solubilizing 5 mg of amphiphile into a solution of HCl 0.1 N and ethanol (1/5). The solvent was evaporated under reduced pressure until a film formation. The film was then solubilized in 1 mL of deionized water and sonicated during 30 min (80 W, 25°C) to obtain micelles. The solutions were polymerized at various UV-irradiation times at 254 nm and 48 W in 1 mL quartz cuvettes into a Cross-Linker Bio-Link 254 (Fisher Bioblock) to obtain the polymerized micelles. The dialyses were performed in 2,000 MWCO dialysis cassettes (Thermo Fisher) using a stepwise solvent gradient from 7:3 EtOH/H₂O to pure water in 4 days.

III.2 siRNA/micelle complexation

siRNA/micelle complexes were formulated by adding micelles in a solution of siRNA pre-diluted in HBG. Depending on the quantities introduced, a N/P ratio was defined as follow:

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{monomer}) * 1 (\text{mol})}{n(\text{siRNA}) * 42 (\text{mol})}$$

The complexes were incubated 1 hour at room temperature before being used.

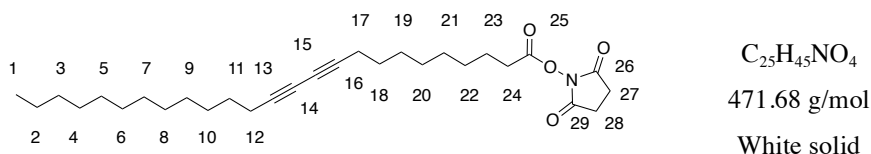
III.3 Anti-tumoral drug encapsulation

Several volume of a solution of ant-tumoral drug in DMSO (5 mg/mL) was freeze-dried under vacuum in order to obtain the desired weights. The remaining solid was then solubilized with a 5 mg/mL solution of micelle to obtain a 1:10 w/w ratio and the mixture was sonicated for 2 hours. The solution was then filtered through 0.45 μm filter to provide drug encapsulated in micelles.

IV. Surfactant synthesis

To facilitate the interpretation of NMR spectra, all molecules have been numbered in the same manner without taking the conventional numbering.

Synthesis of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pentacos-10,12-diynoate (compound 1)



To a solution of 10,12-pentacosadiynoic acid (1 eq, 10 g, 26.7 mmol) and N-hydrosuccinimide (1.5 eq, 4.61 g, 40 mmol) in dichloromethane were added 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.5 eq, 7.68 g, 40 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (1.5 eq, 5.18 g, 6.5 mL, 40 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature out of direct light. After evaporation of the solvents the crude product was dissolved in DCM and extracted with water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered off and evaporated to provide compound **1** (12.6 g, 26.7 mmol, 100%)

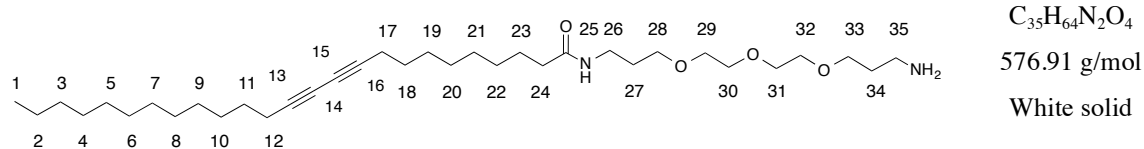
Yield: 100 %

R_f = 0.42 (AcOEt/Cyclohexane 4/6)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.835 (s, 4H, H-27 and H-28), 2.59 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, H-24) 2.23 (t, *J*=7.1 Hz, 4H, H-12 and H-17), 1.74 (q, 2H, H-23), 1.51 (q, 4H, H-11 and H-18), 1.44-1.37 (m, 4H, H-10 and H-19), 1.37-1.27 (m, 22H, alkyne chain), 0.88 (t, *J*=7 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 177.2 (C₂₆ and C₂₉), 176.7 (C₂₅), 77.4 (C_{13,16}), 67.0 (C_{14,15}), 35.9, 33.2-27.2, 23.9, 19.8 and 14.6 ppm.

Synthesis of C₂₅diynetroxaamine (compound 2)



Compound **1** (1 eq, 5g, 10.6 mmol) was dissolved in dry DCM and 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (2.5 eq, 6 g, 26.5 mmol) was added drop by drop. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1 as eluent affording the desired compound (4.25 g, 7.4 mmol, 70%).

Yield: 70%

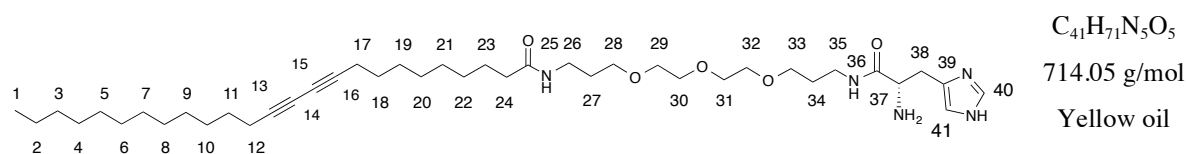
R_f = 0.25 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.69-3.63 (m, 8H, H-29, H-30, H-31 and H-32), 3.61-3.58 (m, 2H, H-33), 3.51 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, H-28), 3.23 (t, *J*=7.1 Hz, 2H, H-26), 3.10 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, H-35), 2.22 (t, *J*=7.1 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.16 (t, *J*=7.1 Hz, 2H, H-24), 1.93 (q, 2H, H-34), 1.76 (q, 2H, H-27), 1.63-1.59 (m, 2H, H-23), 1.54-1.47 (m, 4H, H-11 and H-18), 1.44-1.37 (m, 4H, H-10 and H-19), 1.37-1.27 (m, 22H, alkyne chain), 0.90 (t, *J*=7 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4 (C₂₅), 78.0-77.9 (C_{13,16}), 71.7-70.04 (PEG chain), 66.6 (C_{14,15}), 40.3-37.3, 33.2-29.6, 27.2, 23.9, 19.8 and 14.6 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 577.5 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroxa-L-histidine (compound 3)



To a solution of C₂₅diynetroxaamine **2** (1 eq, 510 mg, 0.884 mmol) in dried dichloromethane, *N*α-(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine (1.2 eq, 271 mg, 1.06 mmol), 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.5 eq, 254 mg, 1.33 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (1.5 eq, 0.2 mL, 1.33 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight under argon atmosphere at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording the C₂₅diynetroxa-*N*α-(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine (620 mg, 86%).

To a solution of the last compound in dried dichloromethane, TFA (50 eq, 2.8 mL, 38.1 mmol) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording desired product **3** (360 mg, 66%).

Yield: 66%

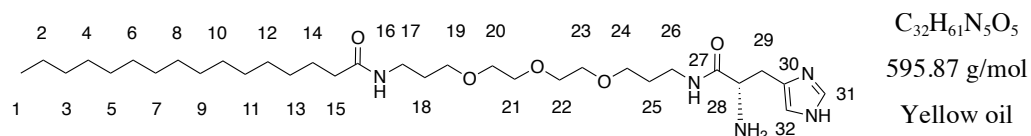
R_f = 0.35 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.97 (s, 1H, H-40), 7.52 (s, 1H, H-41), 4.17 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-37), 3.65-3.55 (m, 8H, H-29, H-30, H-31 and H-32), 3.53-3.44 (m, 4H, H-28 and H-33), 3.35-3.22 (m, 6H, H-26, H-35 and H-38), 2.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-24), 1.77-1.69 (m, 4H, H-34 and H-27), 1.64-1.57 (m, 2H, H-23), 1.54-1.47 (m, 4H, H-18 and H-11), 1.43-1.28 (m, 26H, alkyne chain), 0.9 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.3 (C₂₅), 169.6 (C₃₆), 136.9, 133.1, 119.7, 117.8, 116.8 (C_{imidazol}), 78.0-77.9 (C_{13,16}), 71.7-69.8 (PEG chain), 66.6 (C_{14,15}), 54.7, 38.4-33.2, 30.2-29.7, 27.2, 23.9, 19.8, 14.6 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* 714.554 ([*M*+*H*]⁺, calcd. for C₄₁H₇₂N₅O₅ 714.554)

Synthesis of C₁₆trioxa-L-histidine (compound 3')



This synthesis was realized according to the protocol used for the synthesis of compound **3** with the exception that the starting material C₂₅diynetroxaamine **2** has been replaced by a C₁₆trioxaamine compound synthesized by Patrick Neuberg.

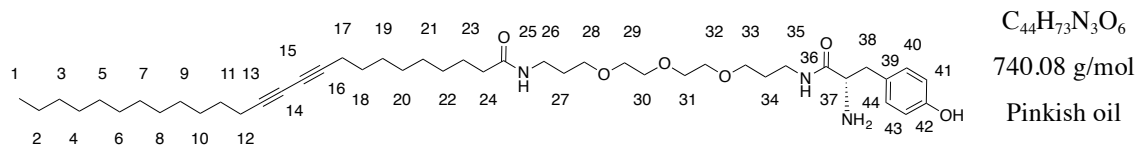
Yield: 70%

R_f = 0.4 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (s, 1H, H-31), 6.82 (s, 1H, H-32), 3.65 (t, *J*=6.8 Hz, 1H, H-28), 3.63-3.38 (m, 12H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23 and H-24), 3.35-3.21 (m, 4H, H-17 and H-26), 2.98 (d, *J*=6.4, 2H, H-29), 2.13 (t, *J*=7.6, 2H, H-15), 1.72 (m, 4H, H-18 and H-25), 1.58 (m, 2H, H-14), 1.28-1.22 (m, 24H, alkyne chain), 0.87 (t, *J*=6.8, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 176.3 (C₁₆), 169.6 (C₂₇), 136.9, 133.1, 119.6, 116.8 (C_{imidazol}), 71.9-70.9 (PEG chain), 54.7, 38.5-33.1, 30.1-29.6, 25.2, 22.8, 14.1 ppm.

LCMS (ESI): m/z 596.5 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroxa-L-tyrosine (compound 4)

To a solution of C₂₅diynetroxaamine **2** (1 eq, 150 mg, 0.404 mmol) in dried dichloromethane, *N*α-Boc-L-tyrosine hydroxysuccinimide (1.5 eq, 357 mg, 0.619 mmol) and Et₃N (2 eq, 0.1 mL, 0.809 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting mixture was extracted with DCM and finally purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording the C₂₅diynetroxa-*N*α-(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine (220 mg, 66%).

To a solution of the last compound in dried dichloromethane, TFA (50 eq, 1 mL, 14 mmol) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording desired product **4** (170 mg, 88%).

Yield: 88%

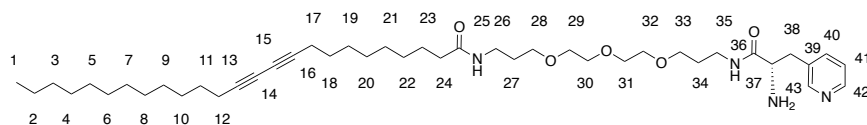
R_f = 0.65 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.52 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, H-40 and H-44), 7.04 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, H-41 and H-43), 3.66 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, H-37), 3.63-3.48 (m, 10H, H-29, H-30, H-31, H-32 and H-33), 3.40-3.13 (m, 6H, H-26, H-35 and H-28), 2.98-2.82 (m, 2H, H-38), 2.24 (t, *J*=6.4 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.17 (t, *J*=7.4 Hz, 2H, H-24), 1.94-1.71 (m, 2H, H-34), 1.70-1.64 (m, 2H, H-27), 1.64-1.57 (m, 2H, H-23), 1.54-1.44 (m, 4H, H-18 and H-11), 1.43-1.25 (m, 26H, alkyne chain), 0.9 (t, *J*=7 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4 (C₂₅), 173.5 (C₃₆), 157.9 (C₄₂), 131.6 (C_{40,44}), 119.7 (C₃₉), 116.7 (C_{41,43}), 78.0-77.9 (C_{13,16}), 71.7-71.4 (PEG chain), 66.6 (C_{14,15}), 57.3, 40.1, 37.9-37.3, 33.2-29.1 (alkyne chain), 27.2, 23.9, 19.9 and 14.6 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* 762.538 ([M+Na]⁺, calcd. for C₄₄H₇₃N₃NaO₆ 762.538)

Synthesis of C₂₅diynetroixa-L-pyridin (compound 5)



C₄₃H₇₂N₄O₅
725.07 g/mol
Yellow oil

To a solution of C₂₅diynetroixaamine **2** (1 eq, 210 mg, 0.36 mmol) in dried dichloromethane, Boc-3-(3-pyridyl)-Ala-OH (1.2 eq, 115 mg, 0.432 mmol), 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.5 eq, 115 mg, 0.432 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (1.5 eq, 0.1 mL, 0.54 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight under argon atmosphere at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording the C₂₅diynetroixa-N α -(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine (110 mg, 37%).

To a solution of the last compound in dried dichloromethane, TFA (50 eq, 3 mL) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording desired product **5** (44 mg, 47%).

Yield: 47%

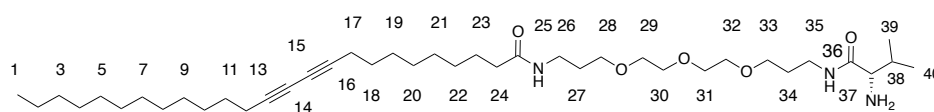
Rf = 0.25 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 8.91 (m, J = 17,6 Hz, 2H, H-42 and H-43), 8,31 (d, J = 6,8 Hz, 1H, H-40), 7,89 (bt, 1H, H-41), 4.11 (t, J = 7,2 Hz, 1H, H-37), 3.56-3.50 (m, 8H, H-29, H-30, H-31 and H-32), 3.44-3.35 (m, 4H, H-28 and H-33), 3.29-3.17 (m, 6H, H-26, H-35 and H-38), 2.17 (t, J =6.8 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.10 (t, J =7.5 Hz, 2H, H-24), 1.67-1.59 (m, 4H, H-34 and H-27), 1.54-1.51 (m, 2H, H-23), 1.45-1.41 (m, 4H, H-18 and H-11), 1.39-1.23 (m, 26H, alkyne chain), 0.83 (t, J =6,8 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 176.4 (C₂₅), 168.5 (C₃₆), 146.8, 145.7, 144.3, 136.04, 128.1 (C_{pyridin}), 78.0 (C_{13,16}), 71.7-71.3 (PEG chain), 70.0-69.9 (PEG chain), 66.6 (C_{14,15}), 54.9, 38.4-33.2, 30.9-29.7 (alkyne chain), 27.2, 23.9, 19.8, 14.6 ppm.

HRMS (ESI): m/z 762.538 ([M+Na]⁺, calcd. for C₄₄H₇₃N₃NaO₆ 762.538)

Synthesis of C₂₅diynetroxa-L-Valine (compound 7)



C₄₀H₇₃N₃O₅
676.04 g/mol
Yellow oil

A solution of C₂₅diynetroxaamine **2** (1 eq, 295.5 mg, 0.5 mmol) in dried dichloromethane (30 mL) was stirred for 10 minutes over molecular sieve. Boc-L-valine hydroxysuccinimide (1.2 eq, 284.3 mg, 0.6 mmol) and Et₃N (1 eq, 0.07 mL, 0.5 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 6 days at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and adsorbed on cellulose for chromatography. Compound was purified by silica gel column chromatography eluting with dichloromethane then with DCM/MeOH/NH₄OH mixtures (step gradients from 95/5/0.5 to 85/15/1.5) affording C₂₅diynetroxa-N α -(tert-butoxycarbonyl)-L-valine (513 mg, 77% pure).

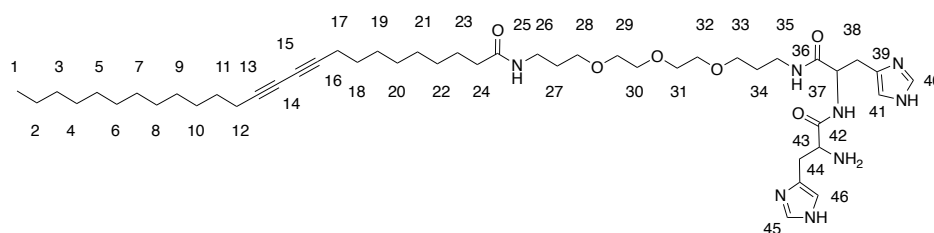
Isolated N-Boc-protected compound (1 eq, 500 mg, 0.49 mmol) was cooled to 5°C and stirred with excess TFA (5 mL, 183 eq, 67 mmol) in an ice/water bath for 3 hours. The TFA is evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator. The crude product was purified by silica gel column chromatography eluting with DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/1 affording deprotected compound **7** C₂₅diynetroxa-Valine (260 mg, 0.38 mmol, 77% yield)

Yield: 77%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53-7.45 (m, 1 H, NH), 6.34-6.26 (m, 1 H, NH), 3.68-3.52 (m, 12 H, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32 and H-33), 3.41-3.31 (m, 4 H, H-26 and H-34), 3.23-3.17 (d, 1 H, H-37), 2.24 (t, $J=6.90$ Hz, 4 H, H-12 and H-17), 2.14 (t, $J=7.65$ Hz, 2 H, H-24), 1.88-1.69 (m, 4 H, H-27 and H-34), 1.68-1.56 (m, 2 H, H-23), 1.56-1.33 (m, 4 H, H-11 and H-18), 1.32-1.23 (m, 26 H, alkyne chain), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, H-40), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3 H, H-1), 0.83 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-39) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 173.10 (C₂₅), 169.6 (C₃₆), 77.61-70.16 (PEG chain), 65.33-65.26 (C_{14,15}), 60.35, 37.78, 37.02, 36.82, 31.93, 31.00, 29.66-28.98, 25.78, 22.69, 19.74, 19.23, 19.21, 16.23, 14.12 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 676.6 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroxa-Hist-Hist (compound 8)C₄₇H₇₈N₈O₆

850.6 g/mol

Yellow oil

To a solution of C₂₅diynetroxa-L-histidine **3** (1 eq, 192 mg, 0.23 mmol) in dried DMF (20 mL), *N*α-*N*_{im}-di-Boc-L-histidine (1.2 eq, 158 mg, 0.29 mmol), 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.2 eq, 56 mg, 0.29 mmol), HOBT (1.2 eq, 45 mg, 0.29 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (1.2 eq, 0.05 mL, 0.29 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight under argon atmosphere at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording the C₂₅diynetroxa-*N*α-*N*_{im}(di-Boc)-L-histidine (82 mg, 34%).

To a solution of the last compound in dried dichloromethane, TFA (50 eq, 3 mL) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography using a reversed-phase C18 column (eluent: MeOH- water containing 0.05% TFA) to afford the corresponding deprotected compounds **6** (30 mg, 45%).

Yield: 45%**R_f** = 0.32 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

% majord/minord 70/30

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (s, 1H, H-40), 8.88 (s, 1H, H-40*), 8.84 (s, 1H, H-45), 8.82 (s, 1H, H-45*), 7.46 (s, 1H, H-41), 7.43 (s, 1H, H-41*), 7.40 (s, 1H, H-46), 7.37 (s, 1H, H-46*), 4.7 (t, *J*=6.9 Hz, 1H, H-43), 4.33 (t, *J*=6.9 Hz, 1H, H-37), 3.65-3.55 (m, 8H, H-29 H-30 H-31 and H-32), 3.53-3.44 (m, 4H, H-28 and H-33), 3.35-3.22 (m, 6H, H-26 H-35 and H-38), 2.24 (t, *J*=6.8 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.18 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, H-24), 1.75-1.72 (m, 4H, H-34 and H-27), 1.61-1.58 (m, 2H, H-23), 1.51-1.46 (m, 4H, H-18 and H-11), 1.39-1.26 (m, 26H, alkyne chain), 0.88 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.5 (C₂₅), 172.2 (C₄₂), 169.1 (C₃₆), 136.4, 135.4, 130.8, 128.4, 119.3, 118.7, 78.1, 78.0, 71.7-7.2, 70.0-69.8, 66.6, 54.5, 53.3, 38.3-37.3, 33.2, 30.9-29.6, 28.2, 27.9, 27.2, 23.9, 19.8, 18.5, 14.6 ppm.

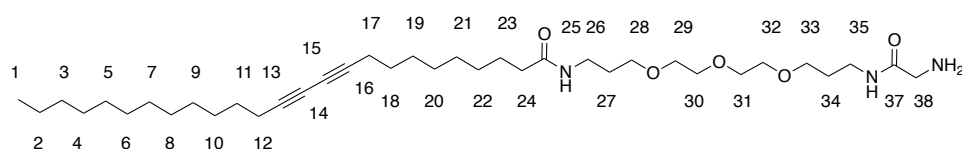
HRMS (ESI): *m/z* 873.595. ([*M*+Na]⁺, calcd. for C₄₇H₇₈N₈NaO₆ 873.595)

General procedure for the synthesis of compound 9 to 12

To a solution of natural or unnatural Fmoc-amino-acids (1.3 eq) in anhydrous DMF (5 mL) were added DIEA (1.3 eq), HATU (1.3 eq) and the C₂₅diynetrioxaamine **1** (0.17 mmol, 1 eq) which was previously solubilized in anhydrous DCM (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere and the mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product was then quickly purified by column chromatography using DCM/MeOH 9/1 as eluent affording the corresponding Fmoc-coupling compound.

To a solution of the last compound in DMF (3mL) was added piperidine (1mL). The reaction mixture was stirred for 2 hours under argon atmosphere. The mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using a reversed-phase C18 column (eluent: MeOH- water containing 0.05% TFA) to afford the corresponding deprotected compounds.

Synthesis of C₂₅diynetrioxa-glycine (compound 9)



C₃₇H₆₇N₃O₅
633.96 g/mol
White solid

Yield: 49%

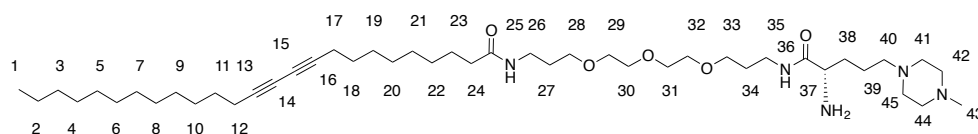
Rf = 0.22 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.67-3.53 (m, 12H, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32 and H-33), 3.42-3.31 (m, 6H, H-26, H-35 and H-37), 2.23 (t, *J*=7.6, 4H, H-12 and H-17), 2.14 (t, *J*=7.2, 2H, H-24), 1.84-1.74 (m, 4H, H-27 and H-34), 1.64-1.59 (m, 2H, H-23), 1.55-1.46 (m, 4H, H-11 and H-18), 1.40-1.23 (m, 26H, alkyne chain), 0.88 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.7 (C_{25,36}), 77.8 (C_{13,16}), 70.7-69.8 (PEG chain), 65.5 (C_{14,15}), 44.5, 37.7-36.9, 32.1, 29.9-28.5 (alkyne chain), 25.9, 22.9, 19.4, 14.4 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 634.70 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroxa-RM43 (compound 10)

C₄₅H₈₃N₅O₅

774.19 g/mol

Yellow oil

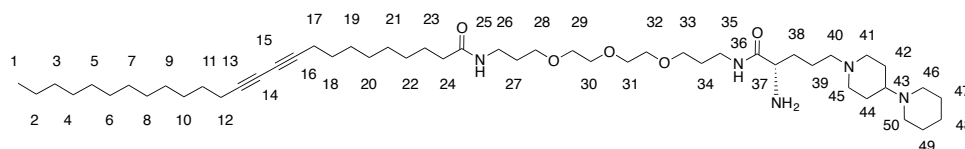
Yield: 48%**R_f** = 0.20 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.86 (m, 1H, H-37), 3.64-3.57 (m, 8H, H-29, H-30, H-31 and H-32), 3.52-3.40 (m, 8H, H-28, H-33, H-41 and H-45), 3.35-3.32 (m, 2H, H-26), 3.28-3.07 (m, 6H, H-35, H-41, H-42, H-44 and H-45), 2.92 (s, 3H, H-43), 2.91-2.85 (m, 2H, H-40), 2.24 (t, *J*=7.1 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.17 (t, *J*=7.1 Hz, 2H, H-24), 1.95-1.87 (m, 2H, H-38), 1.85-1.69 (m, 6H, H-27, H-34 and H-39), 1.64-1.57 (m, 2H, H-23), 1.56-1.45 (m, 4H, H-11 and H-18), 1.45-1.23 (m, 26H, alkyne chain), 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4 (C₂₅), 169.7 (C₃₆), 77.9 (C_{13,16}), 71.6-69.9 (PEG chain), 66.5 (C_{14,15}), 57.4-53.5 (C_{40,41,42,44,45}), 50.8, 43.7, 38.4-37.3, 33.2, 30.9-29.6 (alkyne chain), 27.1, 23.8, 22.1, 19.8, 14.5 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 774.54 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroxa-RM45 (compound 11)

C₅₀H₉₁N₅O₅

842.3 g/mol

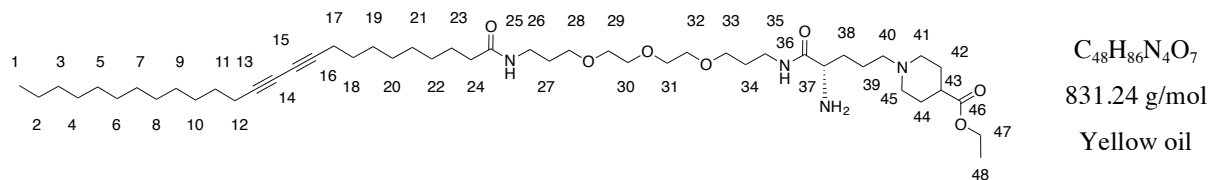
Yield: 59%**R_f** = 0.20 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.91-3.86 (m, 1H, H-37), 3.79-3.49(m, 18H, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-40, H-41 and H-45), 3.35-3.32 (m, 2H, H-26), 3.25 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, H-35), 3.21-2.99 (m, 5H, H-43, H-46 and H-50), 2.43-2.36 (m, 2H, H-38), 2.24 (t, *J*=7.1 Hz, 4H, H-12 and H-17), 2.18 (t, *J*=7.1 Hz, 2H, H-24), 2.0-1.71(m, 14H, H-27, H-34, H-42, H-44, H-47 and H-49), 1.66-1.56 (m, 2H, H-23), 1.56-1.44 (m, 6H, H-11, H-18 and H-48), 1.45-1.23 (m, 26H, alkyne chain), 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4 (C₂₅), 169.5 (C₃₆), 79.7-77.9 (C_{13,16}), 71.7-69.9 (PEG chain), 66.5 (C_{14,15}), 61.7-51.8 (C_{40,41,45,46,50}) 38.5-37.3, 33.2, 30.9-29.6 (alkyne chain), 27.2-22.9 (C_{38,42,44,47,48,49}), 21.1, 18.8, 14.6 ppm

LCMS (ESI+): m/z 842.60 [M+H]⁺

Synthesis of C₂₅diynetroixa-RM48 (compound 12)



Yield: 59%

R_f = 0.20 (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.18 (m, 2H, H-47), 3.77-3.71 (m, 1H, H-37), 3.71-3.55 (m, 12H, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32 and H-33), 3.42-3.31 (m, 4H, H-26 and H-35), 2.24 (t, J=6.4, 4H, H-12 and H-17), 2.17 (t, J=7.2, 2H, H-23), 2.14-1.98 (m, 8H, H-40, H-41, H-43 and H-45), 1.93-1.72 (m, 10H, H-27, H-34, H-42 and H-44), 1.63-1.57 (m, 2H, H-23), 1.54-1.46 (m, 6H, H-18, H-11, H-39), 1.43-1.26 (m, 29H, alkyne chain and H-48), 0.9 (t, J=6.8, 3H, H-1) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4 (C₂₅), 174.5 (C₄₆), 169.5 (C₃₆), 78.0-77.9 (C_{13,16}), 71.7-69.9 (PEG chain), 66.6 (C_{14,15}), 62.3 (C₄₇), 53.9-53.8 (C_{40,41,45}), 38.5-37.3, 33.2, 30.9-29.6 (alkyne chain), 27.2, 23.9, 20.9, 19.8, 14.6 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 831.4 [M+H]⁺

V. Immuno-micelle synthesis

BCN-PFP, TAMRA-PEG₆-N₃ and T-N₃ compounds were synthesized by Alain Wagner's team.

V.1 Preparation of immuno-micelle *via* SPAAC reaction

From the stock solution of BCN-PEG₆-PFP in DMSO, a 10 mM solution containing 10% DMSO was prepared. To 500 μ L of micelle (7mM, 1 eq.) diluted with PBS (100 mM) until pH reached 7.4, BCN-PEG₆-PFP (0.1 eq.) was added. The mixture was centrifuged and stirred overnight under argon atmosphere.

Control reactions:

To check the success of BCN coupling to the micelle, a click reaction was performed.

In a 2 mL Eppendorf tube, BCN-M and TAMRA-PEG₆-N₃ (1.5 eq./eq. of BCN grafted on micelle) were introduced. In parallel, as negative control, the same reaction was performed between the unmodified micelle and TAMRA-PEG₆-N₃. The solutions were purified by gel filtration (sephadex G25, PD-10 column) and fluorescence spectra of each fraction were recorded (parameters: λ_{em} = 550 nm, λ_{ex} = 560-800 nm).

Antibody-micelle conjugated:

To a 1 mg/mL solution of T-N₃ (synthesis described below), purified BCN-M (45 eq. or 90 eq.) was added. pH of the solution was adjusted with PBS (100 mM) until 7.4. The success of the reaction was controlled by SDS-PAGE.

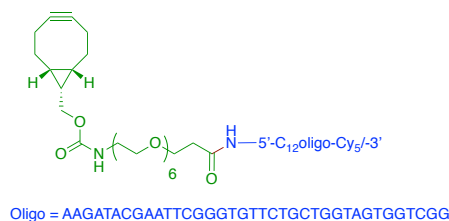
V.2 Preparation of immuno-micelle *via* amine-thiol coupling

To a 5 mg/mL solution of micelle diluted two times with PBS (100 mM, pH=7.4), traut reagent (5 eq.) solubilized in water was added. In parallel, to 100 μ L of a 5 mg/mL trastuzumab solution, CBTF (5 eq.) diluted in DMSO was added. The mixtures were incubating à room temperature for 30 min. Then 50 μ L of activated micelles and 50 μ L of activated antibody were mixed and stirred overnight at room temperature. The solution was purified by BioSpin column (cutoff 30KDa) and the concentration measured by Nanodrop. The success of the reaction was controlled by SDS-PAGE.

V.3 Preparation of immuno-micelle *via* non-covalent interaction

V.3.1 Preparation of oligonucleotide-BCN (BCN-ON)

Protocol adapted from Dovgan et al. 2017 publication



Amino-modified oligonucleotides were purchased from IDT. In a 2 mL Eppendorf tube, amino-modified oligonucleotide (1 nmol/ μ L in water, 1 eq.), a solution of conjugation reagent BCN-PEG₆-PFP in DMSO (10 eq.) and NaHCO₃ (1M in water, 250 eq.) were introduced. The final volume was adjusted with DMSO to obtain a 1:1 water : DMSO ratio. The mixture was incubated at room temperature overnight under argon atmosphere.

Purification steps:

To remove conjugation reagent, BCN-ON was precipitated. To a solution of BCN-ON diluted three times with water, LiClO₄ (1M, excess) and acetone in order to have a 1:3 water/acetone ratio were added. After centrifugation at 14000 rpm for 5 min, the supernatant was removed. This step was reiterated 3 times. The remaining precipitate was dissolved in water and purified by HPLC on a Shimadzu system (pump: LC 20-AD, detector: SPD 20-A, autosampler: SIL 20-A) using a SunFire™ C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm column (Waters).

HPLC method : flow rate 1 mL/min, mobile phase A was triethylammonium acetate (TEAA) in water (50 mM), and mobile phase B was TEAA in acetonitrile (50 mM). The detection was done at 260 nm. Gradient: from 15 to 40% of mobile phase B from 0 to 30 min. After lyophilisation, the oligonucleotide conjugate BCN-ON was dissolved in water and concentration was measured by spectrophotometry.

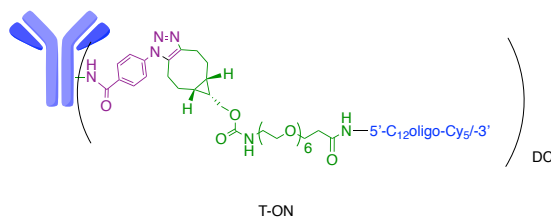
Control reactions:

To check the success of BCN coupling to the oligonucleotide, a click reaction was performed. In a vial, 1 nmole of BCN-ON and 1.2 nmol of TAMRA-PEG₆-N₃ were introduced. The final volume was adjusted with water to obtain 50 μ L as final volume. In parallel, as negative control, the same reaction was performed in absence of TAMRA-PEG₆-N₃. The mixtures

were incubated at room temperature overnight under argon atmosphere. The solutions were then purified by precipitation in LiClO_4 and injected in HPLC.

V.3.2 Preparation of antibody-oligonucleotide conjugate (T-ON)

Protocol adapted from Dovgan et al. 2017 publication



To a solution of trastuzumab (1 eq, 1 mg/mL, 90 μL in PBS 1x (pH 7.3)) was added DMSO (5 μL) and ABF (3 eq. in 2.5 μL of DMSO) at 25 $^\circ\text{C}$ and the reaction mixture was incubated at 25 $^\circ\text{C}$ for 18 h. The excess of reagents was then removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 Columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS 1/20x (pH 7.3) to give a solution of trastuzumab-azide (T-N_3), which was used in the functionalization step. To the solution of T-N_3 in PBS 1/20x was added BCN-ON (4.5 eq., 8.8 μL , 350 μM in H_2O) and the reaction mixture was incubated at 25 $^\circ\text{C}$ for 20 h. The excess of reagents was then removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 Columns equilibrated with PBS 1/20x (pH=7.3). The average yield over two steps was 65-80%.

To remove excess of BCN-ON, T-ON was purified by size-exclusion chromatography using AKTA Pure chromatography. Concentration of the ACs was performed using micro-concentrators (Vivaspin, 10, 30 or 50 kD MWCO, Sartorius, Gottingen, Germany). Concentration of antibody conjugates was determined by BCA assay (ThermoFisher Scientific).

V.3.3 Formulation of immuno-micelle (T-M)

Immuno-micelles were formulated by adding different amounts of micelle in antibody-oligonucleotide conjugated in HBG. The complex was then incubated at room temperature for at least 15 min.

VI. *In vitro* experiments

VI.1 Cell culture

The A549-luc cells that stably express the reporter gene luciferase GL3 ($1-2 \times 10^{10}$ RLU/mg protein) were established by transfecting human lung carcinoma A549 cells (CCL-185; ATCC) with pGL3-Luc plasmid (Clontech, Mountain View, CA, USA) using jetPEI™ as delivery system (Polyplus-Transfection, Illkirch, France) by Dr. Jean-Luc Coll. Cells were grown in RPMI 1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% FBS (Eurobio, Les Ulis, France), 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco-Invitrogen) and maintained under 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 selection (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Human cervical cancer cells (HeLa) and human breast cancer cells (MDA-MB-231 and SKBR3) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Eurobio), 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco-Invitrogen) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Cells were passaged using Trypsin when they reached 90% confluence.

VI.2 Luc-siRNA transfection

VI.2.1 In absence of serum

Twenty-four hours prior to transfection, 2.5×10^4 A549-luc cells were seeded per well in 24-well tissue culture plates. Complexes were formed between target or control siRNA (siLuc or siCTL respectively) and the cationic micelle by adding different amounts of surfactant on the siRNA pre-diluted in HBG. Samples with different N/P ratio were mixed and incubated one hour at room temperature to favor association between siRNA and the cationic micelles. 100 μL of the complexes were added onto the cells in absence of serum in 500 μL RPMI 1640 medium. After 4 h of incubation, 60 μL of fetal bovine serum (Eurobio Les Ulis, France) were added to obtain 10% serum concentration. For positive control, cells were transfected with 10 nM of siGL3 and siCTL vectorized with 2 μL of INTERFERin™ (Polyplus-Transfection, Illkirch, France) according to the supplier recommendations. All experiments were done in triplicate.

VI.2.1 In serum

The similar protocol as described before was used with the exception that the complexes were added onto cells in culture medium supplemented with 10% serum. No more serum was added later.

VI.3 Quantification of the luciferase gene silencing

Luciferase gene expression was determined 48 h after delivery with a Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France) according to manufacturer's instructions. The luminescence was quantified using 2 μ L of cell lysate with a Centro LB luminometer (Berthold, Thoiry, France). Protein concentration in cell lysate was measured by using a BCA assay kit (Interchim, Montluçon, France), according to manufacturer's instructions. After expressing the luciferase activity as relative light units integrated over 10 s per mg of cell protein (RLU/mg), the luciferase gene silencing was calculated relative to the luciferase activity of non-transfected A549-luc cells. Specific inhibitions can be calculated by dividing the silencing obtained with the Luc-siRNA by the knockdown measured with the control siRNA as described in following formula:

$$\text{Specific inhibition} = \left(1 - \frac{\text{siLuc expression}}{\text{siCTL expression}}\right) * 100 \%$$

VI.4 MTT cytotoxicity assay

The same following protocol was used for evaluating cytotoxicity induced from micelle, drug, drug encapsulated in micelle, siPLK1 transfection or immuno-micelles.

After 48h of reaction, 100 μ L of MTT reagent (1 mg/mL) was added and cells were incubated for 2 hours at 37°C. The blue precipitate formed was solubilized by 100 μ L DMSO after that the media was removed carefully. Cell viability was measured by quantifying the mitochondrial succinate dehydrogenase by spectrophotometry at 570 nm on a Multiskan FC (Thermo scientific).

VI.5 Transfection in the presence of bafilomycin A1

To determine the role of the histidine group in enhancing the escape of the siRNA from the endosomes, A549-luc cells were transfected with Hist-DPMs and treated with the vacuolar type H⁺-ATPases inhibitor, bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich) (BafA1, 175 nM final concentration in the culture medium).

Cells were seeded at a density of 2.5×10^4 cells cm⁻² (in 500 μ L of RPMI) in 24-well cell culture plates and incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. siRNA/Hist-DPMs complexes were prepared at various N/P molar ratio, as previously described. 1.5 μ L of BafA1 solution (40 μ M) was added to each well. After 30 min, the complexes were added.

The incubation period with BafA1 lasted for 3h in absence of serum, after which the medium was refreshed and replaced by complete medium. Luciferase gene expression was determined 48h after delivery as described in the quantification of the luciferase gene silencing protocol.

VI.6 siPLK-1 transfection

Cells preparation: Twenty-four hours prior to transfection, 7×10^3 HeLa cells were seeded per well in 96-well tissue culture plates.

Sample preparation: Complexes were formed between siPLK-1 or a control non-toxic siRNA (siCTL) and the cationic micelle (N/P = 5,6) by adding the micelles on different amount of siRNA pre-diluted in HBG to obtain final concentrations from 10 to 200 nM. Samples were mixed and incubated one hour at room temperature to favor association between siRNA and the cationic micelles.

20 μ L of the complexes were added onto the cells in absence of serum in 100 μ L DMEM medium. After 4 h of incubation, 10 μ L of fetal bovine serum (Eurobio Les Ulis, France) were added to obtain 10% serum concentration.

All experiments were done in triplicate, three times.

Cell viability was measured after 48h by quantifying the mitochondrial succinate dehydrogenase using an MTT assay (Invitrogen) as described in the MTT assay procedure.

For siPLK-1 transfection in serum: the similar protocol as described before was used with the exception that the complexes were added onto cells in culture medium supplemented with 10% serum. No more serum was added later.

VI.7 Co-delivery efficiency

Cells preparation: Twenty-four hours prior to transfection, 1×10^4 HeLa or MDA-MB-231 cells were seeded per well in 96-well tissue culture plates.

Samples preparation: Complexes were prepared with siPLK-1 or a control non-toxic siRNA (siCTL) and the cationic micelle (N/P = 5.6) by adding the micelles to different amounts of siRNA pre-diluted in HBG to obtain final concentrations of $\text{Micelle}_{\text{siRNA}}$ ranging between 10 and 200 nM. CPT or $^{\text{CPT}}\text{Micelle}$ (1/10 w/w ratio) were diluted in HBG in order to have final concentrations of CPT ranging between 0.04 to 10 μM . As a control, the same concentrations of micelle in absence of CPT were also tested. Finally, the $^{\text{CPT}}\text{Micelle}_{\text{siRNA}}$ formulation was generated by adding $^{\text{CPT}}\text{Micelle}$ (1/10 w/w ratio) to different amounts of siRNA, pre-diluted in HBG to obtain final concentrations ranging from 10 to 200 nM (and a N/P of 5.6).

Twenty microliters of each complex were then added onto the cells, in absence of serum, in 100 μL DMEM medium. After 4 h of incubation, 10 μL of fetal bovine serum (Eurobio Les Ulis, France) were added to obtain 10% serum final concentration. 10% DMSO were also added on three control wells to provide the blanks for absorbance readings representing total cell death. Cell viability was measured after 48h, by quantifying the mitochondrial succinate dehydrogenase, using an MTT assay (Invitrogen) as described below. All experiments were done at least 3 times using triplicates.

VI.8 Combinaison index

Combination drug analyses were performed with the free of charge CompuSyn software (available in the following address: <http://www.combosyn.com>).

Percentage of inhibition of the drug, the siRNA and the combination of the two therapeutic agents are modeling in the software in order to determine IC_{50} and combination index (CI).

If $\text{CI} < 1$, it means that there is a synergistic effect.

If $\text{CI} = 1$, it means that there is an additive effect.

If $\text{CI} > 1$, it means that there is an antagonist effect.

VI.9 Immuno-micelle system evaluation

Cells preparation: Twenty-four hours prior to the experiment, SKBR3 and MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in 96-well tissue culture plates.

Sample preparation for siRNA delivery:

First the antibody-conjugates (T-ON or R-ON) were incubated at room temperature with micelles at different concentrations determined according to the final intended siRNA concentration and N/Pg. After 15 min of incubation, different amounts of siPLK1 or siCTL were added to the previous formulation of immuno-micelles to obtain T-ON-M_{siRNA} or R-ON-M_{siRNA}. For samples containing only the siRNA/micelle complexes, ON was added to also obtain the same charge ratio than samples formulated with immuno-micelles.

Sample preparation for drug delivery:

Drug was first encapsulated into micelle as described in drug encapsulation protocol. Then antibody-conjugates (T-ON or R-ON) were added to form T-ON-^{CPT}M and R-ON-^{CPT}M. In each formulation, the same concentration of micelle and antibody were added.

Twenty microliters of each complex were then added onto the cells, in absence of serum, in 100 μ L DMEM medium. After 4 h of incubation, 10 μ L of fetal bovine serum (Eurobio Les Ulis, France) were added to obtain 10% serum final concentration. 10% DMSO were also added on three control wells to provide the blanks for absorbance readings representing total cell death. Cell viability was measured after 48h, by quantifying the mitochondrial succinate dehydrogenase, using an MTT assay (Invitrogen) as described below. All experiments were done at least 3 times using triplicate

VII. *In vivo* Experiments

Animals were maintained and treated in accordance with the guidelines established by animal care.

Tumor xenograft:

Tumor models were prepared by subcutaneous implanting cell lines (1×10^6 of MDA-MB-231) suspended in 100 μL of PBS into each flank of 8-week old female nude mice. Treatment began once tumors reached sizes of 100 mm^3 .

Treatment of tumors:

When the tumors reached a mean volume of 100 mm^3 , the mice were randomly separated into six groups:

- (i) Vehicle (Micelle 220 μg in 0.1 mL HBG), **n = 6**
- (ii) Free CPT (15 μg /mouse, diluted in 0.1 mL of 3% DMSO/HBG solution), **n = 5**
- (iii) Free siPLK1 (7 μg /mouse in 0.1 mL HBG), **n = 5**
- (iv) ^{CPT}Micelle (15 μg /mouse in 220 μg MPD-Hist in 0.1 mL HBG) , **n = 6**
- (v) Micelle_{siPLK1} (7 μg /mice with 220 μg of MPD-Hist in HBG), **n = 6**
- (vi) ^{CPT}Micelle_{siPLK1} (7 μg siPLK1, 15 μg CPT, 220 μg MPD-Hist in 0.1 mL HBG),

n = 6.

The mice received peritumoral injections 3 times a week for 4 weeks (total 12 injections, 100 μL per injection). Length and width of tumors were measured individually using a Vernier caliper. Tumor volumes were calculated using the following formula:

$$\text{Tumor volume} = \frac{\text{major diameter}}{2} * \text{minor diameter}^2$$

All along the treatment, weight of the mice was monitored once per week.

The mice were sacrificed 30 days after the first injection according to institutional guidelines. Urine and blood are collected while tumors were resected, weighted and fixed in a 4% formaldehyde solution. 24 hours after fixation, tumors were transferred in a PBS solution and stored at 4°C.

Blood and urine collections:

500 μL of blood was collected by cardiac puncture just prior to the sacrifice of mice under general anesthetic (isoflurane). Then, the samples are centrifuged at 2000 rpm during 5 min. Red blood cells were separated from the plasma and this last was stored at -20 °C. Urine was collected directly from the bladder and stored at -20°C.

The dosage of toxicity markers was performed by the ICS institute (Institut Clinique de la Souris).

Statistical analysis:

Statistical analyses were performed using Mann Whitney test (for sample $N < 30$) using GraphPad software (USA). P-values are given in the figure legends, and values of $P < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) were considered to be statistically significant. All data were presented as means \pm S.D .

Publications acceptées
et
en cours de soumission

pH-Responsive Nanometric Polydiacetylenic Micelles Allow for Efficient Intracellular siRNA Delivery

Manon Ripoll,[†] Patrick Neuberg,^{*,†} Antoine Kichler,[†] Nassera Tounsi,[§] Alain Wagner,[‡] and Jean-Serge Remy^{*,†}

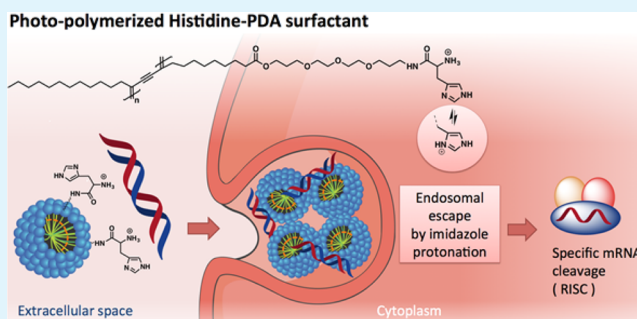
[†]Laboratory Vectors: Synthesis and Therapeutic Applications, and Labex Medalis, and [‡]Laboratory of Functional Chemo Systems, and Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch 67401, France

[§]Laboratory of Therapeutic Innovation, UMR7200 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch 67401, France

S Supporting Information

ABSTRACT: A novel generation of pH-responsive photopolymerized diacetylenic amphiphile (PDA) micelles with a diameter of 10 nm was designed and optimized for the intracellular delivery of siRNAs. Dialysis and photopolymerization of the micelles allowed a strong reduction of the cytotoxicity of the nanovector, while the hydrophilic histidine headgroup permitted enhancing the siRNA delivery potential by improving the endosomal escape via imidazole protonation. These PDA-micellar systems were fully characterized by DLS, TEM, and DOSY-NMR experiments. The resulting bioactive complexes of PDA-micelles with siRNA were shown to have an optimal size below 100 nm.

KEYWORDS: micelles, photopolymerization, siRNA, imidazole, proton sponge effect



Over the past few years, different types of nanoparticles like liposomes, stable nucleic acid lipid particles (SNALPs), micelles, dendrimers, and polymers such as polyethylenimine have been explored for the delivery of genes and/or siRNAs into cells.^{1–3} In particular, the delivery of siRNAs has revealed highly interesting results because of its great therapeutic potential in all pathologies in which down-regulation of a specific mRNA leads to a beneficial effect, paving the way for various clinical trials for the treatment of diseases such as cancers, viral infections and genetic disorders.^{4–8}

Among novel nanostructured materials, our group reported recently that UV-irradiated cationic polydiacetylenic micelles are efficient gene delivery vehicles.⁹ The small, 10 nm diameter PDA-micelles were obtained by self-assembly of surfactants composed of a photopolymerizable diacetylenic motif within a C₂₅-hydrophobic chain and a cationic polar headgroup. While efficient for DNA delivery, this first-generation vector, however, did not permit siRNA delivery. In the meantime, Doris' group has shown the strong potential of neutral polydiacetylene micelles as cargo for targeted drug delivery.^{10–13}

Because of their interesting properties and significant potential, we decided to push forward our development of PDA-micelles for siRNA delivery, which has to date remained uninvestigated. Our guideline to overcome the limitation of this first generation was to take advantage of the polymerized core of the PDA-micelles and design the hydrophilic headgroup of the diacetylenic surfactant in such a manner that it can improve the delivery and intracellular release of the siRNA.

When mixed with siRNA at the optimal ratio, the positively charged nanoparticles are taken up by the cells through an endocytosis-mediated process. However, efficient cell uptake is not sufficient since endosomal escape is also a crucial step for achieving gene silencing. Indeed, the siRNA has to be delivered intact into the cell cytoplasm in order to be able to incorporate into the RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs). To achieve the escape from the endosomes and avoid degradation, researchers have developed various strategies, among which is the use of chemical functions with favorable pK_a values such as imidazole, which induce the so-called “proton sponge” effect.^{14–16} Indeed, the membrane-bound ATPase proton pumps actively translocate protons into the endosomes. Buffering of the endosomes through compounds like PEI¹⁷ (polyethylenimine) or imidazole, leads to a massive proton accumulation concomitant with passive chloride influx. These events eventually cause osmotic swelling and subsequent endosome disruption (a phenomenon called the “proton sponge” effect by J.-P. Behr).^{18,19} On the basis of this knowledge, we wanted to translate this concept to the PDA-micellar delivery systems for siRNA delivery. Here we synthesized a cationic monomer molecule with a histidine linked to the trioxatridecane linker (Figure 1A). To demonstrate the role played by the histidine group for siRNA

Received: July 28, 2016

Accepted: November 2, 2016

Published: November 2, 2016



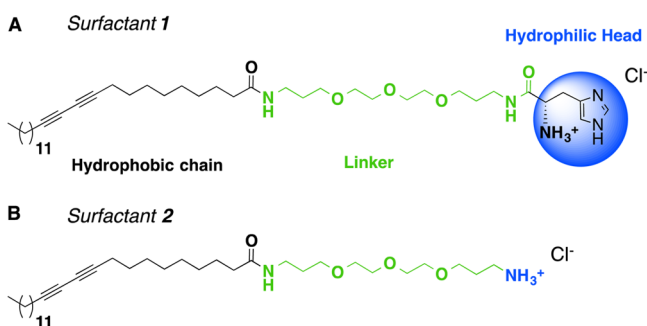


Figure 1. (A) Structure of surfactant 1 at neutral pH. (B) Structure of surfactant 2 at neutral pH.

delivery, we decided to also evaluate surfactant 2 (Figure 1B), an analogue of 1 bearing only a primary amine instead of a histidine group (see the Supporting Information for surfactant synthesis).

The nonpolymerized micelles (NPM) abbreviated Hist-NPMs and NH_2 -NPMs for surfactant 1 and 2 respectively were formulated under their chlorhydrate form. Then, they were polymerized under UV-irradiation at 254 nm in order to obtain the polymerized micelles (PM), abbreviated Hist-PMs and NH_2 -PMs, which permits reducing the cytotoxicity.²⁰ The polymerized Hist-PMs were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission Electron Microscopy (TEM) and UV-spectroscopy (Figure 2A, B; Figures S3 and S4). DLS and TEM showed that both Hist-NPMs and Hist-PMs are spherical objects of ~ 10 nm diameters, whatever the polymerization time (Table S1). We then evaluated the capacity of the micelles to complex siRNAs. To favor the formation of small particles, the complexes between the cationic histidine photopolymerized micelles and the siRNA were generated in

low salt conditions (HBG: Hepes Buffered Glucose). The complexation of siRNA was followed by gel retardation assay with a Tris-Acetate (TA) buffer (pH 7.5) as running buffer (Figure S14). Complete complexation of the nucleic acids took place at low N/P ratio (= 2) as expected, because at physiological pH, the primary amines of the histidine group are protonated (N/P: primary amine versus phosphate groups of siRNA). The size of the particles was measured by DLS and TEM, and the results showed that the siRNA-micelles complexes remained homogeneous and smaller than 100 nm for N/P ratios above 10 (Figure 2C, D and Figure S6).

The intracellular uptake of the complexes was then investigated using Cy5-labeled siRNA. Fluorescence microscopy showed that the Cy5-siRNA was able to penetrate into the cells when complexed to Hist-PMs (Figure S20). We next evaluated how the histidine residue impacts the biological activity. Surfactants 1 and 2 were compared in the same experiment using the same formulation. Transfection assays were performed on cells that stably expressed the luciferase gene (A549-luc cells) using low concentrations of siRNA (10 nM) targeting the luciferase mRNA (Luc-siRNA) (see SI). After the first series of biological assays, only the micelles polymerized for 4 h were further studied, because this polymerization time resulted in the best balance between cytotoxicity and efficiency (Figure S17). From luciferase expression, specific inhibitions were calculated by measuring the silencing obtained with the Luc-siRNA compared to the control siRNA. The results obtained with the micelles polymerized for 4 h show that the nature of the headgroup plays a crucial role in siRNA delivery. The results indicate that almost 80% of specific inhibition was reached with 25 μg micelles/mL (N/P = 83.3) of compound 1, whereas the NH_2 -system 2 only poorly performed in these experiments with a maximum specific inhibition of 25% (Figure S18, bars).

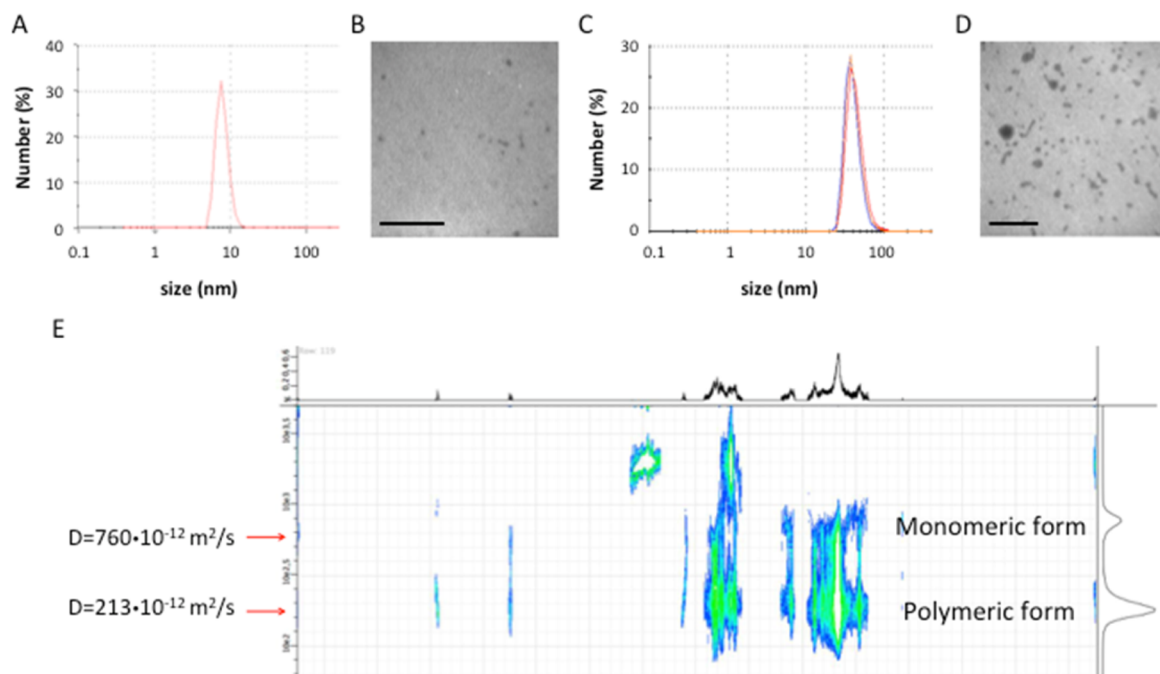


Figure 2. (A) Size distribution by number of the 4h-Hist-PMs (PdI = 0.287). (B) TEM image of 4h-Hist-PMs in Hepes buffer (10 nM, pH 7.5). Scale bar: 500 nm. (C) Size distribution by number of the complexes formed in low salt condition (HBG) between siRNA and Hist-PMs (70 ng/ μL siRNA, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hist-DPMs) (PdI = 0.259). (D) TEM image of the siRNA-4h-Hist-DPMs in Hepes buffer (10 nM, pH 7.5). Scale bar: 500 nm. (E) DOSY-NMR analysis of the 4h-Hist-PMs after evaporation under vacuum and suspension in deuterated methanol.

However, despite extended UV irradiation times of the photopolymerized micelles, a moderate toxicity of Hist-PMs on cells still remained (Figure S18, triangles); it is assumed this is due to the remaining monomers.²⁰ This issue has been solved by an optimized procedure consisting of dialysis steps as described below.

To gain further insights into the molecular form of the photopolymerized micelles, we chose to analyze the surfactant assembly by DOSY-NMR experiments (Figure 2E). The Hist-NPMs were evaporated to dryness then dissociated into molecular form in deuterated methanol. A control monomer solution was dissolved in deuterated methanol and showed discrete diffusion constants in coherence with dissociated molecules (Figure S12). The DOSY-NMR experiments done on the Hist-NPMs also showed that all the micelles were able to dissociate into the monomers reflecting an absence of covalent linkage formation in this nonpolymerized form between the dyne motifs. The same protocol and analysis applied to the photopolymerized Hist-PMs revealed two separate populations, one corresponding to the monomer with diffusion constant equal to $D = 760 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ and the other with a lower diffusion constant ($D = 213 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) corresponding to oligomer structures. Thus, the DOSY-NMR experiments clearly showed that even after 4 h of polymerization, a small population of monomers—estimated to be around 25%—still remained.

This result concerning the remaining monomer was also confirmed by the critical micelle concentrations (CMC) of nonpolymerized Hist-NPMs and polymerized Hist-PMs measured by the Pyrene inclusion method. Hist-NPMs showed CMC of 0.1 mM, whereas Hist-PMs showed higher CMC values (0.7 mM) (Figures S7 and S8). The higher CMC of the Hist-PMs can be explained by the fact that the polymerized lipid does not contribute to efficient pyrene inclusion. Thus, the measured CMC is the minimum concentration of total lipid where the remaining monomer starts interacting with the hydrophobic pyrene probe. As the concentration of monomer in the polymerized systems is lower as compared to Hist-NPMs, the calculated CMC appears higher, proving indirectly a partial conversion of this monomer surfactant.¹⁶

To further reduce toxicity, we adopted a complementary strategy; the micelles were extensively dialyzed in order to get rid of the remaining monomer (see the Supporting Information). The real concentration of the Dialyzed-Polymerized Micelles abbreviated Hist-DPMs measured by primary amine quantification using the TNBS method was estimated to be 5 mM by taking the 7 mM nondialyzed Hist-PMs as a reference (Figure S9). To validate the hypothesis that the remaining monomers accounted for the toxicity, cytotoxicity assays were performed on A549-luc cells. Cell viability was quantified using an MTT assay (see the Supporting Information). The results on the A549-Luc showed that nonpolymerized micelles ($IC_{50} = 24 \mu\text{M}$) were almost three times more toxic than the polymerized ones ($IC_{50} = 63 \mu\text{M}$) (Figure 3), which confirmed the interest of the polymerization. A similar reduced toxicity of the polymerized micelles was also observed on human cervical cancer cells (HeLa; Figure S19).

Then, the dialyzed samples were compared in toxicity tests as well as in siRNA transfections assays. The dialyzed 4 h polymerized micelles (Hist-DPMs) presented the lowest toxicity ($IC_{50} = 110 \mu\text{M}$), as compared to the nondialyzed one ($IC_{50} = 63 \mu\text{M}$). In order to gain physical evidence of the loss of monomer, we again performed DOSY-NMR experi-

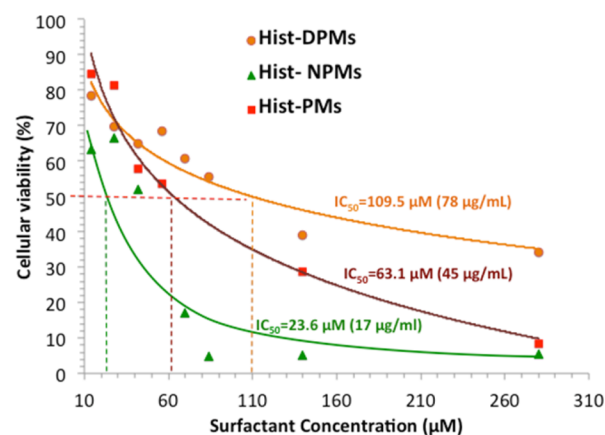


Figure 3. MTT cytotoxicity assay performed 48h after surfactant addition on A549-Luc cells. Cellular viability is given for nonpolymerized micelles (hist-NPMs), 4 h polymerized micelles (hist-PMs), and dialyzed and 4 h polymerized micelles (Hist-DPMs).

ments on the dialyzed sample (Figure S13). Once again, two separated populations were observed. One was characteristic of the monomer with $724 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ as a diffusion constant, and the other one corresponded to the polymeric form with $185 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ as a diffusion constant. Areas under the curves showed that only 10% of monomers remained, which is in accordance with the reduced toxicity of the PDA-micelles.

The siRNA delivery potential of the Hist-DPMs was then evaluated on A549-luc cells to study whether the reduced amount of remaining monomer impacts the biological activity. The inhibition efficiency was calculated relative to the nontransfected A549-luc cells and compared to a control siRNA (siCTL). The efficiency of the optimized nanovector obtained by dialysis is shown in Figure 4A. Up to 80% of inhibition of the luciferase gene expression was obtained with $12 \mu\text{g/mL}$ ($N/P = 39$) of Hist-DPMs. Interestingly, in comparison to the nondialyzed system, the dialyzed sample allowed reaching the same maximal specific inhibition while using less surfactant and while lowering cytotoxicity. It is worth noting that, in good agreement with the results obtained with peptidic¹⁶ and polymeric¹⁷ transfection agents, higher N/P ratios are needed for efficient PDA-mediated siRNA delivery as compared to the N/P ratio which allows total complexation of siRNA in gel mobility shift assays. One explanation of the need for a higher N/P for transfection is that the size of the siRNA-Hist-PMs complexes varies with the N/P values (Figure S6). In fact, higher N/P values ensure small sizes of the complexes and allow for efficient stabilization of the complexes in the presence of competing anionic molecules, such as serum proteins and sulfated polysaccharides (Figure S15 and S16).

To evidence that our compounds presented a favorable pK_a , the titration profiles of the monomer and the Hist-DPMs were determined (Figure 4B and Figures S10 and S11). The results show the monomers to have important buffering abilities in the pH range that occur in the endosomal cellular compartments (from 4.0 to 6.0), which is essential to efficiently protect siRNA during delivery. Half the equivalent of NaOH per amine is needed to raise the pH of the solution from 4.0 to 6.0. By comparison, the potentiometric curve of the Hist-DPMs indicates that the polymerization permitted increasing the buffering abilities of the system 2-fold in the pH range of interest. This increased capacity is due to the fact that when micelles are polymerized, a fully condensed conformation is

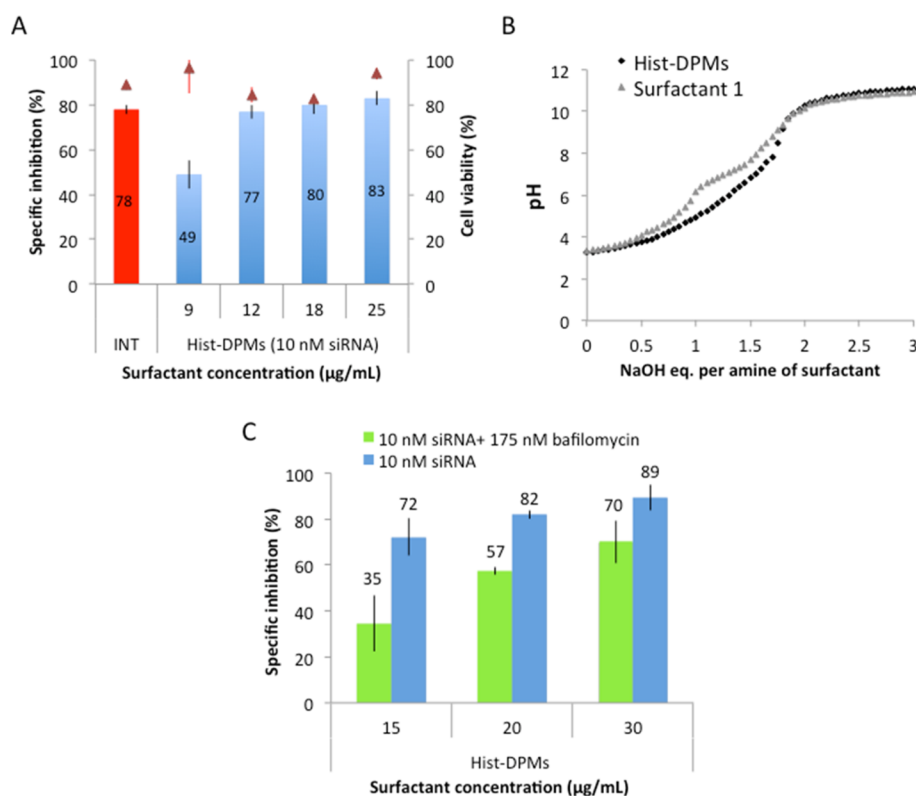


Figure 4. (A) siRNA delivery experiments performed on A549-luc cells using various concentrations of surfactant **1** with 10 nM siRNA. Specific inhibition compared to A549-luc cells transfected with negative control siRNA after 48h of transfection are given for commercial positive control (INTERFERin) and Hist-DPMs in 70% ethanol resuspended in water (bars). Cell viability was measured by total protein assay and represented here compared to non transfected cells (triangles). (B) Potentiometric titration profiles of surfactant **1** (gray triangles) and of the Hist-DPMs (dark diamonds) showing extended buffering from pH 6 to pH 4. (C) Effect of bafilomycin A1 on Hist-DPMs transfection activity on A549-luc cells after 48 h of transfection. Specific inhibition of luciferase expression as compared to siRNA control is given for Hist-DPMs in the presence of 10 nM siRNA \pm 175 nM bafilomycin A1.

adopted. Hence, primary amines are more closely packed resulting in an increase in the mutual electrostatic repulsion, leading to a decrease in their pK_a values.

This experiment permits concluding that surfactant **1** has a favorable pK_a value that can even be improved by polymerization.

Finally, to gain insight into the biological mechanism of siRNA release in the cytoplasm, we evaluated the effect of bafilomycin A1 on the transfection activity of the Hist-DPMs. Bafilomycin is an antibiotic that selectively inhibits vacuolar type H^+ ATPase (V-ATPase). These V-ATPases cause acidification of the internal space of several organelles of the vacuolar system including endosomal compartments.^{21,22} The assays were realized on A549-luc cells by using 175 nM of bafilomycin A1 and 10 nM siRNA. As shown on Figure 4C, we observed a significantly lower specific inhibition when the transfection was realized in the presence of bafilomycin A1. These experiments evidence that acidification of the endosomes plays an important role in the mechanism of action of histidine-containing PDAs. Protonation of the imidazole group probably allows a “proton sponge”-like effect that ultimately results in an enhanced cytosolic delivery of siRNA.^{14,16,23} It is worth noting that, in the case of polymers with high buffering capacities such as fractured dendrimers and polyethylenimines (two compounds for which a proton sponge mechanism is widely accepted¹⁸), an increase of the polymer volume has been observed with decreasing pH due to electrostatic repulsion between protonated amines.²⁴ Here we asked whether

endosomal acidification could also lead to a swelling of the PDA/siRNA complexes, entailing endosomal membrane destabilization. The results show that, at neutral pH (7.4), complexes have a diameter of 60 nm. When decreasing the pH up to one unit by acid addition, the size of the siRNA-Hist-PM increases 2-fold (from 60 to 110 nm), which can be explained by increased protonation of the histidine groups leading to charge repulsion (Figure S21).

In summary, a new generation of photopolymerized micelles based on a diacetylene surfactant was synthesized and optimized for intracellular siRNA delivery. PDA-micelles have previously been used for drug or gene transfection, but not for siRNA delivery. Here, we show that by fine-tuning the headgroup properties, the PDA-micelles system becomes a promising nanovector for siRNA delivery with more than 80% of specific inhibition in reporter gene assays. In particular, the use of the histidine group as a hydrophilic polar head permits drastically improving the specificity it is assumed by improving the siRNA release into the cytoplasm, through the “proton sponge” effect and a swelling of the complexes in the endosomal compartment following cellular uptake. Whereas polymerization already permitted reducing the toxicity and stabilizing the system by cross-linking, dialysis of the micelles allowed for a further reduction the cytotoxicity while preserving excellent siRNA delivery potential. Finally, the nanometric size range of these siRNA-nanoobjects opens up interesting prospects for in vivo studies in the field of cancer research, because small particles (<100 nm) are reported to better diffuse

through blood vessels and reach deeper into the tumor tissues.²⁵

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acami.6b09365.

Experimental section, surfactant characterizations, UV spectra, DLS figures, CMC curves, DOSY-NMR spectra, gel retardation assay, siRNA transfection results, and fluorescence microscopy images (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: remy@unistra.fr.

*E-mail: neuberg@unistra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Labex Medalis and by the FRM (fondation pour la recherche médicale). M.R. received financial support from MESR (Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche). The authors thank Marc Nothisen from the laboratory V-SAT, Vectors–Synthesis and Therapeutic Applications of the faculty of pharmacy for providing the A549-luc cells and Eberova Jitka from the laboratory of functional Chemo Systems of the faculty of pharmacy for the HeLa cells. We also thank the chemical analysis service platform of the faculty of pharmacy of Illkirch (France) and Bruno Vincent (chemical analysis service platform at the university of Strasbourg) for DOSY-NMR experiments.

■ ABBREVIATIONS

PDA, photopolymerized diacetylenic amphiphile
 HBG, HEPES buffered glucose
 DLS, dynamic light scattering
 TEM, transmission electron microscopy
 DOSY, diffusion-ordered spectroscopy
 siRNA, small interfering RNA
 CMC, critical micelle concentration

■ REFERENCES

- (1) Kanasty, R.; Dorkin, J. R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 967–977.
- (2) Gomes-da-Silva, L. C.; Fonseca, N. A.; Moura, V.; Pedroso de Lima, M. C.; Simões, S.; Moreira, J. N. Lipid-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1163–1171.
- (3) Wagner, E. Chapter Eight - Polymers for Nucleic Acid Transfer—An Overview. In *Nonviral Vectors for Gene Therapy Lipid- and Polymer-Based Gene Transfer*; Leaf Huang, D. L., Wagner, E., Eds.; Advances in Genetics; Academic Press: Cambridge, MA, 2014; Vol. 88, pp 231–261.
- (4) Castanotto, D.; Rossi, J. J. The Promises and Pitfalls of RNA-Interference-Based Therapeutics. *Nature* **2009**, *457* (7228), 426–433.
- (5) Trochet, D.; Prudhon, B.; Vassilopoulos, S.; Bitoun, M. Therapy for Dominant Inherited Diseases by Allele-Specific RNA Interference: Successes and Pitfalls. *Curr. Gene Ther.* **2015**, *15* (5), 503–510.
- (6) Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q.; Storm, G.; Molema, G.; Lu, P. Y.; Scaria, P. V.; Woodle, M. C. Cancer siRNA

Therapy by Tumor Selective Delivery with Ligand-Targeted Sterically Stabilized Nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (19), e149.

(7) Bartlett, D. W.; Su, H.; Hildebrandt, I. J.; Weber, W. A.; Davis, M. E. Impact of Tumor-Specific Targeting on the Biodistribution and Efficacy of siRNA Nanoparticles Measured by Multimodality in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (39), 15549–15554.

(8) Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. Preclinical and Clinical Development of siRNA-Based Therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *87*, 108–119.

(9) Morin, E.; Nothisen, M.; Wagner, A.; Remy, J.-S. Cationic Polydiacetylene Micelles for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (10), 1916–1923.

(10) Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. Tumor-Targeted Polydiacetylene Micelles for In Vivo Imaging and Drug Delivery. *Small* **2011**, *7* (19), 2786–2792.

(11) Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. Drug Delivery and Imaging with Polydiacetylene Micelles. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (2), 400–408.

(12) Gravel, E.; Thézé, B.; Jacques, I.; Anilkumar, P.; Gombert, K.; Ducongé, F.; Doris, E. Cellular Uptake and Trafficking of Polydiacetylene Micelles. *Nanoscale* **2013**, *5* (5), 1955–1960.

(13) Ogier, J.; Arnauld, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J.-M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E. Enhanced Drug Loading in Polymerized Micellar Cargo. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (17), 3902–3907.

(14) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A. Chemical Vectors for Gene Delivery: A Current Review on Polymers, Peptides and Lipids Containing Histidine or Imidazole as Nucleic Acids Carriers. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 166–178.

(15) Gonçalves, C.; Berchel, M.; Gosselin, M.-P.; Malard, V.; Cheradame, H.; Jaffrès, P.-A.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Lipopolyplexes Comprising Imidazole/Imidazolium Lipophosphoramidate, Histidinylated Polyethyleneimine and siRNA as Efficient Formulation for siRNA Transfection. *Int. J. Pharm.* **2014**, *460* (1–2), 264–272.

(16) Langlet-Bertin, B.; Leborgne, C.; Scherman, D.; Bechinger, B.; Mason, A. J.; Kichler, A. Design and Evaluation of Histidine-Rich Amphipathic Peptides for siRNA Delivery. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (7), 1426–1436.

(17) Zintchenko, A.; Philipp, A.; Dehshahri, A.; Wagner, E. Simple Modifications of Branched PEI Lead to Highly Efficient siRNA Carriers with Low Toxicity. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (7), 1448–1455.

(18) Neuberg, P.; Kichler, A. Recent Developments in Nucleic Acid Delivery with Polyethylenimines. *Adv. Genet.* **2014**, *88*, 263–288.

(19) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (16), 7297–7301.

(20) Neuberg, P.; Perino, A.; Morin-Picardat, E.; Anton, N.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S.; Remy, J.-S.; Wagner, A. Photopolymerized Micelles of Diacetylene Amphiphile: Physical Characterization and Cell Delivery Properties. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (58), 11595–11598.

(21) Yoshimori, T.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y.; Futai, M.; Tashiro, Y. Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H(+)-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (26), 17707–17712.

(22) Huss, M.; Vitavska, O.; Albertmelcher, A.; Bockelmann, S.; Nardmann, C.; Tabke, K.; Tiburcy, F.; Wiczorek, H. Vacuolar H⁺-ATPases: Intra- and Intermolecular Interactions. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90* (9), 688–695.

(23) Lächelt, U.; Kos, P.; Mickler, F. M.; Herrmann, A.; Salcher, E. E.; Rödl, W.; Badgular, N.; Bräuchle, C.; Wagner, E. Fine-Tuning of Proton Sponges by Precise Diaminoethanes and Histidines in pDNA Polyplexes. *Nanomedicine* **2014**, *10* (1), 35–44.

(24) Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C. In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7* (6), 703–714.

(25) Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **2009**, *9* (5), 1909–1915.

Cationic photopolymerized diacetylenic micelles for siRNA delivery

M. Ripoll, P. Neuberg, J.-S. Remy^{*}, and A. Kichler^{*}

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives UMR7199 CNRS -
Université de Strasbourg, LabEx Medalis, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France.

* Corresponding authors: kichler@unistra.fr; remy@unistra.fr

Running Head: siRNA delivery with cationic micelles

Abstract

Polydiacetylenic surfactants (PDA) have recently gained interest as stabilized monodisperse systems showing potential for the delivery of hydrophobic drugs as well as of larger biomolecules such as nucleic acids. In a first time, we optimized this family of photopolymerized diacetylenic surfactants for the transfection of cells through efficient condensation of plasmid DNA. More recently, modification of the hydrophilic part of the surfactants with pH sensitive histidine groups allowed for efficient delivery of siRNA giving specific gene silencing through RNA interference. Here, we describe the detailed experimental procedure for the preparation of these photopolymerized PDA micelles and we provide physicochemical characterization of these nanomaterials by DLS, TEM, and DOSY-NMR.

Key words: RNA interference, siRNA, non viral delivery system, cationic micelles, endosomal release, histidine residue, photopolymerization, diacetylenic micelles

1. Introduction

Gene therapy is one of the major biomedical breakthroughs of the last decades and of great promise for an increasing number of patients affected by genetic or acquired diseases. Delivery of a "medicine" based on nucleic acids into cells requires the use of carriers (vectors), which will allow the therapeutic agent to cross various biological barriers and reach the target cells where it will be processed. Vectors for nucleic acids are either viral or synthetic (non viral vectors). Non viral vectors such as cationic lipids and polymers generally present interesting *in vitro* activities but remain less efficient *in vivo* as compared to the most efficient viral vectors. Nevertheless, synthetic vectors continue to be the focus of intense research efforts in order to improve their efficiency.

To increase the transfection efficiency of non viral vectors, it is for example important to have a better control of the size of the complexes. While large aggregates have the propensity to sediment in cell culture experiments onto the cell layer improving particle internalization through close contact with the cell membranes, they are not suited for *in vivo* delivery. What stands out as an advantage for *in vitro* experiments is considered as a drawback for most *in vivo* applications. Indeed, large particles (> 100 nm) are unable to diffuse through tissues and, in particular, through the walls of blood vessels.

Detergents forming micellar systems are mostly nanostructured and monodisperse systems. The spherical form of the micelle is given by the packing characteristics and polar head repulsions of the charged detergent molecules. Moreover some cationic micelle forming detergents such as CTAP (cetyl trimethylammonium bromide) are able to interact with DNA by electrostatic interaction with the negatively charged phosphate groups. Cooperative hydrophobic assembly of the lipidic chains, is leading to local micellar structures which will condense DNA molecules efficiently.¹ Nevertheless in biological assays rapid diffusion of the detergent molecules getting trapped in the biological membranes leads to the opening of the micelle-like domains and release of the DNA cargo molecules before their internalization.²

Monodisperse spherical particles have also been obtained by dimerizable surfactant molecules containing cysteinyl groups together with a cationic guanidine group (guanidinocysteine-N-decylamide)³ or an ornithyl group (ornithyl-cysteinyl-tetradecylamide)⁴. These molecules, with their elegant concept of DNA compaction, proved relatively efficient for DNA transfection *in vitro*.⁵ However, no *in vivo* experiments were published that could demonstrate the functionality of these structures in a living organism.

In order to improve the stability of small sized delivery vectors we describe here a new system that shares common features with cationic detergent molecules and cationic polymers bridging the gap between “destructured” polymers and “organized” labile micelles. Indeed, we have explored delivery systems where the vectors are based on auto-organized detergent type molecules that are polymerized inside their lipidic core. Diacetylenic surfactants auto-organize into micelles that can be photopolymerized by strong UV irradiation, so that their lipidic chains become covalently interconnected (Figure 1). These crosslinked systems gain new biological properties and allow to fine tune their interaction with biological membranes, which present one of the crucial steps in the transfection process.

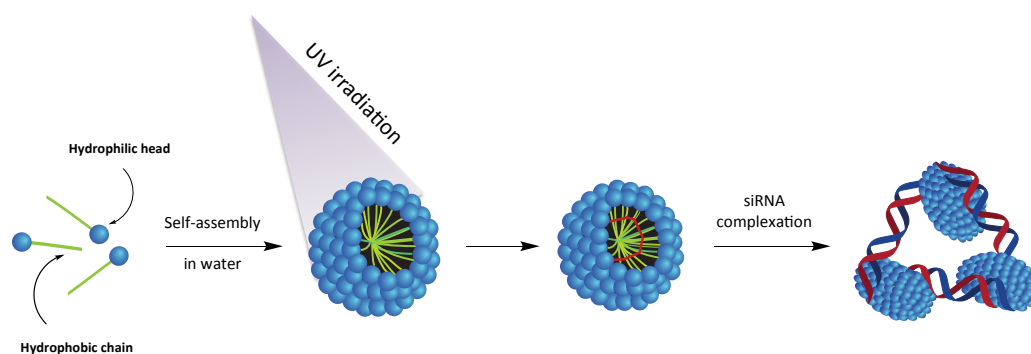


Fig. 1. Illustration of the step-wise assembly of the micelles/siRNA complexes.

Prior work by our group has allowed to prove that such polydiacetylenic systems (PDA-micelles) can be used for DNA delivery. Their delivery potential compared favourably with classic cationic amphiphilic molecules.⁶ More recent research by our group showed that fine tuning of the polar headgroups of diacetylenic surfactants allows to create photopolymerized systems which can interact with biological membranes, and release model hydrophobic fluorescent compounds into the cytoplasm.⁷ In 2016 we proved that the use as hydrophilic headgroup of pH sensitive groups such as imidazole groups from histidine residues could promote siRNA delivery, whose site of action is located in the cytoplasm leading to specific RNA interference.⁸ We evidenced that the release of siRNA is coupled with the ATPase proton pumps located in the endosomal compartments. The efficient release after endocytosis proceed through the pH buffering capacity of the delivery system bearing imidazole groups that become protonated, counteracting this way the acidification steps of endosomal maturation (Figure 2). The H⁺ buffering capacity at the pH values of early endosomes is indeed crucial for avoiding degradation of the siRNA molecules prior to cytoplasmic release.

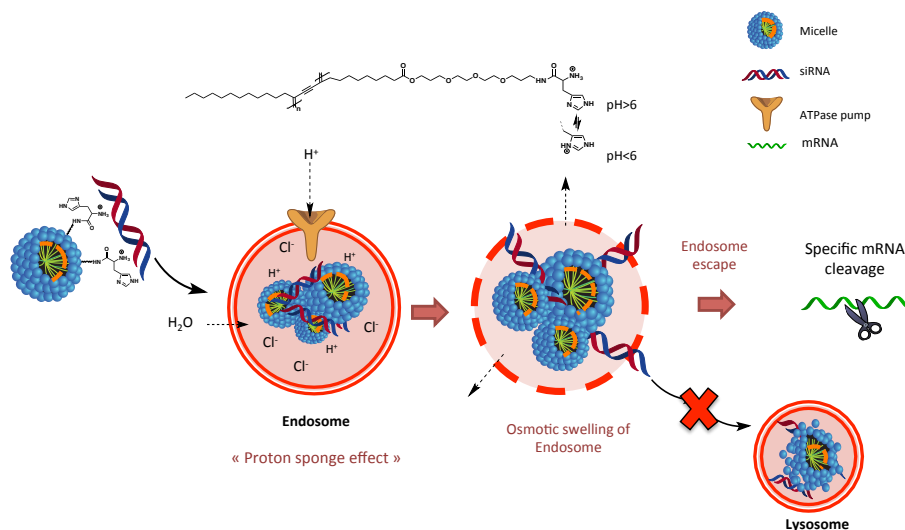


Fig. 2. Mechanism of endosomal escape mediated by histidine-based micelles.

These findings corroborate the often cited “proton sponge” hypothesis, which has been termed for the delivery mechanism of one of the most efficient DNA delivering polymers, namely polyethylenimine (linear and branched PEIs).^{9–11}

Meanwhile PDA-based micellar systems tend to become more and more promising systems for the delivery of all kind of drugs in *in vivo* and preclinical applications, and have been explored by different groups.^{12–15} Polydiacetylene (PDA) micelles decorated with a targeting peptide were able to encapsulate the anticancer drug camptothecin (CPT). These CPT-PDA micelles could kill ovarian cancer after internalization and they penetrated efficiently into a tumour.¹⁵

Also, an elegant strategy has been developed to covalently attach the cytotoxic peptide magainin II (MGN-II) to the surface of PDA micelles. These well-defined PDA micelles had high cytotoxicity in cancer cell lines, and were able to reduce the tumour size in mice.¹⁶ Lastly, PDA-micelles with “stealth” zwitterionic surface coating were tested in a murine xenograft model of breast cancer. The micelles were taken up at the margins of the tumour, and allowed to delineate its volume with the aim to aid surgery.¹⁴ Notably, it is of crucial importance to define reproducible formulation methods of these nanosized PDA micellar systems. As even small variations in the formation of these nanoparticles can entail large variations in the biological activity, it is important to propose a detailed experimental procedure of their synthesis, formulation and characterization. Here, we provide guidelines for the efficient formation of our histidine-based PDA-micellar systems.

2. Materials

2.1 Synthesis and characterization of the surfactant

2.1.1 Chemicals

1. Dichloromethane (DCM), tetrahydrofuran, methanol and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich, France (analytical grade).
2. 10,12-pentacosediyonic acid was purchased from Sigma-Aldrich, stored at -20°C and protected from light to prevent photopolymerization.
3. N-hydroxysuccinimide, abbreviated NHS, and 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine were purchased from Sigma-Aldrich.
4. 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) was purchased from Sigma-Aldrich and stored at -20°C.
5. N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich and stored at room temperature.
6. *N*α-(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine was purchased from Sigma-Aldrich and stored at +4°C.

2.1.2 Chromatographic methods

1. Progress of the reaction was monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) using 60F-254 silica gel plates purchased from Merck.
2. Visualization was achieved under 254 nm UV light, as well as by dipping of the TLC plates in a solution of acidic vanillin reagent (15 g vanillin in 250 mL ethanol + 2.5 mL conc. sulfuric acid) or in ninhydrin solution (1.5 g ninhydrin in 100 mL ethanol + 3 mL conc. acetic acid.) followed by heating with a heat gun.
3. Purifications by column chromatography were performed using silica gel 60 from Merck (0.063-0.2 mm; 70-230 mesh ASTM).

2.1.3 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on the following spectrometer: Bruker Advance 400 (NMR ¹H: 400 MHz and NMR ¹³C: 75 MHz). Recorded chemical shifts values were reported in parts per million (δ) and calibrated using residual signals from

partially protonated solvents (CHCl_3 : ^1H 7.26 ppm; ^{13}C 77.16 ppm or MeOH ^1H 3.31 ppm; ^{13}C : 49.0 ppm). Data were represented as follows, chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet and m = multiplet), coupling constants (J in Hz), integration and attribution. NMR spectra were analyzed using the commercial software NMRnotebook (NMRtech).

2.1.4 High-Resolution Mass Spectra

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and Low-resolution mass spectra (LCMS) were realized using an Agilent MSD 1200 SL (EPI/APCI) with an Agilent HPLC 1200 SL.

2.2 Synthesis and characterization of the micelles

2.2.1 Formulation

1. Sonication steps were performed using an ultrasonic bath sonicator (Fisher Scientific FB15047).
2. Polymerization was performed in 1 mL quartz cuvettes (Hellma) using a Cross-Linker Bio-Link 254 (Fisher Bioblock).
3. Dialysis cassettes (2,000 MWCO, 0.5-3.0 ml capacity) were obtained from Thermo Scientific.

2.2.2 Critical Micelle Concentration (CMC)

1. Fluorescence was quantified on a RF-5301 PC spectrofluorophotometer (Shimadzu).
2. DMSO and pyrene were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2.3 DOSY-NMR experiments

1D- ^1H and 2D-DOSY experiments were carried out at 300 K on a 600 MHz Bruker Avance III NMR spectrometer with 5 mm DOTY probe delivering up to 500 G/cm gradients. The DOSY spectra are obtained by applying an Inverse Laplace Transform (ILT) along the diffusion axis, using the commercial software NMRnotebook. The measured diffusion

coefficients were calculated from the Stokes Einstein relation for the diffusion of spherical particles through a liquid:

$$D = \frac{k\beta T}{6\mu\eta r(h)}$$

The percentage of covalently cross-linked surfactants versus monomer surfactant molecules were calculated from the peak integration from the 2D-plot.

2.3 Characterization of the micelles/siRNA complexes

2.3.1 Gel mobility shift assay

1. Agarose (ultrapure agarose from Invitrogen).
2. Tris-acetate 10X for 1 L solution: Tris-Base (48.4 g, 400 mM), acetic acid (about 13 mL, concentrated solution) until pH=7.5; diluted prior to electrophoresis to 40 mM.
3. Loading buffer: 30% glycerol in Tris-acetate (40 mM) pH=7.5.
4. SYBRSafe DNA gel stain (Invitrogen).
5. Electrophoresis unit.

2.3.2 Dynamic Light Scattering

1. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed on a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments) since it has the ability to measure molecular systems, from some hundreds of Daltons to micrometer size aggregates.
2. Disposable cuvettes: UV-Cuvette micro (12.5*12.5*45 mm, 70 μ L, Brand).
3. Suspension of 60 nm latex nanospheres (Duke Scientific) for calibration of the DLS instrument.

2.4 *In vitro* evaluation

2.4.1 Cell culture

1. The A549-luc cells that stably express the reporter gene luciferase GL3 ($1-2 \times 10^{10}$ RLU/mg protein) were established by transfecting human lung carcinoma A549 cells (CCL-185; ATCC) with pGL3-Luc plasmid (Clontech) using jetPEI™ as delivery system (Polyplus-Transfection).
2. RPMI 1640 medium and foetal bovine serum (FBS) were purchased from Eurobio.

3. Penicillin-streptomycin was bought from Invitrogen and the antibiotic G418 was obtained from Promega.
4. 24-well culture plates (from Corning).

2.4.2 siRNA transfection

1. HBG: Hepes 10 mM (119.5 mg/50 mL), Hepes-Na 10 mM (130.2 mg/50 mL), 5% glucose (2.5 g/50 mL), pH = 7.5
2. siRNA were synthesized by Eurogentec, provided in annealed form and HPLC purified.

Sequences are as follows with: **TT** (DNA bases)

Luciferase targeting siRNA (siLuc):

G13-ssSIRNA: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A **TT**-3' (sens strand)

G13-asSIRNA: 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG **TT**-3' (antisens strand)

Control siRNA (siCTL):

Ctl-ssSIRNA: 5' -CGU ACG CGG AAU ACU UCG **ATT**-3' (sens strand)

Ctl-asSIRNA: 5'-U CGA AGU AUU CCG CGU ACG **TT**-3' (antisens strand)

3. The transfection reagent INTERFERin™ Polyplus-Transfection was bought from Ozyme, France.

2.4.3 Luciferase assay

1. Luciferase kit from Promega.
2. Centro LB Luminometer (from Berthold).
3. White 96-well plates (Costar).

2.4.4 Protein assay

1. BCA assay kit from Interchim.
2. 3.5 mL tubes (PS, Ø 11.8) from Gosselin.
3. Semi-micro cuvette for spectrophotometer in crystal PS from Ratiolab.
4. Absorption spectra were recorded using Shimadzu UV-1800UV/visible spectrophotometer (mode: simple reads).

2.4.5 Cell viability assay

1. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Invitrogen), 1 mg/mL in serum-free culture media.
2. 96-Well culture plates (from Corning).
3. Quantification was done by spectrophotometry on a Multiskan FC plate reader (Thermo Fisher).

3. Methods

3.1 Synthesis of surfactant 4 (note 1)

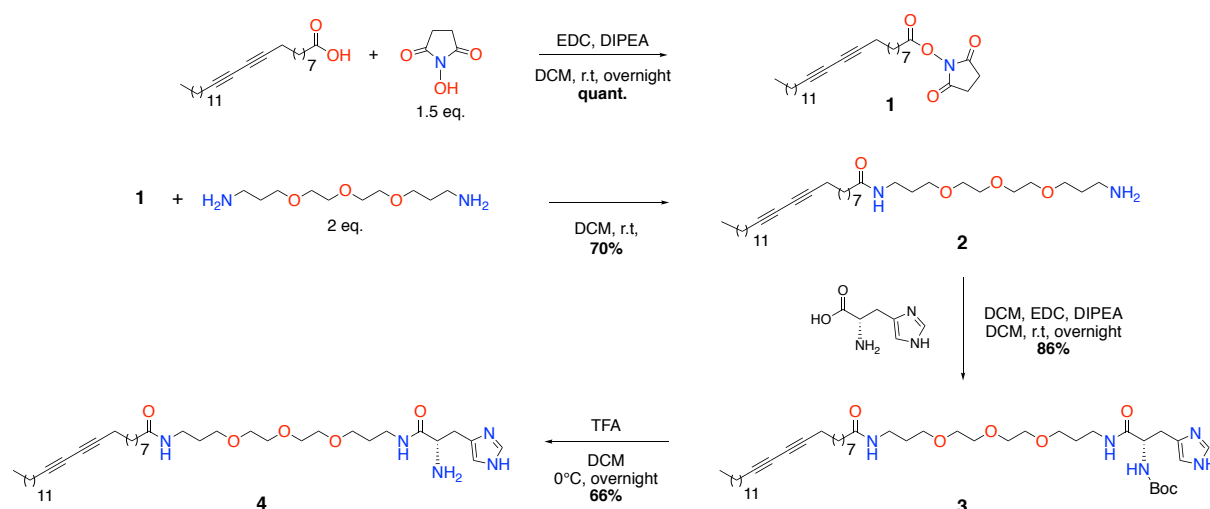


Fig. 3. Synthesis scheme of C₂₅diynetroxa-L-histidine (compound 4). EDC N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride), DCM dichloromethane, DIPEA diisopropylethylamine, TFA trifluoroacetic acid, r.t. room temperature

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pentacosadiynoate (1)

To a solution of 10,12-pentacosadiynoic acid (1 eq, 10 g, 26.7 mmol) and NHS (N-hydroxysuccinimide, 1.5 eq, 4.61 g, 40 mmol) in dichloromethane (DCM) were added 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC; 1.5 eq, 7.68 g, 40 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA; 1.5 eq, 5.18 g, 6.5 mL, 40 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature protected from direct light. After evaporation of the solvents the crude product was dissolved in ethyl acetate and extracted with water. The

organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to provide compound **1** (white powder, 12.6 g, 26.7 mmol, 100%). (Note 2)

TLC ($R_f = 0.42$, EtOAc/cyclohexane 4/6, UV and vanillin).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.835 (s, 4H), 2.59 (t, $J=6.9$ Hz, 2H) 2.23 (t, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.74 (q, 2H), 1.51 (q, 4H), 1.44-1.37 (m, 4H), 1.37-1.27 (m, 22H, alkyne chain), 0.88 (t, $J=7$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 177.2, 176.7, 77.4, 67.0, 35.9, 33.2-27.2, 23.9, 19.8 and 14.6 ppm.

C₂₅diynetrioxaamine (2)

Compound **1** (1 eq, 5g, 10.6 mmol) was dissolved in dry DCM and 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (2.5 eq, 6 g, 26.5 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/ NH_4OH 9:0.9:0.1 as eluent affording the desired compound **2** (white powder, 4.25 g, 7.4 mmol, 70%). (Note 3)

TLC ($R_f = 0.25$ (DCM/MeOH/ NH_4OH 9:0.9:0.1, UV and ninhydrin)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.69-3.63 (m, 8H), 3.61-3.58 (m, 2H), 3.51 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.23 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 2.22 (t, $J=7.1$ Hz, 4H), 2.16 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.93 (q, 2H), 1.76 (q, 2H), 1.63-1.59 (m, 2H), 1.54-1.47 (m, 4H), 1.44-1.37 (m, 4H), 1.37-1.27 (m, 22H, alkyne chain), 0.90 (t, $J=7$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.4, 78.0-77.9, 71.7-70.04, 66.6, 40.3-37.3, 33.2-29.6, 27.2 (C_{23}), 23.9 (C_2), 19.8 and 14.6 ppm.

LCMS (ESI+): m/z 577.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

C₂₅diynetrioxa-N α -(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine (3)

To a solution of *C₂₅diynetrioxaamine 2* (1 eq, 510 mg, 0.884 mmol) in dry dichloromethane, *N α -(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine* (1.2 eq, 271 mg, 1.06 mmol), 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.5 eq, 254 mg, 1.33 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (1.5 eq, 0.2 mL, 1.33 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight under argon atmosphere at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/ NH_4OH 9/0.9/0.1 as eluent affording compound **3** (yellowish oil, 620 mg, 86%).

TLC ($R_f = 0.5$ (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1, UV and ninhydrin).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.97 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 4.17 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 3.65-3.55 (m, 8H), 3.53-3.44 (m, 4H), 3.35-3.22 (m, 6H), 2.24 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.77-1.69 (m, 4H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 4H), 1.41 (s, 9H, Boc), 1.36-1.28 (m, 26H, alkyne chain), 0.9 (t, $J = 7$ Hz, 3H) ppm.

*C*₂₅*diynetrioxa-L-histidine (4)*

To a solution of compound **3** in dry DCM, trifluoroacetic acid (TFA) (50 eq, 2.8 mL, 38.1 mmol) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/0.9/0.1 as eluent affording desired product **4** (yellowish oil, 360 mg, 66%).

TLC ($R_f = 0.4$ (DCM/MeOH/NH₄OH 9:0.9:0.1, UV and ninhydrin).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.97 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 4.17 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 3.65-3.55 (m, 8H), 3.53-3.44 (m, 4H), 3.35-3.22 (m, 6H), 2.24 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.77-1.69 (m, 4H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.54-1.47 (m, 4H), 1.43-1.28 (m, 26H), 0.9 (t, $J = 7$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 174.9, 161.6, 135.5, 132.6, 118.4, 115.9, 115.4, 76.6, 76.5, 70.1, 69.9, 69.8, 68.5, 68.3, 65.0, 53.5 38.7, 36.6 36.4, 35.8, 31.7, 29.4-28.1, 25.6, 22.3, 18.3, 13.1 ppm.

HRMS (ESI): m/z 714.554 ($[M+H]^+$, calculated for C₄₁H₇₂N₅O₅ 714.554)

3.2 Preparation of the micelles

The following protocol describes how to formulate micelles at 5 mg/mL in water characterized by a diameter ranging from 7 to 10 nm.

1. Solubilize 5 mg of surfactant **4** in 200 μ L of HCl 0.1 N and 800 μ L ethanol (analytical grade).
2. Sonicate for 5 minutes (80 W, 25°C) until total solubilisation of surfactant **4**.
3. Evaporate the solution under reduced pressure until formation of a film. (Note 4)
4. Dissolve the film in 1 mL of fresh deionized water.
5. Sonicate during 30 min (80 W, 25°C) to obtain micelles.
6. Polymerize the micelles during 4 hours by UV-irradiation at 254 nm and 48 W in 1 mL quartz cuvettes (Hellma QS) using a Cross-Linker Bio-Link 254. (Note 5)

7. Dialyze the micelles in 2,000 MWCO dialysis cassettes starting with 70% ethanol/deionized water to 100% deionized water during a 4 days period. (Note 6)

Depending on the protocol that is used for the formulation, surfactant **4** can also form nanofibers (Fig. 4). These latter structures however turned out to be inactive for siRNA transfection, as they are too big to get internalized by the cells (unpublished results). (Note 7)

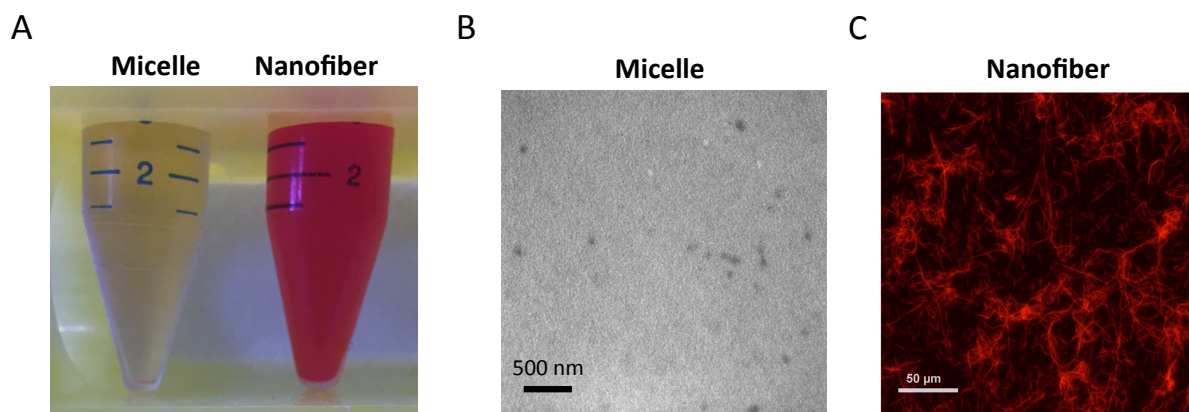


Fig. 4. (A) Structure-dependent coloration of the solution: On the left the micellar form is yellow orange, on the right is shown the fluorescent red Nanofiber form. (B) Electron microscopy of the micelles. (C) Fluorescence microscopy of Histidine-surfactant Nanofibers.

3.3 Characterization of the micellar system

Due to their high molecular weight, the micelles cannot be characterized by classical NMR methods. We therefore performed CMC measurements, DOSY-NMR experiments, gel mobility shift assays and dynamic light scattering (DLS) to characterize these nano-objects.

3.3.1 Critical Micelle Concentration (CMC)

The CMC values were determined by using the pyrene inclusion method as described in the literature.¹⁷ This method makes use of the environment specific fluorescence of pyrene probe as a detection of organized lipidic environment.

1. Prepare a 10 mM stock solution of micelles in deionized water.
2. Prepare a set of dilution ranging from 2 mM to 1 μ M in deionized water in order to have a final volume of 1 mL.
3. Prepare a 1 mM solution of pyrene in dimethylsulfoxide (DMSO).

4. Add 1 μL of the pyrene solution to 1 mL of each sample and stir vigorously.
5. Let the samples incubate at room temperature for 2 hours until fluorescence measurement.
6. Settings of the fluorescence spectrophotometer are: UV excitation: 339 nm, Band pass 5 nm.
7. Measure the relative intensities at 373 nm and 384 nm.
8. Fluorescence of the micelles without pyrene is used as control.
9. The ratio of the relative fluorescence intensities $I_{373\text{nm}}/I_{384\text{nm}}$ are plotted against log of millimolar concentrations. CMC is deduced from the inflexion point in the obtained graph. (Note 8)

3.3.2 DOSY-NMR experiments

DOSY allows discriminating the NMR signals of different species according to their diffusion coefficients. Hence, this technique permits a visualisation of the different populations present within a sample.

The monomer surfactant population is first separated from the polymerized surfactant molecules by solvent extraction with deuterated methanol.

1. Formulate 5 mg/mL solution of polymerized micelles, non-polymerized micelles and dialyzed polymerized micelles as described in the formulation part.
2. Evaporate under vacuum 1 mL of each solution.
3. Solubilize the obtained solid film in deuterated methanol. (see Note 9)
4. Analyse samples in DOSY-NMR experiments.
5. The percentage of covalently bridged surfactants versus the remaining monomer molecules can be calculated from the peak integration from the 2D-plot, as they show two distinct populations characterized by their respective diffusion coefficients (see reference 7).

3.3.3 Gel mobility shift assay

The agarose gel mobility shift assay is a method that allows to determine the capacity of a given compound to complex nucleic acids. The electrophoretic analysis of a specific nucleic acid in presence of increasing concentrations of complexation agent allows determine the minimal amount of such a compound to retard the migration of nucleic acids during agarose gel electrophoresis. On one side the uncomplexed nucleic acid is detected as a discrete band.

On the other side the complexation leads to the formation of particles, which are unable to migrate through the agarose mesh, and stay at the top of the gel.

1. Prepare a 1.3% agarose gel by dissolving 1 g of agarose in 75 mL of tris-acetate buffer (1X, pH=7.5) and heating the suspension at 100°C using a microwave oven. After cooling down to about 60°C, add 15 μ L of SYBRSafe to the agarose solution. (Note 10)
2. Pour the agarose solution in the electrophoresis tray, and position a comb into the gel. Using a Pasteur pipette remove bubbles from the gel and then wait until agarose has solidified (at least 30 min is required). Place the gel in the electrophoresis unit and remove the comb. Take care to add enough Tris-acetate buffer to cover the gel.
3. In order to analyze the complexation of siRNA by the cationic micelles 300 ng amounts of siRNA samples are distributed in Eppendorf tubes (4.3 μ L, 5 μ M). (Note 11)
4. Dilute with HBG in order to obtain a final volume of 20 μ L (be careful, volume of added micelles must be taken into account for determining the volume of HBG).
5. Add various volumes of micelles to obtain the desired N/P ratios. (Note 12)
6. Mix well and incubate for 1 hour at room temperature.
7. Add 3 μ L of loading buffer (50% glycerol in Tris-Acetate buffer) to each sample, mix, and then load 20 μ L of samples into the wells of the agarose gel. Also include a sample containing siRNA without micelles as a control.
8. Electrophoresis conditions: 80 V for 30 min.
9. Visualize the agarose gel stained with SYBRSafe using an UV illuminator.

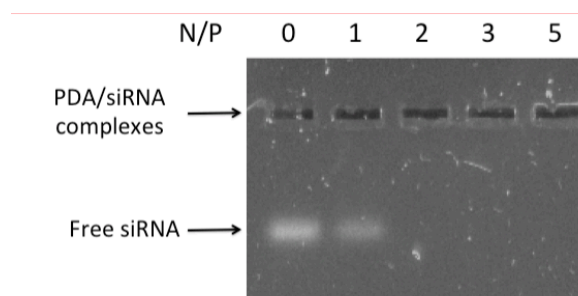


Fig. 5. The siRNA was complexed with the 4h polymerized micelles (PDA) in low salt conditions at increasing N/P ratios; Lane 1 (N/P=0): naked siRNA. Analysis by electrophoresis on a 1.3% agarose gel in tris-acetate buffer (40 mM, pH=7.5).

The band corresponding to the free siRNA disappears at a N/P ratio above 1 meaning that total complexation has occurred (lanes 3-4-5 in Figure 5). We also note that no fluorescence is observed in the wells (start line) although siRNA is present in complexed form. The micelle may quench the fluorescence of SYBR Safe or SYBR Safe is no more able to insert into the complexed siRNAs.

3.3.4 Dynamic Light Scattering

The hydrodynamic diameter of the micelles and micelles/siRNA complexes were determined by using the Zetasizer Nano-ZS system using the following protocol.

3.3.4.1 Size measurement of the micelles

After formulation, the size of each sample should be measured to confirm the presence of the micelles. In our case, we developed the formulation protocol in such a manner that we obtain 10 nm diameter objects.

1. Prepare a 5 mg/mL solution of micelles as indicated in the formulation section.
2. Transfer 90 μ L of the solution in the low-volume quartz cuvette. Place the cuvette in the cuvette block of the Zetasizer Nano-ZS instrument.
3. Set the parameters as described below:
 - Temperature: 25°C
 - Index of refraction of material: 1.43
 - Index of refraction of pure water: 1.33
 - Viscosity of water used: 0.8872 cP
 - Sampling time: 55 s
 - Number of runs: 3
4. Record a first measurement after equilibration of the sample (about 60 s) in the cuvette. The values correspond to average size \pm standard deviation of three runs. Perform at least three acquisitions to ensure the reproducibility of the measurements and the stability of the sample over time. (Note 13)
5. After measurements, the sample can be recovered for use in other experiments.

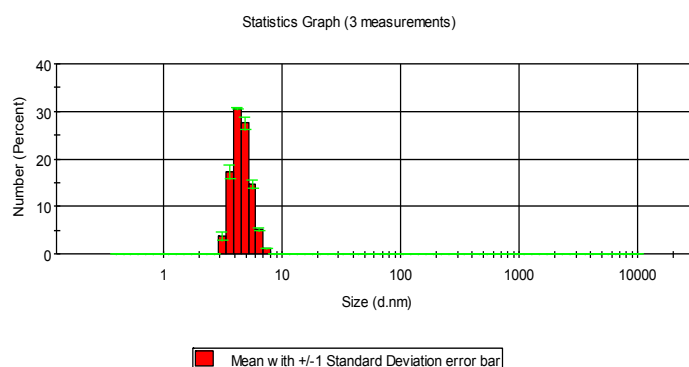


Fig. 6. Size distribution (by number) of the micelles after 4 hours of photopolymerisation.

A homogeneous population of small objects with a diameter below 10 nm was observed. Here we represent the population by “number”, which gives the most consistent results (Figure 6).

3.3.4.2 Size measurement of the micelles/siRNA complexes

1. Prepare complexes by mixing 70 ng of siRNA (5 μ M) pre-diluted in HBG (pH=7.5) with various amounts of micelles (7 mM) to form complexes at N/P ratios ranging from 5 to 50 (in 100 μ L).
2. Incubate at 25°C for 1 hour.
3. Transfer 90 μ L of the solution in the low-volume disposable cuvettes. Place the cuvette in the cuvette holder of the DLS measurement system.
4. Set the parameters as described below:
 - Temperature: 25°C
 - Index of refraction of material: 1.43
 - Index of refraction of HBG 5%: 1.3374
 - Viscosity of HBG 5%: 1.1557 cP
 - Sampling time: 55 s
 - Number of runs: 3
5. Record a first measurement after equilibration of the sample (about 60 s) in the cuvette. The values correspond to average size \pm standard deviation of three runs. Perform at least three acquisitions to ensure the reproducibility of the measurements and the stability of the sample over time. (Note 14)
6. After measurements, the sample can be recovered for use in other experiments.
7. The measured size of these siRNA-micelle complexes is around 60 nm at 1 hour maturation in HBG buffer.

3.4 *In vitro* evaluation

3.4.1 Cell culture

The A549-Luc cells were grown in RPMI 1640 medium (Eurobio) supplemented with 10% FBS (Eurobio), 1% antibiotic solution (pencillin-streptomycin, Gibco-invitrogen) and maintained under 0.8 µg/mL G418 selection (Promega) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were passaged using trypsin when they reached 90% confluence.

Experiments should be anticipated in order to be sure to have enough cells.

1. The day prior transfection, use 2 mL of trypsin (for a T75 culture flask) to detach actively dividing cells (5 min at 37°C).
2. After addition of 8 mL of RPMI 1640 supplemented with 10% of serum, the cells are centrifuged during 5 min at 1000 rpm.
3. Remove the supernatant carefully and dilute the cells in 10 mL of fresh complete medium.
4. After having dissociated cells by making an up and down with a pipette, cells are counted.
5. Determine how many wells are needed. Notably, transfection experiments are usually done using duplicates or triplicates.
6. The required volume of cell suspension to obtain a confluence of 90% at the end of the transfection experiment is then calculated (for A549-Luc cells, in 24-well tissue culture plates 25,000 cells/well are plated). (Note 15) Dilute the cell suspension to obtain 50,000 cells/mL, in order to distribute 0.5 mL/well in 24 well plates.
7. The cells are then incubated at the appropriate cell culture conditions (a humidified tissue culture incubator at 37°C and 5% CO₂).

3.4.2 siRNA transfection

The day after the preparation of the 24 well-plates, the cells are examined using a microscope to be sure that they are in good shape. All complexes are prepared just before transfection. The following protocol is used to perform siRNA transfection in triplicates:

1. Thaw tubes containing the siRNA-Luc or siRNA-CTL (stock solution at 100 µM). Dilute it to have a final work solution of 5 µM in RNase free water.

2. For a triplicate, to have a 10 nM final concentration of siRNA, take 4 μL of the 5 μM siRNA solution and dilute it in HBG 5% to have a final volume of 330 μL (by taking into account the volume of micelle that is needed). (Note 16)
3. Add various volumes of a 5 mg/mL micelle solution in each sample (from 9 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, optimal activity window of the nanocarrier). (Note 17)
4. Use the same protocol for control experiments with a control siRNA. This control is important in order to ascertain that the silencing is gene specific.
5. In each experiment, a commercial transfection reagent (for example IINTERFERin from Polyplus-Transfection) should be added and used according to the recommendation of the supplier to control the quality of siRNA transfection (positive control).
6. Mix the siRNA with the micelles, centrifuge very shortly to pull down all the drops, and let the tube at room temperature for about 1 hour.
7. Remove the culture medium from the cells by aspiration. If the cells that are used adhere well, the cultures may be rinsed with PBS in order to remove serum-containing proteins from the wells and replace it with free-serum medium (0.5 mL).
8. Add 100 μL of micelle/siRNA transfection medium into each well of the triplicate and incubate at 37°C for 4 h.
9. After 4 hours of incubation, 60 μL of foetal bovine serum are added in each well to obtain 10% serum concentration.
10. Incubate at 37°C for 48 h.
11. Analyse the cells for luciferase expression and protein content.

3.4.2 Luciferase assay

To determine luciferase activity, the following protocol is used:

1. After 48 hours of transfection, remove carefully the culture medium from the 24-well plates.
2. Wash each well with 1 mL of PBS.
3. Add 100 μL of lysis buffer to each well (1/5 diluted lysis buffer in water) (Luciferase kit from Promega).
4. After 30 min of gentle shaking, the cell lysate is recovered and transferred into annotated 1.5 mL Eppendorf tubes.

5. Centrifuge the tubes for 5 min at 14,000 *rpm* to pellet debris.
6. Take 2 μL of the supernatant of each tube and transfer them into the wells of a white 96-well plate.
7. Measure the bioluminescence using a luminometer that automatically injects 50 μL of luciferase substrate (luciferin).
8. Plate is shaken for 3 s and then read luminescence over 1 s.
9. Calculate the light units for 10 s /100 μL of sample by multiplying the relative light units measured by 10 and 50.
10. After having measured the protein content (see below), express the efficiency as Relative Light Units (RLU)/10 s/mg of protein.

Luciferase expression must be compared to non-transfected cells (untreated cells) but also to cells transfected with non-coding siRNA to determine the specific inhibition by taking into account possible off-target or cytotoxicity (see Figure 7).

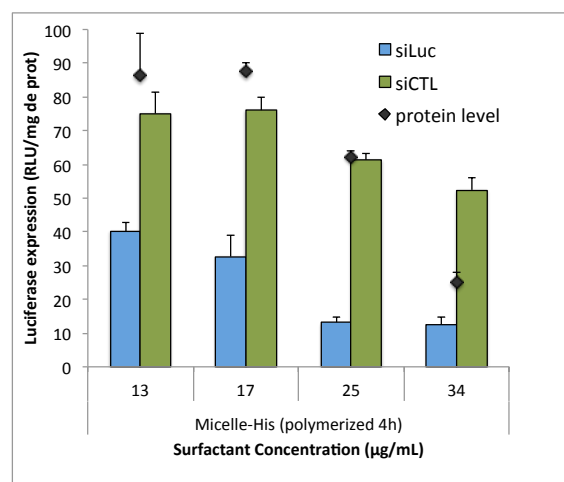


Fig. 7. siRNA delivery experiment performed on A549-luc cells using various concentrations of micelle-Histidine and 10 nM siRNA. Luciferase expression compared to non-transfected cells and the percentage of cellular proteins level also compared to non-transfected cells after 48h of transfection are represented. Results and standard deviations are given as a mean of triplicate.

3.4.3 Protein assay

Protein concentration in cell lysate was measured using a BCA assay kit according to the following protocol.

1. Knowing that 1 mL/tube is needed, prepare the mixed BCA solution (with solution A

and solution B) with the following A/B ratio: 50/1.

2. In parallel, prepare the standard solution of BCA ranging from 1 to 12 μg of bovine serum albumin (BSA) starting from a stock solution at 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of BSA. Then, add 15 μL of lysis buffer to each standard well.
3. Prepare also two blanks containing only 15 μL of lysis buffer.
4. Transfer 15 μL of each cell lysate into plastic tubes. (Note 18)
5. Add 1 mL of mix BCA solution in each tube including blanks.
6. Heat at 60°C for 30 minutes (change of coloration from green to purple).
7. Transfer the solution contained in tubes into 1 mL semi-micro cuvettes.
8. Read absorbance at $\lambda = 562$ nm and determine the protein content in each sample by using the BSA standard curve.

3.4.3 Cell viability assay

Cytotoxicity of vectors can be measured by MTT assay. Indeed, tetrazolium MTT is reduced by active cells resulting in purple formazan quantifiable by spectrophotometry. Hence, cell proliferation (and thus cell viability) can be measured.

1. 24 hours prior to assay, cells are plated at 10×10^3 per well in 100 μL complete culture media in 96-well tissue culture plates.
2. Replace culture medium, with RPMI medium without FBS.
3. Add different concentrations of micelles +/- siRNA in serum-free conditions for 4 hours.
4. To provide blank for absorbance readings representing total cell death, add 10 % DMSO in three control wells.
5. At 4 hours add 10 μL of serum per well.
6. After 48h, add 100 μL of MTT reagent (diluted in serum-free cell culture medium at a concentration of 1 mg/mL) and incubate 2 hours at 37°C until purple precipitate is visible.
7. Remove carefully the medium and add 100 μL of DMSO per well to dissolve purple precipitate.
8. After 30 min of stirring, record absorbance at 570 nm in a plate reader (SAFAS instruments)

By comparing the cytotoxicity results obtained with dialyzed and non-dialyzed micelles and correlating this with DOSY-NMR experiments, we concluded that non-polymerized

monomers largely contribute to residual toxicity.⁸ Extensive dialysis steps on polymerized micellar solutions can thus be used to reduce the cytotoxicity of the nanovectors.

4. Notes

- (1) All chemical steps that involve a “diyne” part should be protected from light by using amber glassware to prevent photopolymerisation. They should be stored at -20°C. If the compound starts to photo-polymerise, it will turn blue and will not be soluble anymore.
- (2) We recommend using EDC as coupling agent rather than DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide) because of its good solubility in water. Hence, a simple workup is required to remove the excess of EDC. For this step, it is recommended to perform only a workup and no column chromatography because of the sensitivity of the NHS ester derivative (N-hydroxysuccinimide ester) on silica gel. Thus a white powder should be obtained.
- (3) 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine must be added in excess to limit the formation of the bi-coupling compounds. The bi-coupling and the mono-coupling compounds can be easily separated using column chromatography (first fraction: bi-coupled product with two acyl chains). To facilitate the purification, ammonia is added into the eluent to deprotonate the amino group.
- (4) At the end, the micelle solution will be acidic with a pH ranging from 4 to 6 according to the efficiency of evaporation of excess HCl during chlorhydrate formation.
- (5) The ene-yne system resulting from the polymerisation is a conjugate system that gives rise to a bathochromic shift. Hence, in our case, as the angle of polymerisation in spherical object is not optimal, polydiacetylenic micelles are slightly conjugated and show an absorption maximal in UV-A to blue light (400 nm) and therefore appear yellow. So, if you generate micelles, the solution should be yellow whereas PDA-nanofibers containing solutions will be red. After testing in *in vitro* assays different times of polymerisation of micelles, 4 hours has proven to be the optimal condition to have the best balance between efficiency and cytotoxicity.⁸
- (6) This formulation protocol turns out to be pretty straightforward and robust at the scale of 5 mg of surfactant. When using larger scales, the biological activity of the resulting micelles was shown to be lower for reasons that are still unclear. We recommend controlling each batch in biological assays before pooling them.

- (7) Protocol to obtain nanofibers: Surfactant **4** was dissolved in ethanol at 60°C under sonication (60 mg/6 mL). This warm solution was filtered through a cotton pad (in a glass pipette, to remove minor polymerized contaminants) and injected into ethanol-water (12 mL/42 mL) mixtures to obtain final 30 % ethanolic solutions at a concentration of 1 mg/mL. This solution was placed at +4°C for 18 hours, where it transformed into an opaque gel-like suspension. UV-polymerization was performed on 5 mL batches in a UV-Crosslinker. The batches were UV irradiated in open 6 well culture plates for 10 minutes at 254 nm. During the UV-irradiations the suspensions turned dark blue. The dark-blue suspensions were acidified by adding 50 µL diluted chlorhydric acid (1 N) to each of the 5 mL batches, which were transferred in 15 mL Falcon tubes. The suspensions were then heated under sonication at 55°C for 1 hour. This led to a drastic color change. The suspensions turned crimson red, and the polymerized aggregates dissociated into nanofibers. Their homogeneity can be assessed by direct observation by fluorescence microscopy (rhodamine filter set, 600 fold magnification).
- (8) To measure it in a mathematically way, you plot all the points. Two linear curves crossed at one inflexion point should be obtained. By tracing the linear trendlines, we have access to the two equations of the curves and then deduce thank to a system of equation at one unknown, the CMC.
- (9) The remaining solid was solubilized in deuterated methanol in order to separate monomers from polymerized lipids out of the micelles; micelles are indeed supposed to be unstable in methanol.
- (10) The pH and the nature of the running buffer are crucial for gel retardation assay with these micelles. Indeed, to have correct results, you should use a running buffer without any anionic charged molecules or complexing agents that could compete with the siRNA. EDTA should be banished. Moreover, the pH of the running buffer should be ranged between 7 and 7.5. Above 7.5, the primary amine of the histidine group won't be protonated anymore and thus the micelle will no longer be positively charged.
- (11) We recommend using a minimal amount of 300 ng to realise the electrophoresis to have a clearly visible siRNA band.
- (12) To know the global charge of the complexes formed between the micelles and the siRNA, N/P ratio is calculated. It corresponds to the positive charges contained in the surfactant versus the negative charge of the siRNA. Here, at pH=7.5 the surfactant has only one positive charge (the protonated primary amine of the histidine group) and no

negative charge and the siRNA possesses 42 negative charges because there are 42 phosphate groups. Therefore, N/P ratio can be calculated with the following equation:

$$\frac{N}{P} = \frac{\text{The amount of micelles} * 1 \text{ (in mol)}}{\text{The amount of siRNA} * 42 \text{ (in mol)}}$$

- (13) To verify the quality of the data, it is recommended to check the correlogram. All the correlation curves should be S-shaped, with a maximal correlation coefficient higher than 0.6.
- The automatic attenuator setting at working concentrations should be at medium values, indicating a good count rate. If the automatic attenuator shifts wide open (values from 10 to 11), the sample is too diluted to enable a correct size measurement.
- (14) With our system, at N/P above 10, complexes with a size under 100 nm of diameter should be obtained.
- (15) The initial number of cells plated per well was calculated in such a way that we have a confluency of 90% after 72 hours (knowing that this cell line has a fast division rate).
- (16) The amount of products is calculated by taking into account a dead volume of 10 μ L per well.
- (17) For siRNA experiments, it is important to choose the amount of micelles that gives the highest transfection efficiency associated with the lowest cytotoxicity. Indeed, cell toxicity may lead to nonspecific knockdown of genes. Of note, the efficiency of the vector is cell line dependent.
- (18) We recommend centrifuging samples a second time (5 minutes at 14000 rpm) prior to the protein quantification to be sure that no more cellular debris is present in the supernatant which would cause huge variations between individual quantifications.

Acknowledgments

This work was supported by the Labex Medalis and by the FRM (fondation pour la recherche médicale). M.R. has a financial support from MESR (Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche). The authors would like to thank the chemical analysis service platform of the faculty of pharmacy of Illkirch (France) and Bruno Vincent (chemical analysis service platform at the university of Strasbourg) for DOSY-NMR experiments.

References

- 1 S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev and K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**,

9951–9956.

- 2 J. P. Clamme, S. Bernacchi, C. Vuilleumier, G. Duportail and Y. Mély, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1467**, 347–361.
- 3 T. Blessing, J.-S. Remy and J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 1427–1431.
- 4 D. Lleres, E. Dauty, J. P. Behr, Y. Mély and G. Duportail, *Chem. Phys. Lipids*, 2001, **111**, 59–71.
- 5 E. Dauty, J.-S. Remy, G. Zuber and J.-P. Behr, *Bioconjug. Chem.*, 2002, **13**, 831–839.
- 6 E. Morin, M. Nothisen, A. Wagner and J.-S. Remy, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1916–1923.
- 7 P. Neuberg, A. Perino, E. Morin-Picardat, N. Anton, Z. Darwich, D. Weltin, Y. Mely, A. S. Klymchenko, J.-S. Remy and A. Wagner, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 11595–11598.
- 8 M. Ripoll, P. Neuberg, A. Kichler, N. Tounsi, A. Wagner and J.-S. Remy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 30665–30670.
- 9 J.-P. Behr, *Chim. Int. J. Chem.*, 1997, **51**, 34–36.
- 10 P. Neuberg and A. Kichler, *Adv. Genet.*, 2014, **88**, 263–288.
- 11 A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux and O. Danos, *J. Gene Med.*, 2001, **3**, 135–144.
- 12 E. Gravel, J. Ogier, T. Arnauld, N. Mackiewicz, F. Ducongé and E. Doris, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 400–408.
- 13 D. Yang, R. Zou, Y. Zhu, B. Liu, D. Yao, J. Jiang, J. Wu and H. Tian, *Nanoscale*, 2014, **6**, 14772–14783.
- 14 I. Theodorou, P. Anilkumar, B. Lelandais, D. Clarisse, A. Doerflinger, E. Gravel, F. Ducongé and E. Doris, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2015, **51**, 14937–14940.
- 15 D. Yao, S. Li, X. Zhu, J. Wu and H. Tian, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 1233–1236.
- 16 D. Yang, R. Zou, Y. Zhu, B. Liu, D. Yao, J. Jiang, J. Wu and H. Tian, *Nanoscale*, 2014, **6**, 14772–14783.
- 17 J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolívar and C. Carnero Ruiz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **258**, 116–122.

Polydiacetylenic Nanofibers as new siRNA vehicles for *in vitro* and *in vivo* delivery

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

P. Neuberg^a, I. Hamaidi^b, S. Danilin^b, M. Ripoll^a, M. Nothisen^a, A. Wagner^c, A. Kichler^a,
T. Massfelder^{b*}, J.-S. Remy^{a*}

Polydiacetylenic nanofibers (PDA-Nfs) obtained by photopolymerization of surfactant 1 were optimized for intracellular delivery of small interfering RNAs (siRNAs). PDA-Nfs/siRNA complexes efficiently silenced the oncogene Lim-1 in the renal cancer cells 786-O *in vitro*. Intraperitoneal injection of PDA-Nfs/siLim1 downregulated Lim-1 in subcutaneous tumor xenografts obtained with 786-O cells. Thus, PDA-Nfs represent an innovative delivery system for *in vivo* delivery of siRNAs.

Since the discovery of ARN interference in 1998 by Andrew Z. Fire et Craig C. Mello, many attempts have been made to translate this strategy towards new approaches in the treatment of cancers in particular through specific silencing of deregulated oncogenes, responsible for cancer growth.^{1,2} Nevertheless, despite enormous efforts in the design of carriers for siRNA, therapeutic success has been hampered by the low efficiency of siRNA delivery when used *in vivo*. Contrary to the transfection of DNA molecules, the smaller siRNA molecules show less affinity towards transfection agents, so their intracellular delivery by classical transfection agents such as cationic polymers is reduced.³ The siRNA molecules present small beta-helices being rod-like structures. Their stiffness and small size accounts for reduced cooperative electrostatic binding to the transfection agents.^{3,4}

Many attempts have been made to increase the affinity of the delivery vehicle for the small siRNA molecules by introducing stabilizing groups in the transfectant.^{5,6} This can be achieved by introduction of hydrophobic or aromatic groups in cationic polymers, helping to create a pre-organized structure, presenting non-covalent chain interactions (π -stacking and van der Waals bonding).⁴ Cationic amphiphiles on the other hand may be stabilized by a precipitation method, based on the formation of small sized cholesterol-rich cores that are surrounded by the cationic molecule forming so-called SNALPs (stable lipidic nucleic acid particles).⁷ These pre-organized platforms show great promise for *in vivo* and clinical

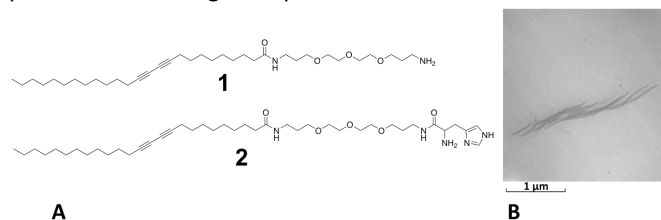


Figure 1: A) structure of diacetylenic surfactant **1** and histidine analogue **2**, B) Low voltage electron microscopy of PDA-Nfs.

Here, we report on a novel polymeric platform for the delivery of siRNAs. Diacetylenic surfactants, based on a long C₂₅ hydrocarbon chain containing conjugated triple bonds, are able to self-assemble into a variety of supramolecular forms, which can be cross-linked by photopolymerization. The diacetylenic system can be polymerized upon UV irradiation forming so-called PDA (PolyDiAcetylenic) systems. The group of E. Doris realized pioneering work on PDA based micellar systems for drug delivery.^{10,11} Our group recently described that diacetylenic surfactants, which are forming micelles, can be photo-polymerized efficiently and be used for the delivery of biologically active molecules. Variations on the polar headgroups allow for fine-tuning and optimization of their delivery properties. Indeed, short cationic headgroups of the

^a V-SAT Laboratory, Vectors: Synthesis and Therapeutic Applications, Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

^b Laboratory "Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques" (VSDS), Team 3 "Signalisation et communication cellulaires dans les cancers du rein et de la prostate" - UMR_S 1113, INSERM-Université de Strasbourg, France.

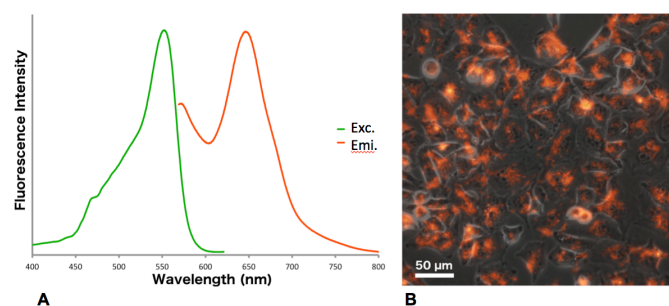
^c Laboratory of Bio-Functional Chemistry (BFC), Labex Medalis, CAMB UMR7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France.

* corresponding authors Dr. T. Massfelder massfeld@unistra.fr; Dr. J.-S. Remy remy@unistra.fr

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details chemical synthesis, preparation of PDA-Nfs and biophysical characterization, detailed *in vitro* and *in vivo* results of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

micelle forming PDA surfactants conferred them capabilities for gene delivery while neutral oligo-ethylene groups favor hydrophobic drug formulation.^{12,13} On the other hand, the introduction of pH sensitive imidazole groups allowed for efficient *in vitro* siRNA delivery.¹⁴ Nevertheless, the degree of polymerization of these surfactants present in the micelles is low, as they show no significant UV absorption proving absence of an extended polymerized conjugated system. In the present work we report on the generation of a new form of the PDA system that forms highly polymerized hyperconjugated polydiacetylenic nano-fibers (PDA-Nfs). In order to increase the affinity of the siRNA molecules for the delivery systems we directed our efforts towards the extension of the degree of polymerization and size of the PDA-Nfs.

Figure 2: **A)** Fluorescence excitation (green) and emission



(orange) spectra of trioxamine-Nfs (**1**). **B)** Fluorescence microscopy of A549-Luc cells transfected with siRNA/PDA nanofibers showing an overlay of phase contrast picture and fluorescence image. A strong internalization of PDA-Nfs/siRNA complexes (with a N/P=13 and a final siRNA concentration of 10 nM) is observed after 24 hours by fluorescence microscopy using the autofluorescence of the PDA-Nfs.

In initial screening and formulation assays, we indeed observed that some of the diacetylenic surfactants we had synthesized, spontaneously reorganized in gel-like structures upon prolonged storage at 5°C. A similar gelation of PDA surfactants has already been described on propargyl-ammonium PDA surfactants.¹⁵ The previous nano-gels become extremely photosensitive and polymerize into deep blue microfibers upon short irradiation times at 254 nm. Whereas the micellar form of these diacetylenic surfactants require irradiation times of several hours, only a few minutes or even seconds will completely polymerize the PDA-nano-gels. Upon this initial observation we expected some of these highly polymeric structures to be good candidates for delivery of biomolecules as their colloidal stability is supposedly enhanced by covalent bonds. We first attempted to form a nano-gel with the described histidine C25 diyne surfactant (**2**), which had been designed for siRNA delivery under its polymerized PDA-micellar form.¹⁴ As expected, this molecule is able to form a nanogel upon storage at 5°C. Photopolymerization of this gel at 254 nm leads to extremely long microfibers, extending over 50 μm long distances (**ESI figure S1**). It is obvious that intracellular delivery of nanomaterials requires smaller sizes than the cells themselves. Formulation assays with a diverse

set of diacetylenic surfactants showed that the achiral C₂₅ diyne-amine (**1**) is the best candidate as it is forming photopolymerized nanofibers, which break loose upon pH reversal to acidic pH and upon heating and sonication. The micro-fibers formed with histidine surfactant (**2**), on the other hand, could not be fragmented under similar, and even harsher conditions.

The amphiphile (**1**) has been synthesized by activation of the commercial C₂₅-diyne-oiic acid by formation of its activated N-hydroxysuccinimide ester. The NHS ester has been isolated by extraction, and has been used for the coupling onto the unprotected 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine used in slight excess. The desired mono-coupling product has been isolated and separated from bi-coupling product by silica gel chromatography using methanol/ammonia/dichloromethane gradient as described in supplementary information. The mono-coupling product (**1**, **figure 1A**) was directly obtained under its desired unprotonated form by silica gel chromatography.

The formulation proceeded by first dissolving the amine in warm ethanol under sonication in order to form a concentrated ethanolic solution. This was filtered over a cotton plug to remove polymerized contaminants that formed upon storage of the monomer surfactant. This solution was introduced in ethanol-water mixtures, in order to form final 30% ethanol solutions. These were placed at 5°C, where the surfactant is forming a gel-like solution. This gel was highly photosensitive and was polymerized under hard UV-light at 254 nm in a UV-Crosslinker by irradiation for 10 minutes in small Petri dishes (or 6-well cell culture plates, see **figure S4**).

This initial photopolymerization of surfactant (**1**) formed a hyperconjugated system that strongly absorbs in visible light, showing a dense blue color. It then turned crimson red-colored when physical or chemical strains was exerted: acidification of the medium, heating and sonication (see ESI for detailed experimental description and **figure S5**). In this second step the dark-blue precipitate dissociated into the desired PDA-Nfs. The observed color transition was in accordance with descriptions in the literature, in which PDA systems are used as biosensors: a physical or chemical stimulus induces the blue-red color change, such as used for diagnosis of prostate cancer.¹⁶

We further characterized these formulations by physicochemical methods, such as UV-Vis and fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and electron microscopy (see **ESI for detailed biophysical characterization data and figure 1B**).

The fluorescence absorption and excitation spectra are shown in **figure 2A**. Interestingly the maximum excitation wavelength is separated by a wide bandwidth between 550 and 646 nm (Stokes shift of about 100 nm).

The hydrodynamic diameter of the PDA-nanofibers was measured by dynamic light scattering experiments (**ESI figure S6A**). Their mean size by intensity is 780 nm. The same fiber solution diluted 10-fold showed a zeta potential of +52 mV, confirming the presence of positively charged amine functions at the outer side of the nanofibers (**ESI figure S6B**). Low

voltage electron microscopy allowed for a more detailed view on the internal lathe-like structure of these PDA-Nanofibers (ESI figure S5B).

Thanks to fine tunings of the preparation method, homogenous batches of small controlled sized nanofibers were obtained as detailed in supplementary information.

Complexation of anionic siRNA molecules in neutral buffer conditions, and analysis by gel electrophoresis show that siRNA is complexed at N/P values around 4. This ratio defines the total amine content of the fibers versus the number of phosphate groups present in the siRNA (ESI figure S7). Interestingly, similar complexation has been achieved with extensively dialyzed nanofibers, where all residual monomer is removed, confirming again indirectly the high polymerization efficiency under the conditions of nanofiber preparation (see ESI for dialysis purification and complexation assays).

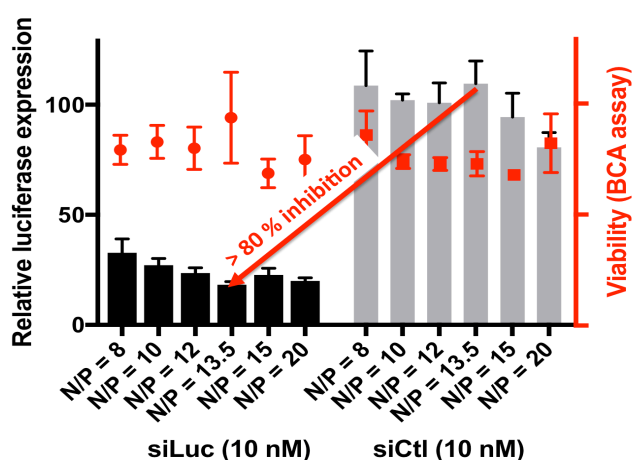


Figure 3: siLuc delivery in A549-Luc cell line at 10 nM siRNA concentration and various N/P ratios (optimal N/P for this cell line at N/P 13.5 shows a silencing of 82%). Viability is measured by total protein quantification and compared to untreated cells.

In a next step, the nanofibers were evaluated for their siRNA delivery capabilities on cultured cells. The strong intrinsic fluorescence facilitates direct observation by fluorescence microscopy. High internalization of the positively charged PDA-NFs alone (not shown), as well as of complexes formed between siRNA and the nanofibers (figure 2B) could be evidenced. This shows the potential of this system for delivering biomolecules. In order to prove the cytosolic delivery of siRNA, which is conditioned by endosomal escape, we used human lung carcinoma cells stably expressing the luciferase reporter gene (A549-Luc). The binary complexes between siRNA and nanofibers "PDA-Nf-siRNA" were realized by 1 hour incubation in HBG buffer (20 mM Hepes Buffered Glucose). The silencing efficiency was measured by comparing the residual expression with a control siRNA formulated in the same conditions. Up to 80% silencing could be obtained with 10 nM siLuc (siRNA targeting the luciferase expression; at N/P values from 12 to 20; see figure 3). Total protein quantification

of transfected cells, compared to untreated ones, shows low toxicity of the PDA-Nfs formulated siRNAs. Thus, the A549-Luc cell line allowed for the selection of the best performing batches, which were used in the subsequent experiments.

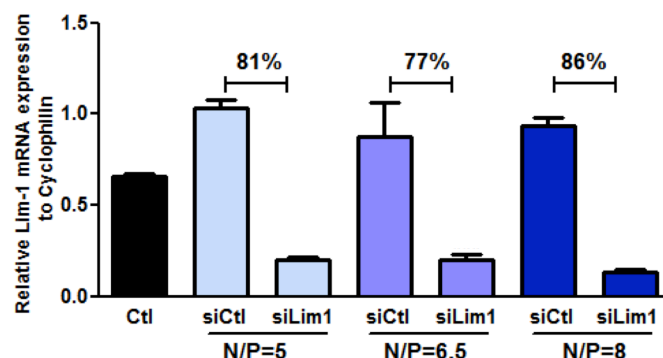


Figure 4: Reduced expression level of endogenous Lim-1 gene in 786-O cells after 48 h treatment with specific (siLim1) and control siRNA at 10 nM siRNA concentration and various concentrations of NFs (N/P = 5 to N/P = 8).

In order to verify the effectiveness of the PDA-Nfs on another cell line, the 786-O human renal cancer cells were selected. To find out the optimal delivery conditions of siRNA into 786-O cells, a luciferase expressing 786-O-Luc cell line was used. As with the A549-Luc cell line, a highly efficient silencing of luciferase was observed in 786-O-Luc cells, as indicated by direct bioluminescence imaging of the cell culture plates. The optimal N/P values (between N/P 5 and 10) were lower than those found for A549-Luc cells (see SI for bioluminescence assay and cell density measurements after crystal violet staining).

The Clear Cell renal Cell carcinoma (CCC) is the most common and aggressive form of kidney cancer, which remains resistant to current anticancer therapies. 786-O cell line represents the most used model to study CCC. Dr. Massfelder's group has recently identified the developmental transcription factor Lim-1 as an oncogene in CCC regulating tumor growth.^{17,18} The selected 786-O cell line expresses constitutively oncogene Lim-1.¹⁷

We evaluated the capacity of PDA-Nfs to silence Lim1 as a model of an endogenous gene in the 786-O cell line, while being of primary biologic importance. As shown in figure 4, the PDA-Nf allowed for an inhibition of the expression of Lim-1 by more than 80% at various PDA-Nfs concentrations (Figure 4). The relative expression of Lim-1 has been measured by qPCR analysis in comparison to cyclophilin reference gene (48 hours treatment at 10 nM siLim1 concentration; figure 4). The RNA interference efficiency has been calculated by comparing the level of Lim-1 expression on PDA-Nfs/siLim1 treated cells to that of PDA-Nfs/siCtrl..

In order to evaluate the capacity of the PDA-Nfs to silence a gene that is even higher expressed, we used a stable 786-O clone, overexpressing Lim-1 by up to 80 times. This clone was treated with 10 nM of siLim1 and siCtl complexed with 4 μM amine concentration of PDA-Nfs (N/P = 10). RT-qPCR analysis

shows a decrease of Lim-1 expression by approx. 90% (ESI figure S10).

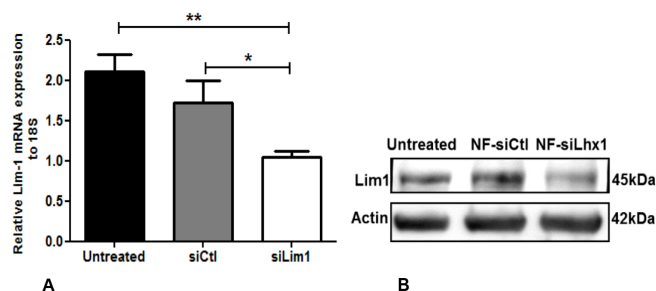


Figure 5: *In vivo* silencing efficiency of siRNA targeting Lim-1 oncogene (siLim1) in subcutaneous xenografted 786-O cells in nude mice. (A) qPCR quantification of the expression level of Lim-1 gene relative to the housekeeping gene 18S. Average results shown as mean \pm s.e.m., Untreated $n=4$, PDA-Nf/siCtl $n=5$, NF-siLim1 $n=6$; $**P<0.01$ from Ctl; $*P<0.05$ from siCtl (B) Western blot analysis of the expression level of the Lim-1 gene as compared to the actin protein. Each plot represents a pool of all tumor extracts from the same group.

Finally, we tested the efficacy of nanofibers to carry small interfering RNA *in vivo*. Nude mice bearing subcutaneous human 786-O tumors were treated by a single intraperitoneal injection of PDA-Nf/siLim ($n=6$) (targeting Lim-1 gene expression), PDA-Nf/siCtl ($n=5$) complexes or untreated ($n=4$). 48h after treatment, animals were euthanized and the tumors were harvested. Each tumor was cut in 2 parts, one for Western blot analysis, and the other part for RT-qPCR analysis. To avoid current problems of tumor heterogeneity, 6 extracts were processed for each part, and analyzed individually, as well as after having pooled the samples. RT-qPCR analysis showed a significant decrease of Lim-1 expression in PDA-Nf-siLim1 group compared to PDA-Nf/siCtl (see figure 5A; and ESI for statistical analysis). These results were confirmed by Western blot analysis on the pooled samples. We clearly observed a decrease of Lim-1 expression in PDA-Nf/siLim group compared to PDA-Nf/siCtl or untreated groups (Figure 5B, experimental details in ESI).

Conclusions

In the present work, we were able to show for the first time that PDA-Nfs can be promising delivery agents for siRNAs. Surfactant (1) allows for the generation of relatively small nanofibers that are able to internalize efficiently into cells. The PDA nanofibers associated with a siRNA targeting a reporter gene (luciferase gene in A549-Luc and 786-O-Luc cell lines) lead to a very efficient silencing.

In vitro, the PDA-NF-siLim1 efficiently silenced by more than 80% the expression of the Lim-1 oncogene in the 786-O human kidney cancer cell line. Furthermore, when administered intraperitoneally, the PDA-NFs has been able to deliver siRNA into subcutaneous located tumors.

Taken together, we found that PDA-Nfs are a promising new class of self-organized siRNA vectors.

Notes and references

This PDA-Nanofiber system is patented in 2016 under: EP16305367. We thank the Labex Medalis and FRM Foundation for post-doctoral grants for PN and SD. M.R. received financial doctoral support from the University of Strasbourg

- 1 M. E. Davis, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 659–668.
- 2 K. A. Howard, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 710–720.
- 3 A.-L. Bolcato-Bellemin, M.-E. Bonnet, G. Creusat, P. Erbacher and J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 16050–16055.
- 4 P. Neuberg and A. Kichler, *Adv. Genet.*, 2014, **88**, 263–288.
- 5 G. Creusat, J.-S. Thomann, A. Maglott, B. Pons, M. Dontenwill, E. Guérin, B. Frisch and G. Zuber, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2012, **157**, 418–426.
- 6 G. Creusat and G. Zuber, *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.*, 2008, **9**, 2787–2789.
- 7 L. C. Gomes-da-Silva, N. A. Fonseca, V. Moura, M. C. Pedrosa de Lima, S. Simões and J. N. Moreira, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 1163–1171.
- 8 S. Y. Wu, A. Singhanian, M. Burgess, L. N. Putral, C. Kirkpatrick, N. M. Davies and N. a. J. McMillan, *Gene Ther.*, 2011, **18**, 14–22.
- 9 G. Ozcan, B. Ozpolat, R. L. Coleman, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **87**, 108–119.
- 10 N. Mackiewicz, E. Gravel, A. Garofalakis, J. Ogier, J. John, D. M. Dupont, K. Gombert, B. Tavitian, E. Doris and F. Ducongé, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 2011, **7**, 2786–2792.
- 11 E. Gravel, B. Thézé, I. Jacques, P. Anilkumar, K. Gombert, F. Ducongé and E. Doris, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1955–1960.
- 12 E. Morin, M. Nothisen, A. Wagner and J.-S. Remy, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1916–1923.
- 13 P. Neuberg, A. Perino, E. Morin-Picardat, N. Anton, Z. Darwich, D. Weltin, Y. Mely, A. S. Klymchenko, J.-S. Remy and A. Wagner, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2015, **51**, 11595–11598.
- 14 M. Ripoll, P. Neuberg, A. Kichler, N. Tounsi, A. Wagner and J.-S. Remy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 30665–30670.
- 15 E. Morin, J.-M. Guenet, D. D. Díaz, J.-S. Remy and A. Wagner, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 12495–12500.
- 16 I. K. Kwon, J. P. Kim and S. J. Sim, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 1548–1553.
- 17 V. Dormoy, C. Béraud, V. Lindner, L. Thomas, C. Coquard, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Oncogene*, 2011, **30**, 1753–1763.
- 18 V. Dormoy, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder, *Anticancer Res.*, 2012, **32**, 3609–3617.

Synthèse de nano-vecteurs dérivés des polydiacétylènes pour la co-délivrance d'un ARN interférent et d'un anticancéreux

Résumé

La résistance des cellules tumorales aux médicaments a conduit à la recherche de nouveaux traitements. En nanomédecine, une nouvelle approche consiste à développer des vecteurs synthétiques pour co-délivrer au sein d'une cellule tumorale, un anticancéreux ainsi qu'un siARN, capable de supprimer l'expression d'une protéine impliquée dans les mécanismes de résistance.

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été consacrés à la synthèse de nano-vecteurs micellaires pour la délivrance simultanée de ces deux agents thérapeutiques. Une première partie décrit ainsi la synthèse et la formulation de micelles nanométriques diacétyléniques photopolymérisables conçues pour délivrer efficacement un siARN. Les propriétés d'encapsulation et de délivrance de ces micelles porteuses de têtes polaires histidines ont ensuite été étudiées *in vitro* et *in vivo* pour une application en thérapie combinatoire. Enfin, une dernière partie présente la fonctionnalisation par interaction électrostatique de ces vecteurs cationiques avec des anticorps préalablement modifiés par des oligonucléotides anioniques. Ce système original et versatile a permis de réaliser avec succès un ciblage actif des cellules tumorales.

Mots-Clefs : micelles, polydiacétylènes, siARN, anticancéreux, thérapie combinatoire, ciblage actif

Abstract

Multidrug-resistance (MDR) of cancer cells led to the investigation of new treatments. In the nanomedicine field, a new approach consists in developing synthetic vectors able to co-deliver into a cancer cell, an antitumoral drug and siRNAs that target protein(s) involved in MDR.

The work described in this manuscript was dedicated to the development of micellar nanovectors for the intracellular co-delivery of these two therapeutic agents. The first part details the synthesis and the formulation of nanometric photopolymerized diacetylenic micelles adapted for the delivery and intracellular release of the siRNA. Then, the encapsulation and delivery properties of these micelles, bearing histidine polar heads have been investigated *in vitro* and *in vivo* for the application of combination therapy. Finally, the last part presents the functionalization by electrostatic interaction of these cationic vectors with antibodies, priorly modified by anionic oligonucleotides. This original and versatile system allowed achieving an active targeting of tumoral cells.

Keywords: micelles, polydiacetylenes, siRNA, anticancer drug, combination therapy, active targeting