



HAL
open science

Etude des interactions d'acides nucléiques avec des biomacromolécules et des nanoparticules : application à la vectorisation

Frédéric Geinguenaud

► **To cite this version:**

Frédéric Geinguenaud. Etude des interactions d'acides nucléiques avec des biomacromolécules et des nanoparticules : application à la vectorisation. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCD097 . tel-02144543

HAL Id: tel-02144543

<https://theses.hal.science/tel-02144543>

Submitted on 30 May 2019

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.

UNIVERSITE PARIS 13
ECOLE DOCTORALE GALILEE

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris 13
Discipline: **Chimie Biomolécule**

Présentée et soutenue publiquement par

Frédéric Geinguenaud

Le 01 juillet 2015

Titre de la thèse

**Etude des Interactions d'Acides Nucléiques
avec des Biomacromolécules et des Nanoparticules
Application à la Vectorisation**

Directrice de thèse: Pr. L. Motte, Université Paris 13

Co-Directeur: Dr. Y. Lalatonne, Université Paris 13

Devant le Jury composé de:

M. José Courty	Dr., Université Paris Est	Rapporteur
Mme Nadine Millot	Pr., Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme Aline Percot	Dr., UPMC	Examinatrice
M. Gérard Perret	Pr., Université Paris 13	Examineur
Mme Laurence Motte	Pr., Université Paris13	Directrice de Thèse
M. Yoann Lalatonne	Dr., Université Paris 13	Co-Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, le Professeur Laurence Motte, de m'avoir accueilli dans son équipe ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée dans ce travail de thèse. Je lui sais gré de la patience dont elle a fait preuve tout au long de la rédaction de ce manuscrit et de ces encouragements constants. Je lui exprime à cette occasion toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier le Dr. Yoann Lalatonne, mon co-directeur de thèse, qui m'a formé, dans la bonne humeur, à la synthèse des nanoparticules de maghémite. Je le remercie aussi pour son soutien constant lors des pauses « clopes ».

J'adresse également mes remerciements au Professeur Vincent Lorent, directeur de l'Ecole Doctorale de l'Institut Galilée, pour la confiance qu'il m'a accordé et pour ces conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Nadine Millot et Monsieur José Courty pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi qu'à Madame Aline Percot et Messieurs Antoine Carpentier et Gérard Perret pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des personnes ayant collaboré à ce travail, parmi lesquelles Véronique Arluison, Rémi Fagard, Inès Souissi, Claire Banissi... Merci Inès de m'avoir enseigné les rudiments de la culture cellulaire et surtout pour ta gentillesse, ton dynamisme contagieux et ta disponibilité.

Je tiens également à remercier sincèrement tous ceux qui m'ont soutenu, poussé même parfois à reprendre des études. Ils sont nombreux à m'avoir donné confiance et se reconnaîtront. Parmi eux, il y a notamment : Jean, Dominique, An mais aussi Hervé, Shahla, Bei-Wen, Mohamed, Céline, Antonio, Maru, Belén...

Mes remerciements vont également à l'ensemble du CSPBAT. Merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide. Bien sur un merci particulier à la nanosphère : Farah, Erwann, Hicham, Irena, Caroline, Julie, Emilie, Sophie, Romain...

Merci à Cécile, Antoine, Jeanne et Margot. Cette fois c'est fini pour les études.

Sommaire

Remerciements.....
Sommaire
Liste des abréviations.....

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques	3

Chapitre 1.....	5
------------------------	----------

Acides Nucléiques et Vectorisation : Etat de l'Art	5
---	----------

I. LES ACIDES NUCLEIQUES	6
I.1. Oligonucléotides Antisens et Antigène	10
I.2. ARN interférents : siRNA, miRNA, shRNA.....	14
I.3. Les aptamères.....	16
I.4. Oligonucléotides leurres, Oligonucléotides CpG	20
II. LE TRANSPORT DES ACIDES NUCLEIQUES (VECTORISATION).....	21
II.1. Electroporation et techniques mécaniques	22
Electroporation.....	22
Laserfection/optoinjection.....	23
Sonoporation.....	24
Bombardement par des particules (Biolistique)	25
II.2. Vecteurs synthétiques cationiques de nature lipidique ou polymérique	26
Les vecteurs de nature lipidique	28
Les vecteurs de nature polymérique	30
Les vecteurs hybrides lipides-polymères.....	32
III. INTERET BIOMEDICAL DES NANOPARTICULES A cœur INORGANIQUE.....	34
III.1. Nanoparticules à cœur inorganique et vectorisation	34
III.2. Nanoparticules à cœur inorganique et ciblage	36
III.3. Utilisation des propriétés physiques des nanoparticules à cœur inorganique.....	39
Références bibliographiques.....	45

Chapitre 2.....	56
Interactions Acides Nucléiques et Protéines: Deux Etudes Structurales	56
I. Introduction : L'ARN non-codant DsrA et la protéine Hfq	57
I.1 La protéine Hfq.....	58
I.2 L'ARN non-codant DsrA.....	59
II ETUDE DE L'AUTO-ASSOCIATION DE DsrA PAR SPECTROSCOPIE UV ET FTIR	61
II.1 Séquence A8	65
II.2 Séquence C14	69
II.3 Séquence A22	73
II.4 Un modèle pour DsrA.....	76
III. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE FTIR DE L'INTERACTION DE Hfq AVEC UN ADN DOUBLE BRIN.....	80
III.1. Spectre Infra Rouge du complexe dA ₂₀ -dT ₂₀ -Hfq.....	80
III.2. Ouverture partielle de la double-hélice dans le complexe	82
III.3. Conformation des thymidines.....	83
III.4. Conformation des sucres : mise en évidence de changements structuraux.....	85
Références bibliographiques.....	87
Chapitre 3.....	90
Ciblage de STAT3 par un Oligonucléotide Leurre	90
I. PRESENTATION DE STAT3 : INTERET DE CIBLER STAT3	91
I.1. Rôle physiologique de STAT3 et son implication dans l'oncogenèse.....	91
I.2. Structure et mode d'action de STAT3	92
I.3. Stratégie d'inhibition de STAT3 : choix de l'oligonucléotide leurre	93
II. CONCEPTION, SYNTHÈSE DU VECTEUR	95
II.1. Conception et originalité du vecteur.....	95
II.2. Synthèse du vecteur	97
II.2.1. Synthèse des nanoparticules de maghémite	97
II.2.2. Complexation de l'oligonucléotide.....	99
III. DETERMINATION DU NOMBRE D'OLIGONUCLEOTIDES PAR NANOPARTICULE.....	101
III.1. Etude des surnageants	101
III.2. Etude des complexes.....	103
III.2.1. Diamètre Hydrodynamique et Potentiel Zêta	103
III.2.2. Détermination de la charge en oligonucléotide.....	104
Etude par spectroscopie UV-Visible	104

Etude par spectroscopie de fluorescence	106
III.3. Evaluation théorique de la charge maximale en oligonucléotide	109
IV. ETUDE STRUCTURALE DE L'OLIGONUCLEOTIDE A LA SURFACE DE LA NANOPARTICULE	112
IV.1. Etude par spectroscopie IRTF	112
IV.2. Etude par spectroscopie d'absorption UV	116
V. EVALUATION BIOLOGIQUE DU VECTEUR	117
V.1. Stabilité des complexes dans le sérum	117
V.2. Quantification de l'internalisation des particules dans des cellules SW480.....	119
V.2.1. Effet d'un champ magnétique et de la concentration en particule.....	120
V.2.2. Effet du temps d'incubation.....	123
V.3. Activité biologique des vecteurs	126
V.3.1. Inhibition de la translocation nucléaire de STAT3	126
V.3.2. Induction de l'apoptose	128
Références bibliographiques.....	130
Chapitre 4.....	134
Fonctionnalisation de Nanoparticules par un Oligonucléotide Phosphorothioate	134
et un Peptide Cationique.....	134
I. INTRODUCTION	135
I.1. Contexte	135
I.2. Description de l'oligonucléotide.....	135
II. COMPORTEMENT DE L'OLIGONUCLEOTIDE A PH ACIDE.....	136
II.1. Influence du pH acide sur la structure de l'oligonucléotide Li28.....	136
II.2. Etude de la dégradation de Li28 à pH acide.....	138
II.2.1. Etude par spectroscopie UV	138
II.2.2. Etude par spectroscopie IRTF.....	141
II.2.3. Etude par électrophorèse.....	144
III. COMPLEXATION DE Li28 SUR DES PARTICULES DE MAGHEMITE	146
III.1. Fonctionnalisation	146
III.2. Caractérisation des complexes et des surnageants	147
III.2.1. Caractérisation des surnageants	147
III.2.2. Caractérisation des complexes.....	148
Spectres UV-Visibles des complexes	148
Diamètre hydrodynamique et potentiel Zêta	149

III.3. « Décrochage » de Li28 et étude de la dégradation.....	150
IV. COMPLEXATION DE Li28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIE PAR ETAPES	152
IV.1. Le peptide Arg ₁₅	152
IV.2. Fonctionnalisation de la surface par une stratégie dite par étape	153
IV.3. Caractérisation des complexes et des surnageants	153
IV.3.1. Spectres UV-Visibles des surnageants	153
IV.3.2. Spectres de fluorescence des complexes et des surnageants	154
V. INTERCALATION D'UNE COUCHE DE POLY-L-ARGININE : STRATEGIE D'ASSEMBLAGE COUCHE PAR COUCHE	157
V.1. Fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite par la Poly-L-Arginine	157
V.2. Fonctionnalisation des complexes γ -Fe ₂ O ₃ @PolyR par Li28 et Arg ₁₅	159
V.2.1. Fonctionnalisation par Li28	159
V.2.2. Fonctionnalisation par Arg ₁₅	159
V.3. Internalisation des complexes par des macrophages (RAW 264.7).....	163
V.3.1. Visualisation par microscopie de fluorescence.....	163
V.3.2. Quantification par MIAtek	164
VI. COMPLEXATION DE Li28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIE EN UNE SEULE ETAPE ..	166
VI.1. Fonctionnalisation des nanoparticules	166
VI.2. Caractérisation des nanoparticules.....	167
VI.3. Internalisation des complexes par des macrophages (RAW 264.7).....	170
VI.3.1. Visualisation par microscopie de fluorescence.....	170
VI.3.2. Quantification par MIAtek	171
Références bibliographiques.....	172
Conclusion Générale	175
Annexes	179
ANNEXE I.....	179
I. Expériences UV	179
II. Oligonucléotides et protéine Hfq	179
DsrA	179
dA ₂₀ -dT ₂₀ -Hfq	180
III. Expériences infrarouge.....	180
DsrA	180

dA ₂₀ -dT ₂₀ -Hfq	181
Références bibliographiques	181
ANNEXE II.....	182
I. Étude des acides nucléiques et des protéines par spectroscopie infrarouge	182
Région de 1750 à 1500 cm ⁻¹	182
Région de 1500 à 1250 cm ⁻¹	182
Région de 1250 à 1000 cm ⁻¹	182
Région de 1000 à 750 cm ⁻¹	183
II. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (TEM)	183
III. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS)	183
Références bibliographiques	185
ANNEXE III.....	186
I. COLORATION DE PERLS	186
II. COLORATION AU DAPI.....	186
III. DETECTION DE LA MORTALITE CELLULAIRE	186

Liste des abréviations

- 5'UTR** : 5' Untranslated region
6-FAM : 6 Carboxyfluorescein
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : Acide ribonucléique interférent
ARNm : ARN messenger
ARNnc : Acide ribonucléique non-codant
BET : Bromure d'éthidium
C.M.C. : Concentration micellaire critique
CpG-ODN : CpG oligodeoxynucleotide
CT : Computed Tomography
DAPI: 4',6-Diamino-2-phenylindole
DBD: DNA binding domain
DH : Diamètre hydrodynamique
DMA : Diméthylamine
DMSA : Dimercaptosuccinic acid
DNA : Deoxyribonucleic acid
DNase : Désoxyribonucléase
D.O. : Densité optique
DOGS : Dioctadecylamidoglycylspermine
DOPC : 1,2-dioleoyl-3-phosphatidylcholine
DOPE : 1,2-dioleoyl-3-phosphatidylethanolamine
DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTAP : 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)-propane
DOTMA : N-[2,3-(dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DTAB : Dodecyltrimethylammonium bromide
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EPR : Enhanced permeability and retention
FDA : Food and drug administration (US)
Fe(DS)2 : Di-dodécylsulfate de fer II
FR : Folate receptor
GRPR : Gastrin-releasing peptide receptor
IFN γ : Interféron gamma
IL : Interleukine
IR : Infrarouge
IRM : Imagerie par resonance magnétique
IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier

LDL : Low density lipoprotein
MET : Microscopie électronique en transmission
miRNA : Micro-ribonucleic acid
ncRNA : Non-coding ribonucleic acid
NP : Nanoparticule
OGM : Organisme génétiquement modifié
PAMAM : Poly(amido-amine)
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PdI : Polydispersity index
PEI : Poly(éthylène-imine)
PEG : Polyéthylène glycol
PPI : Poly(propylène-imine)
PolyR : Poly-L-arginine
RBS : Ribosome binding site
RISC : RNA Induced Silencing Complex
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RNA : Ribonucleic acid
RNase : Ribonucléase
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SELEX : Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA : Small interfering ribonucleic acid
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
SVF : Sérum de veau foetal
TAMRA : 5(6)-carboxytetramethylrhodamine
TBE : Tris-Borate-EDTA
TfR : Transferrin receptor
TLR9 : Toll-like receptor 9
T_K : Temperature de Krafft
T_m : Temperature of melting
uPAR : Urokinase plasminogen activator receptor
UV : Ultraviolet
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
Z : Potentiel zêta

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la formation professionnelle continue. Après avoir intégré, en 1995, un laboratoire de spectroscopie des biomolécules en tant que technicien, l'opportunité m'a été donnée, en 2005, de reprendre des études afin de développer mes compétences. Ce parcours m'a conduit à l'obtention, en 2008, d'un Master à finalité recherche dans la spécialité « Biomolécules et Thérapies expérimentales ». Suite à mon arrivée, en 2009, au Laboratoire CSPBAT (Chimie, Structure, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques), j'ai entamé une reconversion thématique dans le domaine de la synthèse et la fonctionnalisation de nanoparticules qui a conduit à cette thèse intitulée « Acides Nucléiques : Etude des Interactions avec des Biomacromolécules et des Nanoparticules - Vectorisation » sous la direction du Pr. L. Motte et la codirection du Dr. Y. Lalatonne.

La découverte de l'acide désoxyribonucléique (ADN) remonte à la fin du 19^{ème} siècle avec notamment les premiers travaux effectués par J.F. Miescher et R. Altman.⁽¹⁾ Les travaux poursuivis tout au long de la première partie du 20^{ème} siècle par des chercheurs comme A. Kossel P. Levene et E. Chargaff ont conduit à la caractérisation de la structure primaire des acides nucléiques.⁽¹⁾ Malgré la simplicité apparente de la double hélice, les acides nucléiques sont extrêmement complexes d'un point de vue conformationnel et peuvent s'adapter structurellement à des modifications locales de l'environnement cellulaire. C'est seulement à partir des années 1950 que la structure secondaire des acides nucléiques a commencé à être élucidée par diffractométrie de rayons X sur des fibres d'ADN suites aux clichés de R.E. Franklin exploités par M. Wilkins, J.D. Watson et F.H.C. Crick.⁽²⁾ Depuis, l'étude de la structure des acides nucléiques par cristallographie ainsi que par différentes techniques spectroscopiques (RMN, IR, UV...) a permis de faire avancer notre compréhension sur la régulation de l'expression des gènes et sur la manière d'intervenir dans ces processus.

Depuis la découverte il y a une quarantaine d'année qu'un oligonucléotide antisens pouvait inhiber la réplication virale^(3, 4), le concept de l'utilisation d'un acide nucléique synthétique à des fins thérapeutiques n'a cessé de susciter enthousiasme et créativité. Des efforts constants dans ce domaine ont permis le développement clinique d'oligonucléotides de plus en plus

sophistiqués ce qui a conduit à l'autorisation par la « Food and Drug Administration » (FDA) de l'utilisation du Vitravene (1998), du Macugen (2004) et plus récemment du Kynamro (2013), 3 oligonucléotides synthétiques. Cependant, malgré ces résultats encourageants, les acides nucléiques ne sont pas encore entièrement reconnus comme des agents thérapeutiques efficaces et se heurtent à plusieurs obstacles majeurs tels que la spécificité d'action, le mode d'administration ou encore les risques d'effets secondaires. Ainsi leur faible efficacité à pouvoir circuler dans l'organisme et à atteindre leur cible sans avoir subi de dégradation est encore un frein majeur au développement clinique de l'ADN médicament.

Pour répondre à ces enjeux de nombreux vecteurs ont été mis au point afin de permettre à un acide nucléique d'atteindre sa cible cellulaire tout en ayant conservé son intégrité. Un vecteur optimal doit pouvoir remplir ce rôle avec une grande efficacité et une toxicité intrinsèque la plus faible possible. A l'heure actuelle, hormis les vecteurs viraux, la plupart des vecteurs synthétiques ne sont pas encore capable de transporter efficacement leur charge à travers les multiples barrières de l'organisme.⁽⁵⁾

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude, par spectroscopie optique, des interactions que peuvent avoir des acides nucléiques entre eux ou avec des surfaces de différentes natures telles que des protéines ou des nanoparticules inorganiques. L'étude des interactions électrostatiques entre un acide nucléique et une particule d'oxyde de fer nous a conduits au développement d'un nano-vecteur pouvant transporter un oligonucléotide à l'intérieur de cellules en culture.

Après quelques rappels sur la structure des acides nucléiques, nous aborderons dans le premier chapitre, différentes stratégies permettant d'utiliser un oligonucléotide dans une approche thérapeutique. Nous verrons ainsi comment les stratégies antisens, antigène, les acides ribonucléiques interférents (ARNi), les aptamères, les oligonucléotides leurres ou encore CpG peuvent intervenir dans le développement de nouveaux médicaments. Nous décrirons ensuite brièvement quelques-unes des méthodes physiques mises au point pour transporter ces acides nucléiques au sein de cellules en culture ou d'un organisme vivant. Enfin nous aborderons dans une dernière partie la conception et l'utilisation des vecteurs synthétiques et plus particulièrement l'apport des nanoparticules à cœur inorganique à la vectorisation des acides nucléiques.

Le second chapitre, qui reprend un travail commencé dans un précédent laboratoire de rattachement, est consacré dans sa première partie à l'étude structurale de l'auto-association

de DsrA, un petit ARN non-codant (ARNnc). Cet ARN, en association avec la protéine Hfq, une protéine de structure torique d'environ 7 nm de diamètre, est impliqué dans des mécanismes de réponse au stress chez la bactérie *E. Coli*. La deuxième partie du chapitre décrit les interactions entre Hfq et une double hélice d'ADN.

Dans le troisième chapitre nous décrivons la complexation d'un oligonucléotide leurre à la surface d'une nanoparticule d'oxyde de fer de 10 nm de diamètre. Après avoir mis au point un protocole de complexation basé sur les interactions électrostatiques entre la particule et l'acide nucléique, nous avons testé ce vecteur sur des cellules en culture et étudié l'action de l'oligonucléotide leurre sur sa cible cellulaire.

Le dernier chapitre s'inscrit dans la continuité de l'étude précédente avec comme objectif la généralisation de la méthode de complexation mise au point en associant sur une même nano-plateforme un oligonucléotide phosphorothioate ayant des propriétés chimiques différentes et un peptide cationique constitué de 15 arginines.

Références bibliographiques

1. Schalchli L, Grange T, Hänni C, Morange M. L'ADN. *La Recherche* **2006**; 398: 75.
2. Maddox B. The double helix and the « wronged heroine ». *Nature* **2003**; 421: 407-408.
3. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 280-284.
4. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 285-288.
5. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**; 15: 541-555.

Chapitre 1

Acides Nucléiques et Vectorisation : Etat de l'Art

I. LES ACIDES NUCLEIQUES

II. LE TRANSPORT DES ACIDES NUCLEIQUES (VECTORISATION)

III. INTERET BIOMEDICAL DES NANOPARTICULES A CŒUR INORGANIQUE

Les acides nucléiques constituent en tant que support de l'information génétique une cible et un outil intéressant dans le traitement de certaines pathologies. La maîtrise de la synthèse des oligonucléotides a conduit au développement de nombreuses stratégies permettant de transporter un acide nucléique exogène vers des zones visées spécifiquement. Après une brève description structurale des acides nucléiques, nous présenterons dans ce chapitre certaines des stratégies élaborées dans le but de modifier l'expression d'un gène.

I. LES ACIDES NUCLEIQUES

A l'état naturel, il existe deux grandes catégories d'acides nucléiques : les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN). Le génome est porté par l'ADN des chromosomes situés dans le noyau des cellules eucaryotes. Un gène est constitué d'une région « codante » et de régions « régulatrices ». La région codante est celle qui est transcrite en ARN dans le noyau de la cellule par l'intermédiaire d'une enzyme, l'ARN polymérase. Après avoir subi des étapes de maturation, l'ARN messager (ARNm) migre vers le cytoplasme où il est traduit en protéines grâce aux ribosomes. La transcription des gènes et par conséquent la production de protéines sont régulées au sein des organismes vivants par des protéines de liaison à l'ADN que l'on appelle des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription se fixent aux régions régulatrices des gènes qu'ils contrôlent en activant ou réprimant leur transcription. La structure d'un brin d'ADN est schématisée **Figure 1**.

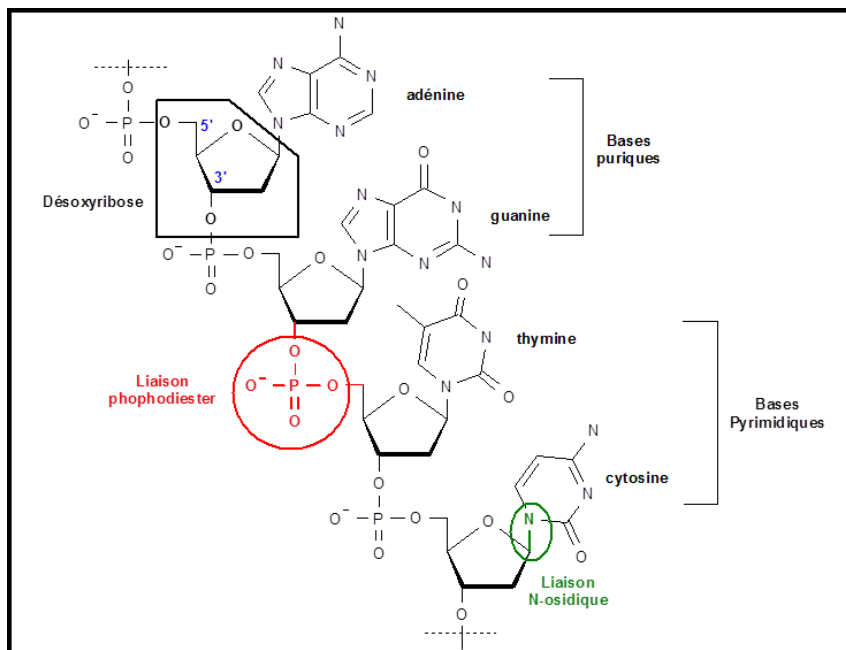


Figure 1: Schéma d'un brin d'ADN.

Le squelette des acides nucléiques est composé de sucres, désoxyribose pour l'ADN et ribose pour l'ARN, reliés entre eux par un pont phosphodiester au niveau des carbones 3' et 5' de deux motifs consécutifs. Sur chaque sucre est attachée une base azotée par l'intermédiaire d'une liaison N-osidique (**Figure 1**). Le motif composé d'une base azotée et d'un sucre est appelé un nucléoside. Lorsque le nucléoside est lié à un ou plusieurs phosphates on parle alors d'un nucléotide. Les bases azotées des acides nucléiques sont classifiées en deux catégories : les bases pyrimidiques (pyrimidines), cytosine, thymine et uracile, constituées d'un hétérocycle à 6 atomes et les bases puriques (purines), adénine et guanine, constituées de deux noyaux hétérocycles accolés. La complémentarité des bases, possibilité de former des liaisons hydrogène entre elles, permet l'association (hybridation) de deux brins d'ADN : une adénine étant appariée à une thymine et une guanine à une cytosine (**Figure 2**). C'est l'ordre d'enchaînement des bases azotées, appelé la séquence nucléotidique ou encore la structure primaire, qui détermine l'information génétique.

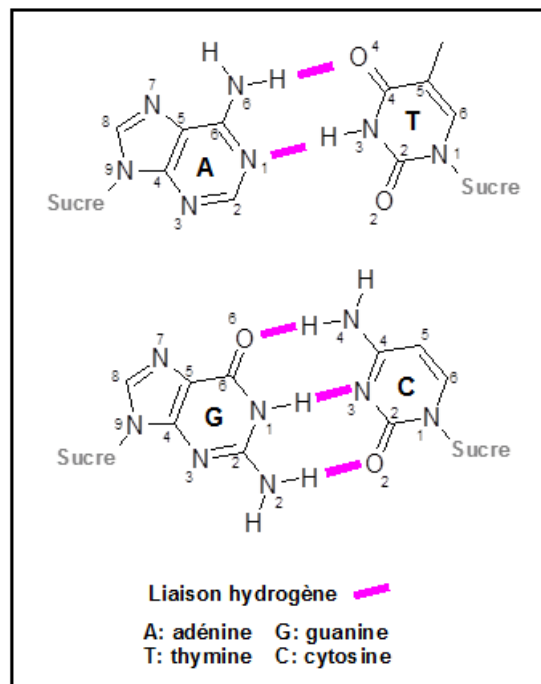


Figure 2: Schéma d'appariement de type Watson-Crick.

D'un point de vue de la structure primaire, l'ARN diffère de l'ADN de par la nature du sucre puisque le désoxyribose est remplacé par un ribose. De plus les thymines présentes dans l'ADN sont absentes dans l'ARN où elles sont substituées par l'uracile (**Figure 3**). D'un point de vue fonctionnel, les ARN ont longtemps été considérés comme de simples intermédiaires

entre l'information génétique portée par l'ADN dans le noyau et la synthèse protéique qui a lieu dans le cytoplasme. C'est le cas des ARN codants comme les ARNm mais aussi d'ARN non-codants tels que les ARN ribosomiques ou les ARN de transfert. Dans les années 1980 le rôle catalytique des ARN a été révélé et depuis de nombreux ARN non-codants ont été découverts, chacun ayant des fonctions bien précises, ce qui a ouvert la porte au concept de l'interférence ARN à la fin des années 1990.

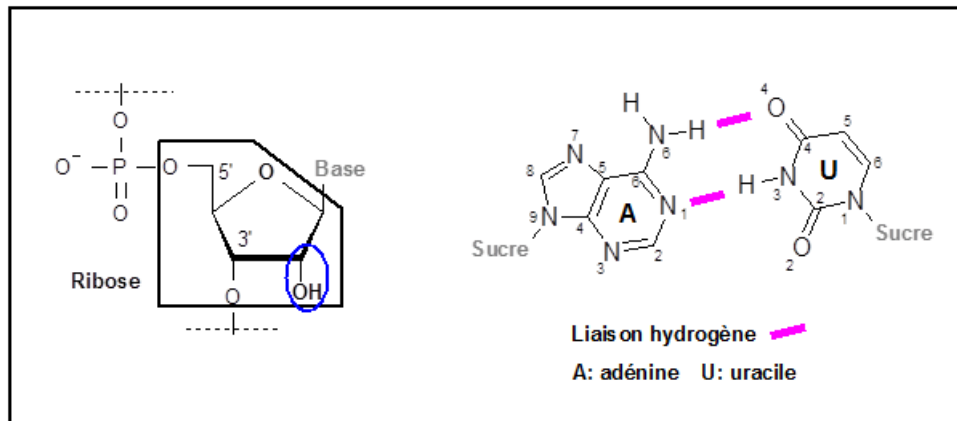


Figure 3: Particularités des ARN.

Le plus souvent, l'ADN se présente sous la forme d'une double hélice constituée par deux brins enroulés l'un autour de l'autre et associés deux à deux par des liaisons hydrogène entre les bases. Cette double hélice possède une structure tridimensionnelle particulière organisée autour de l'axe de l'hélice. Dans une double hélice, les bases sont empilées au centre de la structure alors que la chaîne phosphodiester chargée négativement est présentée à la périphérie de l'hélice. On distingue principalement deux grandes familles d'hélice : l'hélice de type B observée pour la plupart des ADN et l'hélice de type A que l'on rencontre dans les ARN (**Figure 4**). Il existe d'autres types d'hélices plus minoritaires dont l'ADN de type Z qui ne seront pas abordés dans ce manuscrit. La structure macroscopique de la double hélice est fortement influencée par la conformation adoptée par les sucres. Dans une hélice de type B les sucres adoptent une conformation majoritaire *C2'-endo* encore appelée Sud (S) alors que dans une hélice de type A ils sont de type *C3'-endo* ou encore Nord (N) (**Figure 4**). Il existe un équilibre conformationnel entre ces deux formes ; le conformère majoritaire étant influencé par le substituant en C2' mais aussi par différentes conditions expérimentales telles que le taux d'hydratation ou la présence de certains sels métalliques. Ainsi dans un ADN, la forme majoritaire est la forme S mais le désoxyribose étant relativement flexible il peut aussi

adopter une forme N totale ou partielle lorsque l'humidité relative diminue. Par contre dans les ARN, la présence du groupement hydroxyle en C2' va bloquer la conformation en C3'-endo. Les contraintes spécifiques amenées par la conformation des sucres ont des conséquences sur la morphologie de la double hélice et sur son accessibilité modifiant ainsi sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec des petites molécules ou des protéines (*Figure 4*).

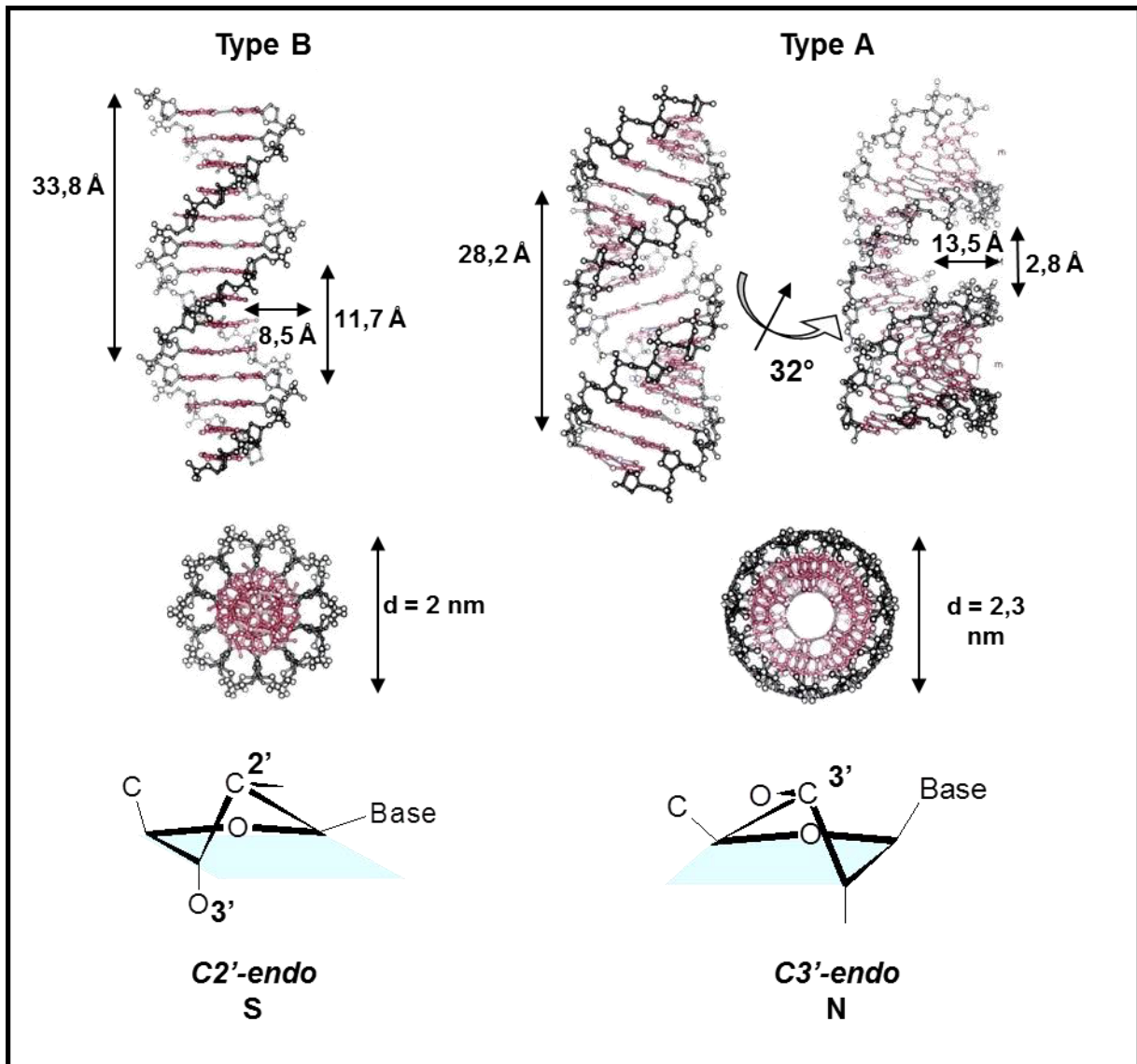


Figure 4: Différents types d'hélice et conformations des sucres.

I.1. Oligonucléotides Antisens et Antigène

Un oligonucléotide est un court fragment d'acide nucléique constitué de quelques dizaines de nucléotides. De par sa nature, il peut s'hybrider avec l'ADN génomique ou un ARN messager de séquence complémentaire. La découverte, en 1978 par Zamecnik et Stephenson qu'un oligonucléotide pouvait inhiber la réplication du virus du sarcome de Rous a ouvert la voie à de nombreux travaux sur les oligonucléotides antisens.⁽¹⁻²⁾

Les oligonucléotides antisens sont conçus pour s'apparier de manière spécifique avec un ARN messager. L'appariement va induire une inhibition de l'ARNm soit par un blocage physique de la traduction soit par action de la ribonucléase H (RNase H) une enzyme présente chez la majorité des organismes vivants (**Figure 5**). La première voie d'inhibition fait suite à la formation d'une structure hybride, en double hélice, entre l'oligonucléotide et l'ARNm qui provoque un encombrement stérique empêchant ainsi la fixation du ribosome sur l'ARNm et la traduction de ce brin en protéine. La deuxième voie d'inhibition implique l'action de la RNase H, qui a la particularité de dégrader les ARN lorsque ceux-ci sont engagés dans une double hélice hybride ADN-ARN. Suite à l'action de l'enzyme, l'ARNm est dégradé et ne peut être traduit en protéine ; l'oligonucléotide antisens est alors libéré et peut continuer à jouer son rôle d'inhibiteur en se fixant à nouveau sur un autre ARNm.

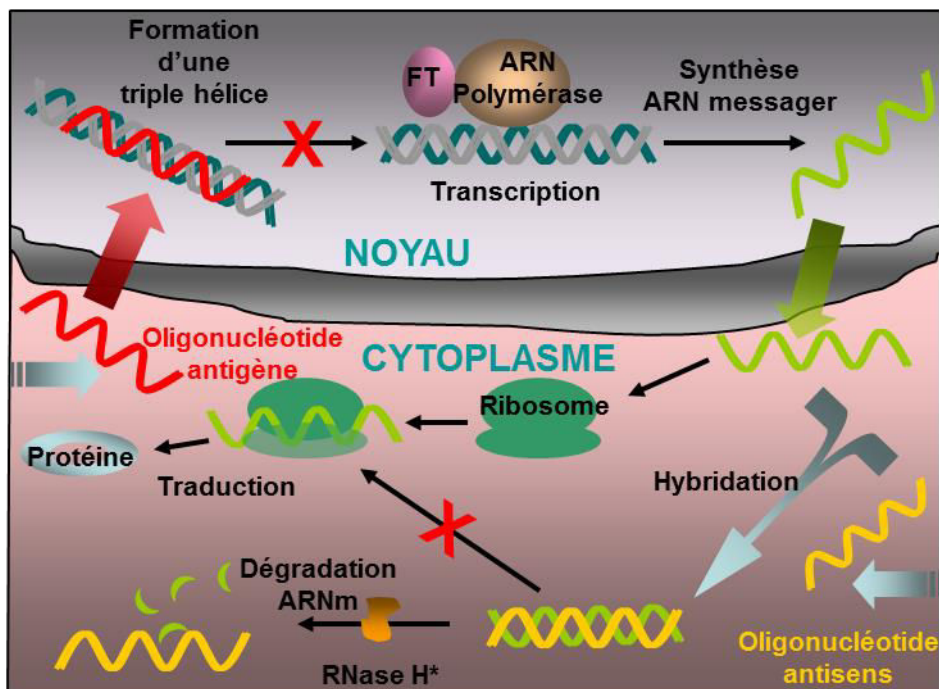


Figure 5: Mode de fonctionnement des oligonucléotides antigène et antisens.

(*La RNase H est observée dans le cytoplasme et dans le noyau)

Le premier oligonucléotide antisens dont l'utilisation a été approuvée par la FDA (US Food and Drug Administration) en 1998 est le Fomivirsén commercialisé sous le nom de VitraveneTM par la société Isis Pharmaceuticals. Cet oligonucléotide composé de 21 nucléotides (5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3') fait partie de la première génération des agents antisens et a subi des modifications au niveau du squelette phosphodiester pour pouvoir résister à la dégradation par les nucléases. Il s'agit d'un oligonucléotide phosphorothioate dont l'un des oxygènes, non engagé dans le pont phosphodiester, est remplacé par un atome de soufre (**Figure 6**). Il est formulé sous la forme d'une solution saline injectable. Il a été autorisé par la FDA dans le cadre du traitement local de rétinites à cytomégalovirus chez des patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui ne répondent pas ou qui sont intolérants aux autres traitements.

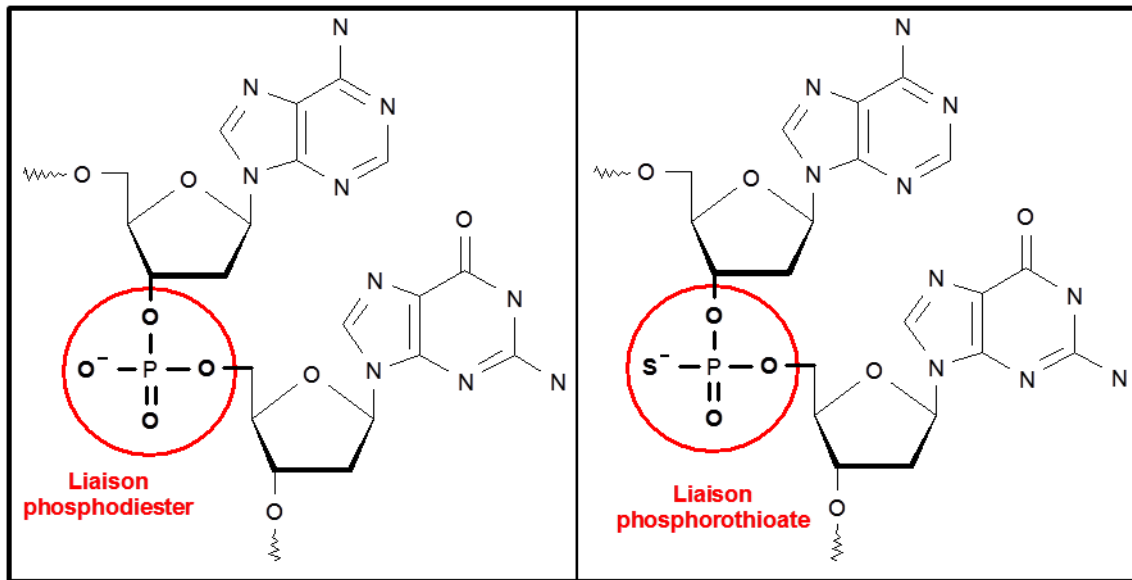


Figure 6: Squelette Phosphodiester/Phosphorothioate.

Récemment, le 29 janvier 2013, la même société, en collaboration avec Genzyme une filiale du groupe Sanofi, a obtenu l'approbation de la FDA pour un autre agent antisens, le mipomersen, sous le nom commercial de KYNAMROTM. Comme pour le Fomivirsén il s'agit d'une formulation saline injectable dont le principe actif, le mipomersen, est un oligonucléotide composé de 20 nucléotides (5'-GC*C* U*C*A GTC* TGC* TTC* GC*A C*C* -3') avec un squelette phosphorothioate. De plus, toutes les cytosines ainsi que l'uracile sont méthylées en position C5 et les sucres des 5 premiers et cinq derniers nucléotides sont modifiés en C2' par un groupement 2'-O-(2-méthoxyéthyle) (**Figure 7**). Cet oligonucléotide modifié va pouvoir former un duplex (une structure en double hélice) avec l'ARNm de

l'apolipoprotéine B une protéine cible dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote. L'hypercholestérolémie familiale homozygote est une maladie génétique rare caractérisée par l'incapacité de l'organisme à éliminer le cholestérol LDL, « Low Density Lipoprotein » ou « mauvais » cholestérol, ce qui entraîne son accumulation à des concentrations anormalement élevées dans le sang. Aux Etats-Unis, cette maladie est une indication orpheline qui touche environ un patient sur un million. Pour les patients qui en sont atteints, les infarctus du myocarde et les décès surviennent souvent avant 30 ans. Le mipomersen est un antisens de 2^{ème} génération pour lequel des modifications chimiques de l'oligonucléotide ont été apportées par rapport au phosphorothioate de 1^{ère} génération. La méthylation des cytosines a été introduite afin de diminuer les effets immunitaires indésirables comme on peut le voir pour des oligonucléotides contenant le motif dinucléotidique CpG (cf paragraphe I.4).⁽³⁾ De plus, la modification du sucre, qui consiste à remplacer l'hydrogène en C2' du désoxyribose par un groupement 2'-O-(2-méthoxyéthyle), induit une conformation C3'-endo du sucre et un passage de l'hélice en forme A, permettant ainsi d'augmenter la stabilité du duplex formé et donc l'affinité de l'oligonucléotide antisens pour l'ARNm cible.⁽⁴⁾

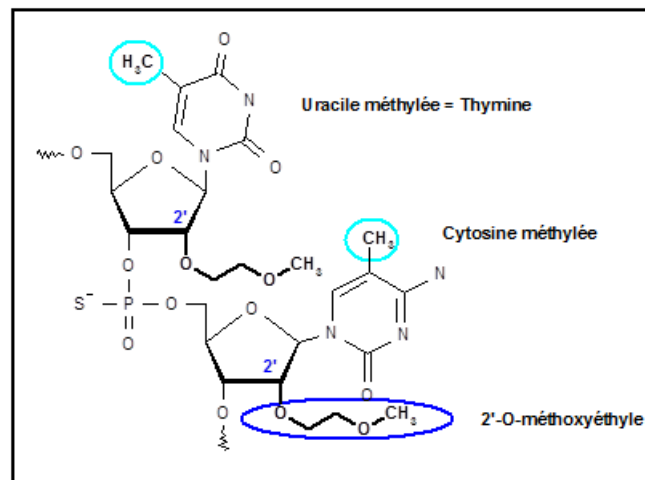


Figure 7: Modification des sucres 2'-O-(2-méthoxyéthyle).

Ces résultats sont très encourageants puisqu'il s'agit du premier médicament antisens systémique contrairement au Vitravene qui était injecté localement. Il faut toutefois noter qu'en raison du risque d'hépatotoxicité, Kynamro n'est disponible que dans le cadre d'un programme restreint faisant partie d'une stratégie d'évaluation et d'atténuation des risques (Risk Evaluation Mitigation Strategy), appelée KYNAMRO REMS. Le traitement est restreint aux patients présentant un diagnostic clinique ou biologique compatible avec une

hypercholestérolémie familiale homozygote et n'a pas été évalué pour d'autre type d'hypercholestérolémie. De plus, les patients doivent effectuer un dosage de leurs enzymes hépatiques avant de commencer le traitement et régulièrement par la suite. L'agence européenne du médicament (European Medicines Agency, EMA) a d'ailleurs renouvelé en mars 2013 son refus de commercialisation du médicament sur le sol européen. Les raisons de la toxicité hépatique de cet oligonucléotide chez certains patients sont sûrement multiples mais une raison invocable est liée à la nature de la modification du lien internucléotidique. Les phosphorothioates ont été introduits par ce qu'ils sont plus résistants aux nucléases que les groupements phosphates. Cependant la dégradation à quand même lieu, bien que plus lente, et les monomères qui sont relargués portent un groupement phosphorothioate libre qui lui est potentiellement toxique par libération d'un radical soufre S \cdot .⁽⁵⁻⁶⁾

Bien que des résultats encourageants soient sortis des études cliniques et précliniques et que des progrès significatifs aient été obtenus dans le développement d'oligonucléotides antisens de plus en plus sophistiqués, ils ne sont pas encore entièrement reconnus comme des agents thérapeutiques efficaces. Plusieurs obstacles majeurs tels que la spécificité, le mode d'administration ou encore la diminution des effets secondaires doivent être levés avant d'envisager une utilisation étendue des oligonucléotides comme médicament. De plus, le nombre de copie, de même que le taux de renouvellement et de production d'un ARNm au sein d'une cellule, vont varier en fonction du type de gènes et de cellules concernés. Du fait de la diversité des gènes et des types cellulaires, il existe peu de données générales. Cependant on estime que le nombre de copie d'un ARNm est compris entre 10 et 10000 par cellule. Ainsi il a été montré que dans des fibroblastes en culture, il y a environ 2000 à 3000 copies de l'ARNm codant pour la β -actine dans une seule cellule.⁽⁷⁾ On voit bien que selon l'ARNm ciblé, il faudra plus ou moins d'oligonucléotide pour une même efficacité et que cela aura un impact sur les effets secondaires en fonction de la concentration requise pour bloquer la traduction. Pour pallier à ce dernier obstacle une autre stratégie dite « antigène » peut-être mise en place. Dans cette approche, on utilise un oligonucléotide simple brin qui cette fois va aller cibler directement le gène responsable d'un dysfonctionnement. L'oligonucléotide antigène va former une triple hélice, en interagissant de façon spécifique avec une séquence d'ADN double brin dans la région promotrice du gène, bloquant ainsi sa transcription (**Figure 5**).⁽⁸⁻⁹⁾ Le nombre de copies d'un gène dans une cellule étant, la plupart du temps, très limité par rapport au nombre d'ARNm, on conçoit aisément l'avantage apporté par cette stratégie.

I.2. ARN interférents : siRNA, miRNA, shRNA

Le phénomène d'interférence ARN (ARNi) a été découvert à la fin des années 1990, suite à des travaux effectués sur un ver de l'embranchement des nématodes, *Caenorhabditis elegans*.⁽¹⁰⁾ C'est ainsi que depuis quelques années un nouveau monde de petits ARN non codants a été mis au jour. En particulier les micro-ARN (miRNA) et les petits ARN interférents (small interfering RNA, siRNA) qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes et permettent de réprimer la synthèse protéique. Etant donné l'implication des protéines dans de nombreuses maladies, on peut envisager l'utilisation thérapeutique des ARNi dans des applications telles que les maladies génétiques, les maladies auto-immunes, le cancer ou encore les maladies virales. L'un des intérêts majeurs des ARN interférents est qu'ils utilisent une machinerie naturelle de la cellule qui est fonctionnelle dans toutes les cellules de tous les mammifères. De plus, c'est un mécanisme extrêmement spécifique puisqu'il est fondé sur la complémentarité des bases des acides nucléiques.

L'interférence ARN est un mécanisme de régulation présent dans la plupart des cellules des eucaryotes qui utilise des courtes séquences d'ARN appariées en double brin afin de contrôler l'activité d'un gène. Un schéma récapitulatif des mécanismes d'interférence ARN est présenté **Figure 8**.

Les micro-ARN sont des substrats endogènes pour le mécanisme d'interférence ARN. Ils sont produits dans le noyau à partir de gènes qui leurs sont propres. Ils sont initialement exprimés sous la forme d'un long transcrit primaire le pri-miRNA constitué d'environ 500 à 3000 bases. Ces ARN présentent des motifs intra-chaînes partiellement complémentaires qui leurs permettent d'adopter localement une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux (hairpin). Ils sont ainsi pris en charge par un complexe protéique, Drosha/DGCR8, qui effectue une série de coupures de façon à ne conserver que la partie hairpin.⁽¹¹⁾ L'ARN ainsi obtenu, le pre-miRNA, constitué d'environ une centaine de nucléotides, est alors pris en charge par une exportine et transporté dans le cytoplasme. Arrivé dans le cytoplasme une seconde ribonucléase, Dicer, va éliminer la boucle de l'hairpin, réduire encore quelques séquences non appariées et un simple brin qui est appelé le miRNA mature, d'environ 20 à 25 nucléotides, va être libéré.⁽¹²⁾ Cet ARN s'associe alors à un nouveau complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex) et se dirige vers l'ARNm cible.⁽¹³⁻¹⁴⁾ L'appariement même imparfait entre le miRNA et l'ARN messager va conduire à la répression de la traduction et ainsi bloquer la synthèse protéique.

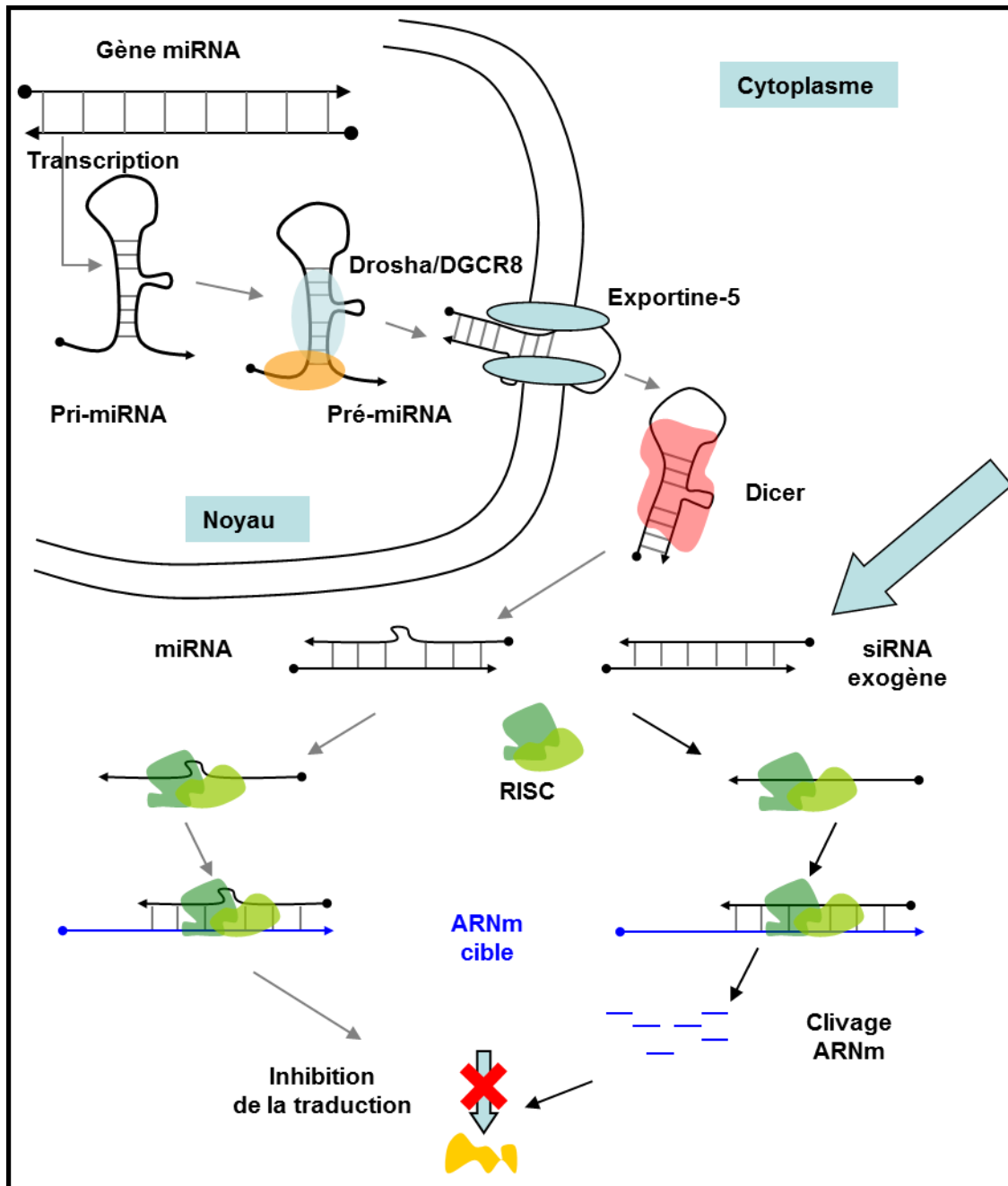


Figure 8: Mode de fonctionnement des ARN interférents.

Le mécanisme de régulation des gènes par les siRNA est en partie semblable à celui des miRNA. Cependant chez les mammifères il n'a pas été observé de siRNA endogènes. Ils sont donc introduits artificiellement dans la cellule en utilisant différentes stratégies. A l'image des miRNA, les siRNA sont de courtes séquences d'ARN, 20-25 nucléotides, appariées en double brin. L'un des brins est appelé le brin guide alors que l'autre est appelé le brin passager. Une fois arrivés dans le cytoplasme ils sont pris en charge dans le complexe RISC où le brin

passager est dégradé par l'intermédiaire de la protéine Argonaute-2. Le brin guide va alors s'associer à l'ARNm cible de façon entièrement complémentaire ; contrairement aux miRNA ou bien souvent la complémentarité n'est que partielle. L'ARNm ciblé par le brin guide est ensuite dégradé par la protéine Argonaute-2 et le complexe RISC peut ainsi venir se fixer sur un autre ARNm cible et continuer son travail de destruction pendant plusieurs jours. L'introduction, dans une cellule, d'un siRNA spécifique va donc conduire à la répression de la traduction de l'ARN messenger cible et ainsi bloquer la synthèse protéique.

La forte potentialité thérapeutique des ARN interférents a conduit au lancement de nombreux essais cliniques visant le traitement de diverses maladies allant de la dégénérescence maculaire à la fièvre hémorragique en passant par les tumeurs solides ou l'hypercholestérolémie.⁽¹⁵⁾

I.3. Les aptamères

Les aptamères, du latin « aptus » qui signifie « apte, correspondre » et du grec « meros » qui signifie « partie, élément », sont des acides nucléiques mono- ou bicaténaires possédant une structure primaire et tridimensionnelle permettant de se lier spécifiquement à une cible avec une très grande affinité. Découverts dans les années 1990⁽¹⁶⁾ leur intérêt n'a cessé de croître suite au développement de méthodes de sélection *in vitro* couplées aux techniques d'amplifications. Pour une séquence d'acide nucléique formée de l'enchaînement de 30 nucléotides, on peut engendrer 4^{30} (environ 10^{18}) séquences différentes à partir des 4 unités nucléotidiques constituant l'ADN ou l'ARN. La structure tridimensionnelle - la forme - de ces oligonucléotides va être gouvernée en grande partie par leur séquence primaire et l'on aura ainsi une bibliothèque d'oligonucléotides présentant une population de formes susceptibles de s'associer à une cible via des interactions électrostatiques, hydrophobes, de van der Waals, des liaisons hydrogènes... En présentant à une cible prédéfinie une cohorte d'oligonucléotides suffisamment riche on peut ainsi espérer qu'une des séquences - une des formes - présente de manière opportuniste des interactions fortes avec la cible d'intérêt.⁽¹⁷⁾ Ils peuvent se lier à des cibles très diverses telles que des protéines, des acides nucléiques, des vitamines, des cellules ou même des tissus (**Figure 9**).

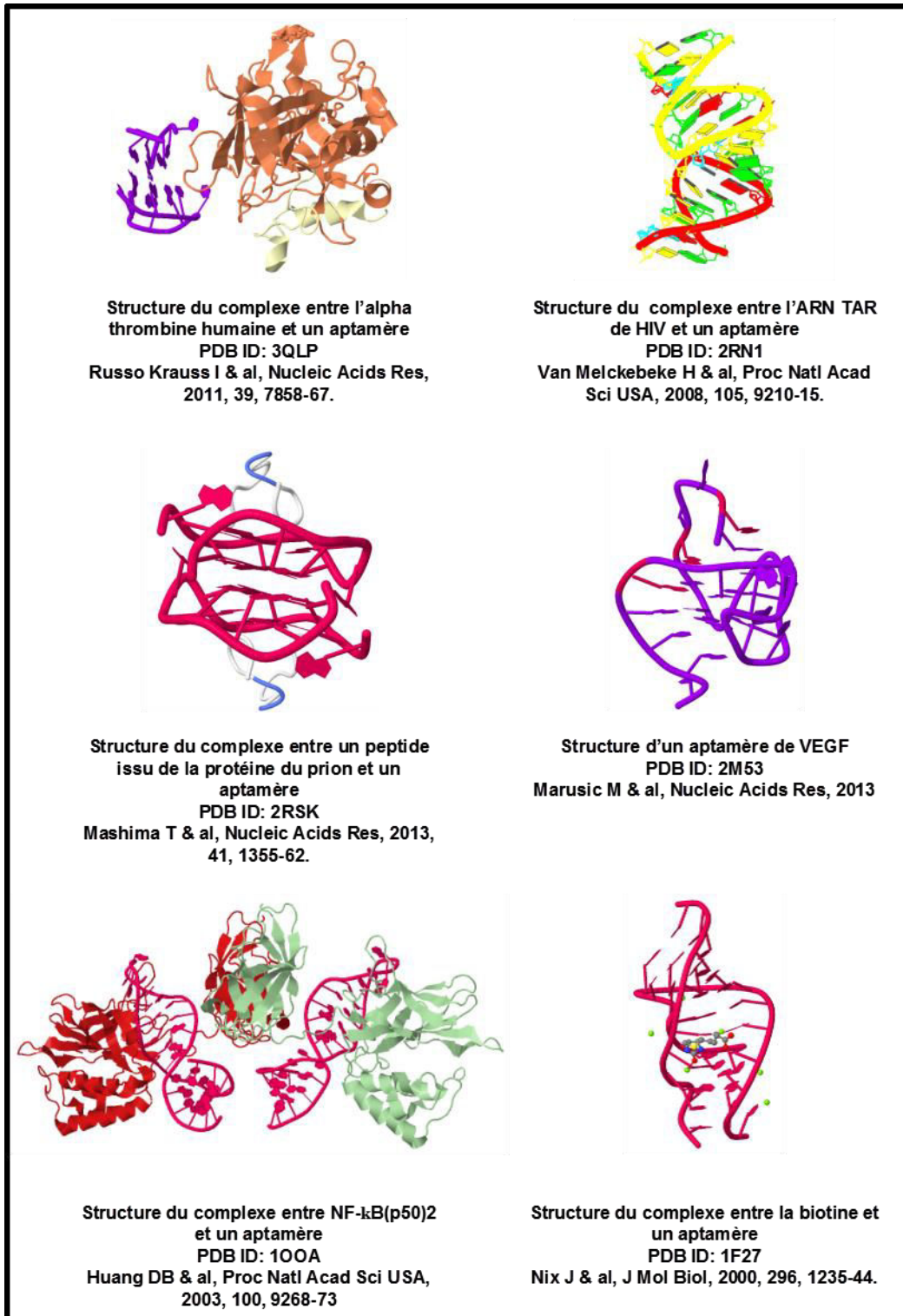


Figure 9: Quelques structures de complexes Aptamère/cible.

L'une des technologies les plus employées pour la sélection d'un aptamère est la technique « SELEX » - pour Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment.⁽¹⁸⁾ La première étape consiste à choisir une bibliothèque d'oligonucléotides contenant jusqu'à 10^{15}

séquences. Ces oligonucléotides sont alors mis en contact avec une cible prédéfinie pour laquelle certaines séquences auront une affinité plus ou moins forte. Parmi les complexes constitués, on sélectionne ceux dont la liaison est suffisamment forte ; le plus souvent en éliminant les oligonucléotides qui ne sont pas suffisamment liés à la cible dans les conditions de l'expérience. Les candidats ainsi obtenus sont amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) et réinjectés dans le système afin de réitérer le processus de sélection en imposant des critères de sélection, i.e. l'affinité du ligand pour sa cible, plus strictes. Au terme du processus de sélection amplification, les séquences sélectionnées sont alors clonées et séquencées puis synthétisées à grande échelle par voie chimique.

Les aptamères sont capable de se lier à leur cible avec une affinité comparable à celle des complexes antigène/anticorps (K_d de l'ordre du nM) et peuvent ainsi inhiber des fonctions protéiques au sein d'une cellule. Ils ont l'avantage d'être hautement spécifiques, de taille relativement petite et d'être faiblement immunogéniques. Dès leur apparition, diverses tentatives ont été menées en vue d'applications cliniques pour des maladies telles que le cancer, le sida, la dégénérescence maculaire, les problèmes de coagulation ou le diabète. De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours visant à évaluer des aptamères.⁽¹⁹⁾ Le premier aptamère à visée thérapeutique a été approuvé par la FDA en 2004 contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Il s'agit du pegaptanib sodium commercialisé sous le nom de Macugen® par la société Pfizer. Cet oligoribonucléotide (ARN) composé de 28 nucléotides (5'-CGG AAU CAG UGA AUG CUU AUA CAU CCG T-3') est un agent anti-angiogénique qui cible le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) régulant la perméabilité vasculaire. La cible du Pegaptanib est la protéine VEGF₁₆₅, le plus abondant des isomorphes de VEGF qui régule la perméabilité vasculaire. VEGF₁₆₅ est un homodimère dont chaque unité est composée de 165 acides aminés. L'aptamère anti-VEGF se lie au domaine de liaison à l'héparine de sa cible empêchant ainsi VEGF de se lier à son récepteur et inhibant ainsi ses fonctions. Afin d'accroître son temps de demi-vie dans la circulation sanguine et de le protéger contre les nucléases (exonucléases et ribonucléases), cet aptamère a subi de nombreuses modifications (**Figure 10**). La substitution du groupement 2'-OH des riboses par un atome de fluor dans les résidus pyrimidiques permet d'augmenter considérablement la résistance envers les nucléases. C'est pour cela que lors du processus de sélection, l'aptamère ARN a été isolé sous cette forme modifiée. De même, la substitution du groupement 2'-OH des résidus puriques par un groupement 2'-O-méthyle permet une meilleure résistance contre les nucléases. Le processus de sélection a permis d'isoler, dans une deuxième étape, un aptamère dans lequel tous les

groupements 2'-OH des résidus puriques ont été substitués, excepté les adénines en position 4 et 5, sans que cela entraîne une perte d'affinité pour VEGF. La protection contre les exonucléases a été assurée en 3'- par l'ajout d'une désoxythymidine en position inversée (liaison phosphodiester 3'-3') et en 5'- par un polyéthylène glycol (PEG) de 40 kDa. La présence du polyéthylène glycol permet surtout d'accroître le temps de résidence de l'aptamère dans le sang de manière très significative. L'ensemble des modifications apportées lors de la synthèse de cet aptamère d'ARN ont permis d'obtenir une demi-vie d'environ une dizaine de jours alors que pour un aptamère d'ARN non modifié cette valeur est de l'ordre de quelques minutes à quelques heures.⁽²⁰⁻²¹⁾

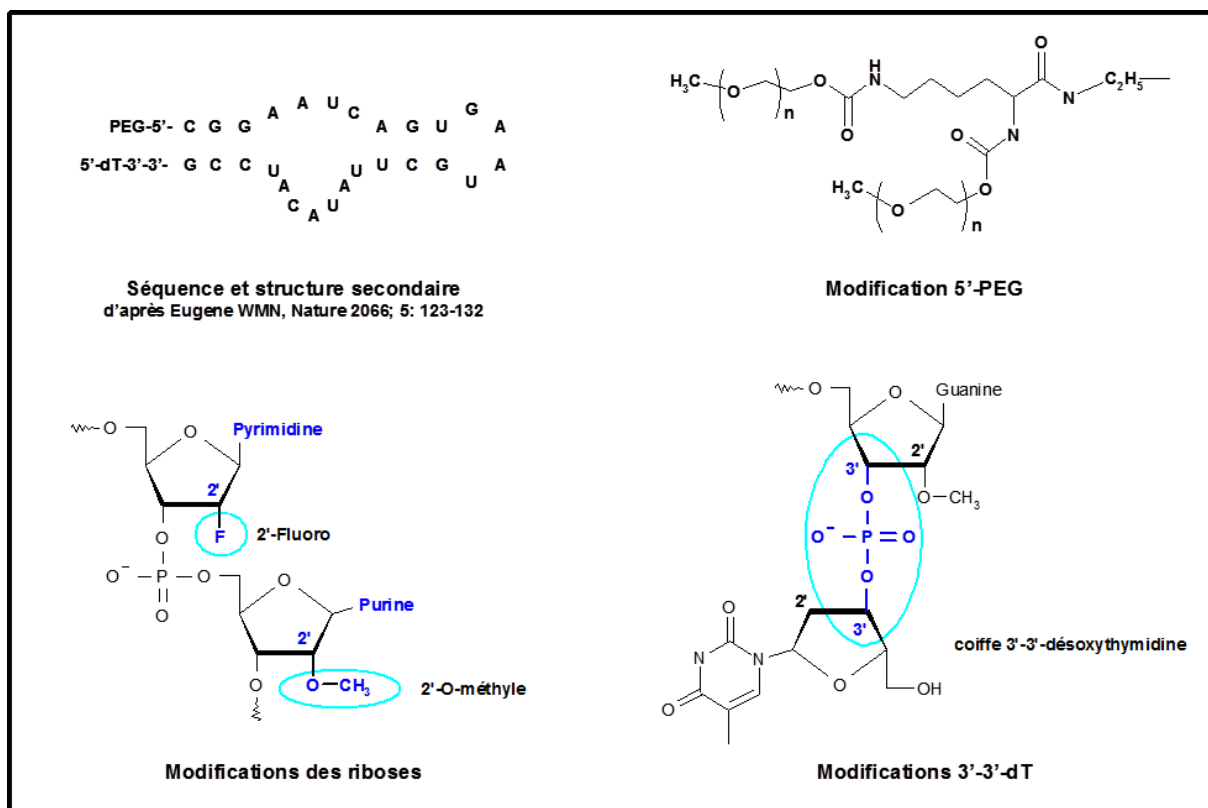


Figure 10: Description du Pegaptanib.

I.4. Oligonucléotides leures, Oligonucléotides CpG

La stratégie leurre consiste à « saturer » une cellule avec un oligonucléotide dit « leurre » dont la séquence nucléotidique est très proche de celle reconnue par le site de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription qui gouverne la transcription d'un gène que l'on souhaite cibler. La molécule leurre se lie alors sélectivement au facteur de transcription avec une très grande affinité l'empêchant de se lier à sa cible génomique et conduisant ainsi à l'inhibition ou à l'activation de la transcription selon la fonction exercée habituellement par le facteur de transcription. De façon à augmenter leur durée de vie dans le sérum ainsi que pour favoriser leur internalisation dans les cellules, les oligonucléotides leures sont souvent modifiés chimiquement.⁽²²⁾ L'un des problèmes rencontrés dans l'utilisation de cette stratégie est que bien souvent un facteur de transcription contrôle la transcription de plusieurs gènes ce qui réduit les approches thérapeutiques envisageables par cette stratégie. Nous verrons cependant au chapitre 3, pour le ciblage de la protéine STAT3, que dans certains cas leur utilisation peut s'avérer pertinente.

Les oligonucléotides dits « CpG » (CpG-ODN) sont de courtes séquences d'ADN contenant le dinucléotide 5'-CG-3' constitué d'une cytosine et d'une guanine. Ces motifs CpG sont hautement représentés dans l'ADN bactérien alors qu'ils sont très peu présents dans l'ADN des mammifères chez qui les cytosines sont méthylées en C5. Par conséquent l'introduction d'une telle séquence chez un mammifère entraîne une activation du système immunitaire via une protéine transmembranaire spécifique : le récepteur TLR9 (Toll-like Receptor 9).⁽²³⁻²⁴⁾ Il existe différentes classes d'oligonucléotides CpG qui selon la nature de la séquence nucléotidique (présence ou non d'un palindrome) ou du lien internucléosidique (phosphodiester ou phosphorothioate) vont orienter la réponse immunitaire dans une direction ou une autre.⁽²⁵⁻²⁶⁾ Cette capacité immunostimulante des CpG-ODN ouvre naturellement la voie à de nombreux champs d'application comme le traitement des allergies, des cancers ou encore leur utilisation comme adjuvants dans les vaccins.⁽²⁷⁻²⁹⁾

De par leur potentialité à interagir avec des cibles multiples et ainsi influencer de nombreux processus cellulaires, les oligonucléotides sont à n'en pas douter des molécules d'avenir dans le traitement de nombreuses maladies. Cependant, malgré un fort potentiel thérapeutique, l'utilisation des acides nucléiques dans des essais cliniques se heurte encore au développement de transporteurs efficaces n'induisant pas d'effets délétères rédhibitoires sur l'organisme.

II. LE TRANSPORT DES ACIDES NUCLEIQUES (VECTORISATION)

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, les oligonucléotides sont de plus en plus reconnus comme ayant un fort potentiel thérapeutique contre une large variété de maladies. Cependant leur faible efficacité à pouvoir circuler dans l'organisme et à atteindre leur cible sans avoir subi de dégradation est encore un frein majeur au développement clinique de l'ADN médicament. En effet cette macromolécule polyanionique doit franchir de multiples obstacles avant d'atteindre sa cible intracellulaire. Tout d'abord les oligonucléotides doivent échapper à la dégradation par les nucléases présentes dans le sérum ou encore à l'élimination rénale ou par les cellules du système réticulo-endothélial (rate, foie...). De plus en fonction du mode d'administration et de l'emplacement de la cible cellulaire, ces macromolécules vont devoir traverser l'endothélium vasculaire et voyager à travers la matrice extracellulaire avant d'être internalisées dans les cellules et relarguées dans le cytoplasme. Afin de surmonter l'ensemble de ces obstacles, de multiples stratégies ont été développées.⁽³⁰⁻³²⁾ Ainsi pour augmenter la stabilité métabolique des oligonucléotides, de nombreuses modifications chimiques ont été introduites.⁽³³⁻³⁵⁾ Dans certains cas ces modifications vont pouvoir faciliter la pénétration des oligonucléotides dans les cellules ; comme c'est le cas pour certains « phosphorothioates » qui ont été testés cliniquement sans aucun système de vectorisation.⁽³⁶⁾ Cependant afin de palier à une clairance systémique importante, de fortes doses doivent être injectées pour observer une efficacité thérapeutique, ceci au dépend d'une potentielle toxicité. De plus, ce mode de distribution ne permet pas le ciblage de tissus spécifiques ce qui augmente le risque d'effets secondaires importants. C'est pour cela que le développement de systèmes de vectorisation appropriés est un enjeu important dans l'avènement de l'ADN médicament. Au cours des années, de nombreuses méthodes ont été mises au point pour le transport des acides nucléiques. Elles sont généralement classées en trois catégories qui reposent sur trois types d'approches. A l'heure actuelle aucune de ces techniques ne peut prétendre à être généralisée à l'ensemble des applications que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. Quelques-unes de ces techniques sont présentées dans la suite de ce chapitre. Les méthodes dites physiques telles que la micro-injection, la sonoporation, l'optofection (laserfection), l'électroporation ou encore la biolistique font appel à une instrumentation spécifique. Chacune de ces techniques engendre la formation temporaire de pores dans la membrane plasmique ce qui permet aux acides nucléiques de pénétrer dans le cytoplasme ou dans le noyau.

Les méthodes chimiques les plus utilisées aujourd'hui font appel à des molécules lipidiques, des polymères ainsi que des nanoparticules de différentes compositions. L'internalisation des

complexes formés avec l'ADN se fait soit par fusion avec la membrane plasmique soit par différentes voies d'endocytose non spécifiques.

Enfin, une des approches les plus utilisées dans le cadre de la thérapie génique est celle des vecteurs viraux. Cette méthode, dite « biologique », ne sera pas abordée dans ce manuscrit car plus éloignées des techniques physiques et chimiques utilisées durant cette thèse. Elle utilise les capacités naturelles des virus (retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-associés...) à faire pénétrer leur matériel génétique au sein des cellules de l'hôte.⁽³⁷⁾ Bien que cette technique ait suscité de grands espoirs, l'utilisation de vecteurs viraux est relativement complexe à mettre en œuvre et pose encore des problèmes de sécurité liés à la nature même des vecteurs.⁽³⁷⁾

II.1. Electroporation et techniques mécaniques

Electroporation

L'électroporation est une technique simple et rapide qui permet d'obtenir de forts taux de transfection sur des cellules en culture. Les cellules sont placées dans un électroporateur en présence d'un tampon spécifique dans lequel on va ajouter l'ADN et ainsi envoyer des impulsions électriques. Le champ électrique crée alors une différence de potentiel à travers la membrane qui va induire la formation temporaire de pores pouvant laisser entrer l'ADN dans le cytoplasme avant que les cellules ne retournent à des conditions de croissance normale. Cette technique peut-être très utile pour des cellules difficilement transfectables ; cependant elle n'est pas simple à mettre en œuvre. Lorsque le champ électrique appliqué est trop faible aucune déstabilisation de la membrane n'apparaît et par conséquent l'ADN n'est pas délivré dans la cellule. Au contraire si le champ est trop intense des dommages irréversibles de la membrane sont observés provoquant une lyse cellulaire. Ainsi un équilibre fin doit être trouvé pour chaque type de cellule entre un bon rendement d'internalisation et une mortalité cellulaire tolérable. De plus, s'il est relativement facile de mettre en œuvre cette technique sur des cellules en culture, son application sur un être humain l'est beaucoup moins, même si des protocoles d'électroporation *in vivo* ont été mis au point pour des injections d'ADN en intracardiaque sur des rats⁽³⁸⁾ ou en intramusculaire chez des patients atteints par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)⁽³⁹⁾ en utilisant des systèmes d'électrodes. Ces protocoles nécessitent néanmoins un acte chirurgical préliminaire de façon à pouvoir implanter les électrodes au niveau du muscle ou de l'organe ciblé.

Laserfection/optoinjection

L'optoinjection consiste à créer un trou d'environ 1 à 5 μm dans la membrane plasmique par focalisation d'un faisceau laser ($< 1 \mu\text{m}$ de diamètre) sur une cellule unique. Les acides nucléiques ou toute autre molécule présents dans le milieu de culture peuvent alors diffuser dans la cellule perméabilisée par le faisceau laser (**Figure 11**).

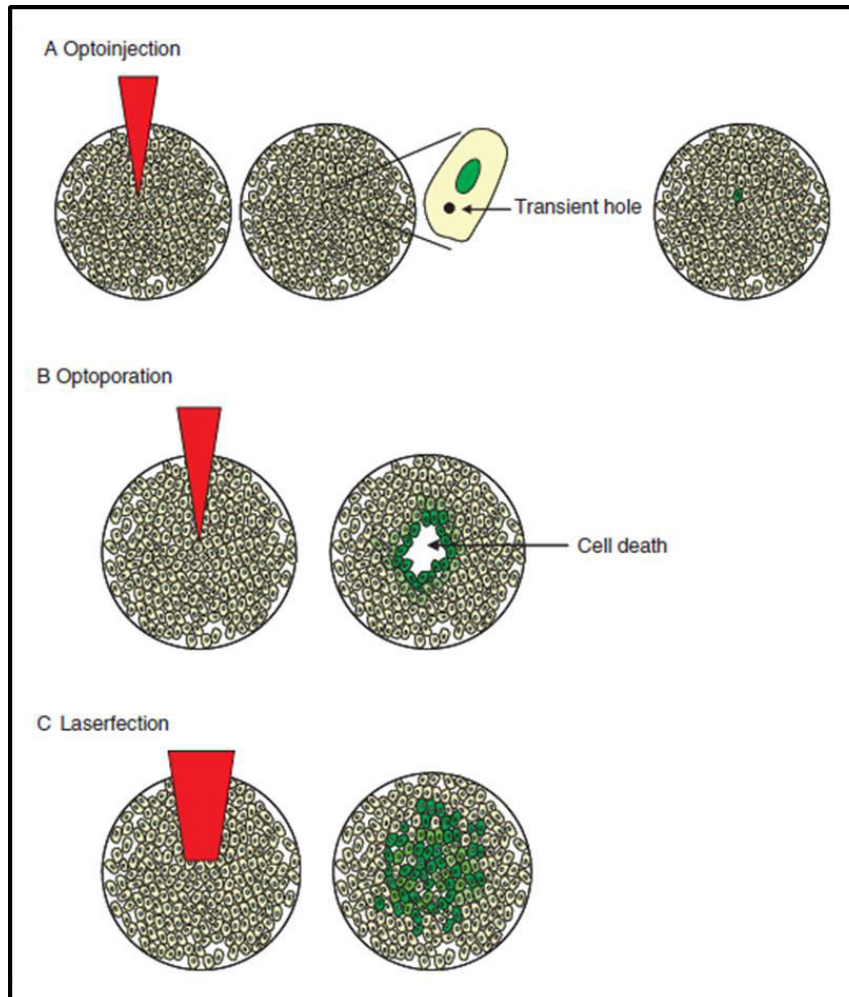


Figure 11: 3 modes de transfection assistée par Laser. (D'après K. Rhodes et al ⁽⁴⁰⁾)

Une technique apparentée est l'optoporation qui consiste à focaliser le laser sur le substrat de culture ce qui permet d'étendre la zone de perméabilisation des cellules au dépend de la survie des cellules proches du centre du faisceau. Depuis la découverte de ce phénomène à la fin des années 80 ⁽⁴¹⁾ la technique a évoluée et l'on parle aujourd'hui de laserfection.⁽⁴⁰⁾ Cette dernière méthode permet en défocalisant légèrement le faisceau de perméabiliser plusieurs cellules à la fois. De plus les lasers utilisés étant moins énergétiques la mortalité cellulaire diminue. Les améliorations apportées, ont donc permis d'augmenter le nombre de cellules transfectées et de diminuer la mortalité.

Cette technique, qui permet d'obtenir de bon taux de transfection lorsqu'elle est utilisée *in vitro*, reste quand même limitée pour une application *in vivo* en raison de la mortalité cellulaire qu'elle engendre au point de focalisation du laser et surtout peu envisageable pour des zones difficiles d'accès ou largement étendues. De plus, comme pour l'électroporation, il faut amener l'ADN à proximité de la cible soit par injection soit à l'aide d'un vecteur.

Sonoporation

A la fin des années 80, Fechheimer & al ont montré que l'on pouvait transférer un plasmide dans des cellules de mammifère en utilisant la sonication.⁽⁴²⁾ La méthodologie a ensuite été confirmée et améliorée dans les années 90 avec l'introduction d'agents de contraste développés pour l'imagerie par ultrasons ; c'est alors que le terme de sonoporation est apparu.⁽⁴³⁻⁴⁴⁾ Les agents de contrastes utilisés étaient des microbulles constitués d'un cœur gazeux (air, perfluorocarbures) et d'une coquille de nature protéique (albumine) ou lipidique (acide palmitique). Par la suite de nombreux types de microbulles ont été mis au point ; certaines microbulles étant constituées d'une coquille contenant des nanoparticules magnétiques.⁽⁴⁵⁾ L'approche pratique est similaire à celle des deux précédentes techniques. L'ADN est amené à proximité de la cible (injection, vecteurs) en présence de microbulles et la cible est soumise à une vague d'ultrasons. Le mécanisme exact de transfection assistée par ultrasons est encore incertain mais il semble que l'oscillation (alternance rapide expansion/contraction de la microbulle) et/ou l'implosion des microbulles à proximité des cellules entraîne une perméabilisation temporaire de la membrane permettant l'entrée de grosses molécules telles que les acides nucléiques (**Figure 12**).⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾

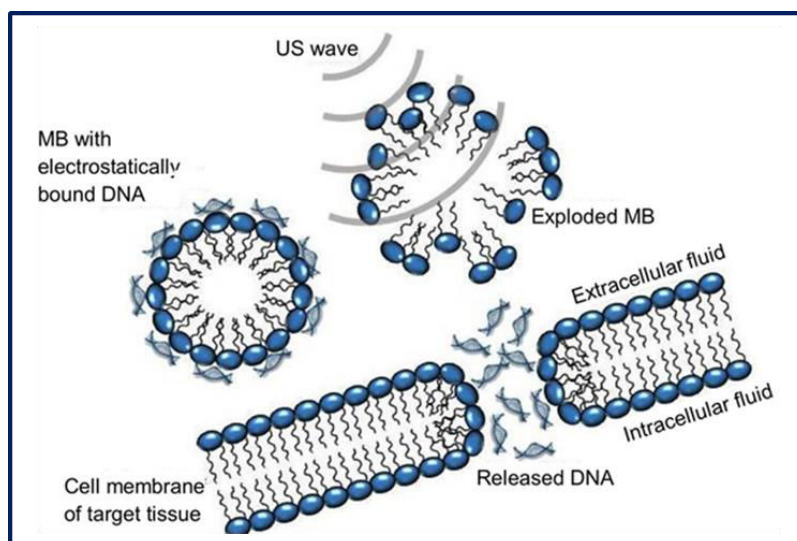


Figure 12: Transfection assistée par ultrasons. (D'après O. Zolochovska et al⁽⁴⁶⁾)

Bombardement par des particules (Biolistique)

Cette technique a été développée initialement par Sanford et Klein pour la transformation génétique des plantes (production d'organismes génétiquement modifiés (OGM)).⁽⁵⁰⁻⁵³⁾ Elle consiste à projeter à très grande vitesse sur des cellules, des particules préalablement fonctionnalisées par des fragments d'ADN (i.e. un plasmide contenant un gène d'intérêt). Le plus souvent, les particules utilisées ont une taille de l'ordre du micron et sont composées de métaux tels que l'or ou le tungstène même si ce dernier n'est plus beaucoup employé du fait de sa toxicité.⁽⁵⁴⁾ Lorsqu'elles sont propulsées, à l'aide d'un canon (ou pistolet) à ADN, certaines de ces particules vont traverser les parois cellulaires jusqu'au noyau où le plasmide pourra alors être intégré dans l'ADN génomique (**Figure 13**). Divers systèmes ont été développés et améliorés au cours du temps utilisant le même principe à savoir : les particules (« microporteur ») sont tout d'abord fonctionnalisées par des molécules d'acides nucléiques ensuite elles sont déposées sur un support (« macroporteur ») puis « décollées » de ce support et projetées à grande vitesse sur les cellules par l'intermédiaire d'une décharge électrique ou le plus souvent par l'action d'un flux d'hélium sous pression. Il est possible d'optimiser le protocole en fonction des cellules à transformer en faisant varier divers paramètres tels que la taille des particules (0.6 à 1.6 μm habituellement) ou/et l'accélération de la particule (variations de la pression du flux d'hélium ou de la tension de la décharge électrique).^(53, 55)

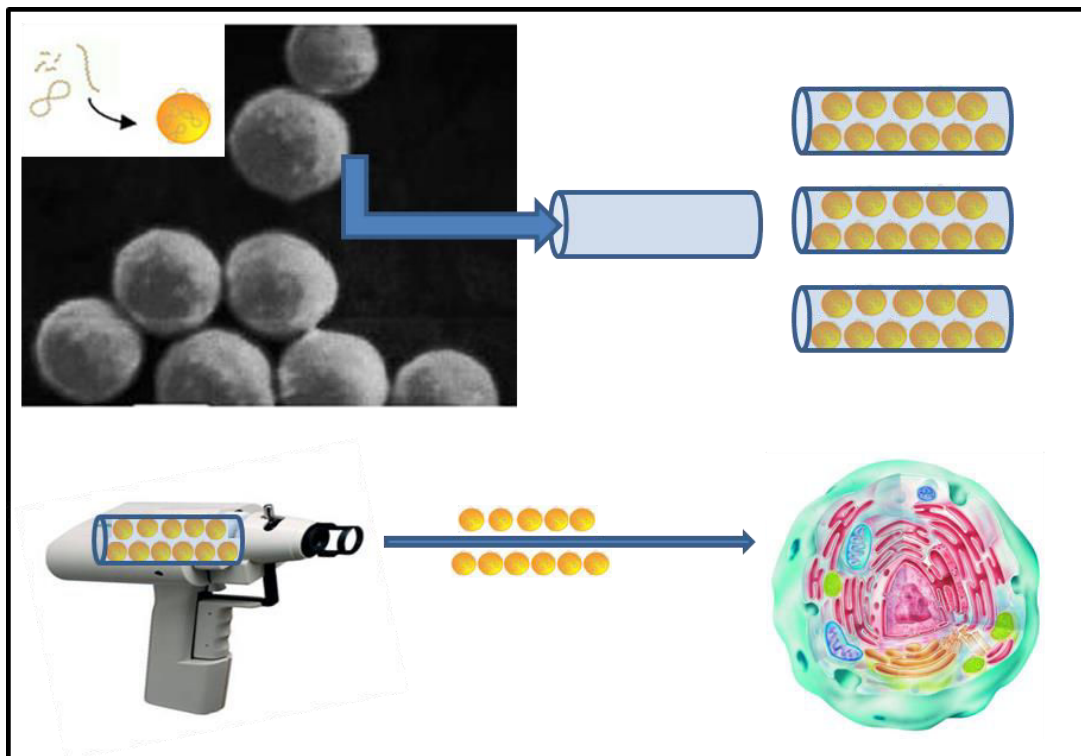


Figure 13: Bombardement par des particules (Système « Helios Gene Gun » Bio-rad).

Cette technique développée avec succès pour la transformation génétique des plantes est aussi employée pour le transport d'acides nucléiques dans des cellules animales *in vitro* et *in vivo* avec un taux de réussite comparable à l'électroporation.⁽⁵⁶⁻⁶⁴⁾

Toutefois, l'un des principaux inconvénients de cette technique, outre la mortalité cellulaire induite par une trop grande énergie cinétique des particules, est la difficulté de l'étendre à l'échelle d'un animal ou d'un être humain. A l'instar de l'électroporation, la biolistique n'est à l'heure actuelle envisageable que localement à la surface du corps dans le cadre d'un vaccin à ADN ou sur certains organes par l'intermédiaire d'un acte chirurgical.

Il est à noter que le bombardement par des particules a aussi été utilisé pour délivrer une large gamme de molécules et notamment des protéines à l'aide de microparticules de différentes natures.⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾ Cette dernière application peut sembler prometteuse dans le cadre de la vaccination en combinaison avec des acides nucléiques (CpG par exemple) et peut donc être une alternative à l'injection par aiguille.

II.2. Vecteurs synthétiques cationiques de nature lipidique ou polymérique

Historiquement, le transport des acides nucléiques par des vecteurs synthétiques est basé sur la complexation de la molécule polyanionique qu'est l'ADN avec des lipides cationiques (on parle alors de lipoplexe) ou des polymères cationiques (on parle alors de polyplexe).⁽⁶⁷⁾ Les complexes ainsi formés, souvent des particules de taille submicronique, visent à protéger les acides nucléiques contre les nucléases, réduire leur vitesse d'élimination par l'organisme et faciliter leur internalisation dans les cellules. Par la suite des approches plus complexes ont été mises au point avec notamment, le développement de nano-systèmes comportant un lien covalent hydrolysable entre le vecteur et l'acide nucléique.⁽³²⁾

Les complexes formés avec des vecteurs lipidiques ou polymériques vont pouvoir pénétrer dans les cellules en utilisant des mécanismes naturels tels celui de l'endocytose. Cependant les mécanismes d'entrée restent controversés et d'autres voies possibles telles que la fusion direct avec la membrane plasmique sont décrites pour les vecteurs lipidiques. Le ciblage d'une population cellulaire en ajoutant un ligand spécifique à la particule peut donc être une approche intéressante pour délivrer un acide nucléique. Pour cela, le développement de nano-systèmes multifonctionnels permettant une protection maximale de l'acide nucléique, un adressage sélectif vers des cellules cibles ainsi qu'une internalisation efficace est un enjeu important dans l'avènement de l'ADN médicament.

L'endocytose est un processus cellulaire qui permet le transfert de molécules ou de particules de la matrice extracellulaire vers le cytoplasme par l'intermédiaire de vésicules créées par

repliement (invagination) de la membrane plasmique. Il existe différents mécanismes d'endocytose (phagocytose, endocytose à récepteurs, macropinocytose...) et l'internalisation des complexes se fera en fonction de leurs propriétés physicochimiques et de la nature des cellules cibles (**Figure 14A**).⁽⁶⁷⁾

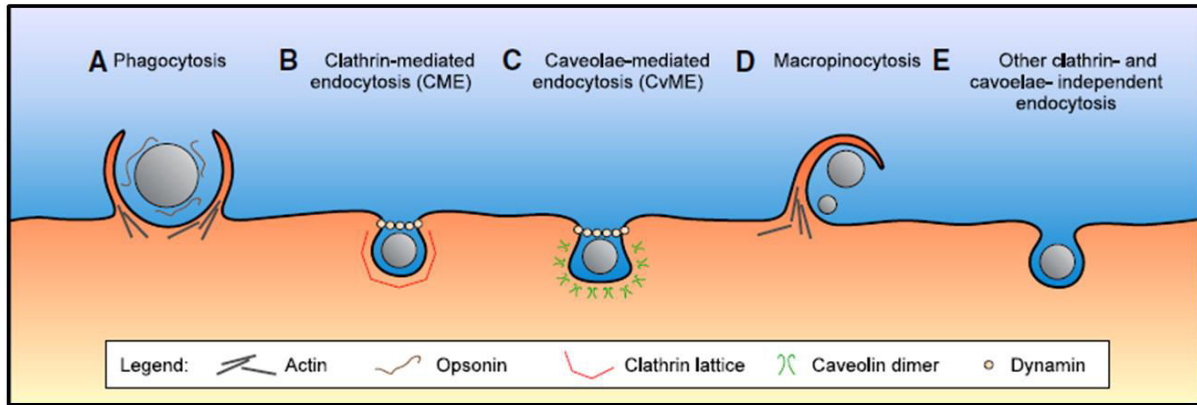


Figure 14: Différentes voies d'endocytose. (D'après H. Hillaireau et al.⁽⁶⁷⁾)

La phagocytose s'observe principalement avec les phagocytes, des cellules spécialisées du système immunitaire (macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques) et peut se décomposer en trois étapes. On observe tout d'abord une phase d'opsonisation caractérisée par la fixation, spécifique ou non, d'opsonines à la surface de la particule. Cette étape a lieu dans la circulation sanguine très rapidement après l'introduction des particules. Les opsonines sont des molécules de nature protéique ayant une action similaire à des anticorps. Elles se lient à des récepteurs spécifiques portés par les phagocytes et facilitent ainsi la reconnaissance des particules qui sont ensuite ingérées par les phagocytes. Il a été rapporté que différents paramètres influencent le taux d'internalisation.⁽⁶⁷⁾ Par exemple, plus les particules ont une taille importante, typiquement au-delà de 200-250 nm, et plus le taux d'internalisation va être élevé. De même des propriétés physicochimiques de la particule telles que la charge de surface, ou encore l'hydrophobicité vont directement influencer l'adsorption des opsonines et les interactions avec la membrane plasmique. Ainsi, en règle générale, des particules hautement chargées (négativement ou positivement) ou/et possédant une surface hydrophobe subiront plus fortement l'opsonisation que des particules neutres et hydrophiles. Au contraire on considère qu'une petite taille, 50 à 100 nm, une faible charge ainsi que la présence d'un revêtement hydrophile tel que des chaînes PEG (Poly Ethylène Glycol) sont des facteurs qui permettent à une particule d'échapper à l'opsonisation, on parle alors de furtivité.⁽⁶⁷⁾

En dehors du phénomène de phagocytose qui concerne les cellules spécialisées du système immunitaire l'internalisation des vecteurs peut se faire par différentes voies d'endocytose : endocytose clathrine-dépendante, endocytose cavéoline-dépendante, macropinocytose... (**Figure 14B-E**).⁽⁶⁷⁾ A l'exclusion de la macropinocytose, les vésicules formées dans ces voies d'endocytoses sont plus petites (diamètre < 150 nm) que celles formées lors de la phagocytose (diamètre > 200 nm). Contrairement à la phagocytose, il est difficile de définir un comportement type des particules vis-à-vis d'une voie spécifique d'endocytose. Il existe de nombreuses variations en fonction de la nature des particules et du type cellulaire.

Les vecteurs de nature lipidique

L'utilisation de lipides cationiques pour le transport des acides nucléiques a été décrite pour la première fois par Felgner et al en 1987.⁽⁶⁸⁾ Dès lors la technique n'a eu de cesse d'être améliorée.⁽⁶⁹⁻⁷²⁾ Les lipides cationiques généralement utilisés (DOTMA, DOTAP, DTAB, DOSPA, DOGS...), sont constitués de deux chaînes alkyles hydrophobes (insaturées ou non) reliées à une tête polaire (chargée positivement) par l'intermédiaire d'un « espaceur ». Les vecteurs lipidiques sont le plus souvent préparés à partir d'un lipide cationique et de un ou plusieurs lipides neutres (DOPE, DOPC, Cholestérol...). Ces derniers, aussi appelés co-lipides, vont contribuer à moduler les propriétés physicochimiques du vecteur et ainsi optimiser sa capacité de transfection vis-à-vis des cellules ciblées.⁽⁷³⁻⁷⁴⁾ En fonction du mode opératoire et des lipides utilisés, diverses structures peuvent être obtenues ; certaines de ces structures sont présentées sur la **Figure 15**.

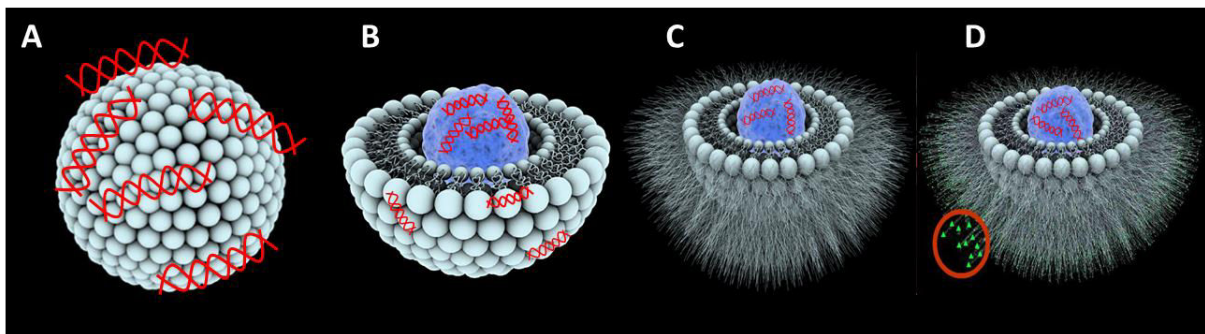


Figure 15: A Micelle. B-D. Liposomes de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération.

D'après <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/vecto/vecto.htm>

La structure dite en micelle (**Figure 15A**), apparentée à une sphère pleine, est formée en solution aqueuse à partir de lipides dont la partie hydrophobe est dirigée vers le centre de la

structure alors que les têtes polaires hydrophiles sont exposées à sa périphérie. Il est aussi possible de former des vésicules lipidiques telles que le liposome présenté **Figure 15B**. Un liposome est une vésicule lipidique assimilable à une sphère creuse constituée à sa périphérie d'une double couche lipidique et en son cœur d'une cavité renfermant une solution aqueuse pouvant contenir des molécules hydrophiles. Pour améliorer la furtivité des liposomes de 1^{ère} génération (**Figure 15B**), des chaînes PEG ont été ajoutées à la périphérie des vésicules (**Figure 15C**), on parle alors de vecteurs de 2^{ème} génération. Par la suite des ligands permettant le ciblage ont été greffés aboutissant à ce que l'on appelle la 3^{ème} génération de liposomes cationiques (**Figure 15D**). Cette classification, 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération est d'ailleurs universellement employée pour tous les vecteurs synthétiques quelle que soit leur nature.

Conceptuellement, deux approches ont été développées pour l'utilisation de vecteurs à base de lipides cationiques. L'acide nucléique, molécule hydrophile polyanionique, est soit complexé à la surface d'une micelle via les têtes polaires cationiques (**Figure 15A**) soit encapsulé dans un liposome cationique (**Figure 15B-D**). Dans la réalité, de nombreuses études structurales montrent que les schémas présentés **Figure 15** ne sont que purement conceptuels. La formation du lipoplexe, suite aux interactions électrostatiques entre les groupements phosphates de l'acide nucléique et les têtes polaires des lipides cationiques, va engendrer de nombreux réarrangements structuraux conduisant à des organisations supramoléculaires encore incomplètement caractérisées.⁽⁷⁵⁻⁸²⁾ Généralement deux grands types de réarrangement sont décrits : une structure multi-lamellaire dans laquelle l'ADN est « pris en sandwich » entre deux bicouches lipidiques (**Figure 16A**) et une structure dite en nid d'abeille ou encore spaghetti-like dans laquelle des tubules lipidiques sont empilés les uns sur les autres en système hexagonal et où l'ADN est soit complexé entre les tubules soit complexé dans le canal central de chaque tubule (**Figure 16B,C**). De plus, il a été observé que différents facteurs, ne serait-ce que la température ou l'âge de la préparation, pouvaient induire la transition d'une phase lamellaire à une phase hexagonale (**Figure 16D**).^(78, 80-81) L'étude et la compréhension de ces restructurations sont d'une grande importance pour l'avenir de ces vecteurs car de nombreux travaux ont démontré un lien direct entre l'organisation supramoléculaire du vecteur et son efficacité de transfection vis à vis d'un type cellulaire donné.^(78, 82-84)

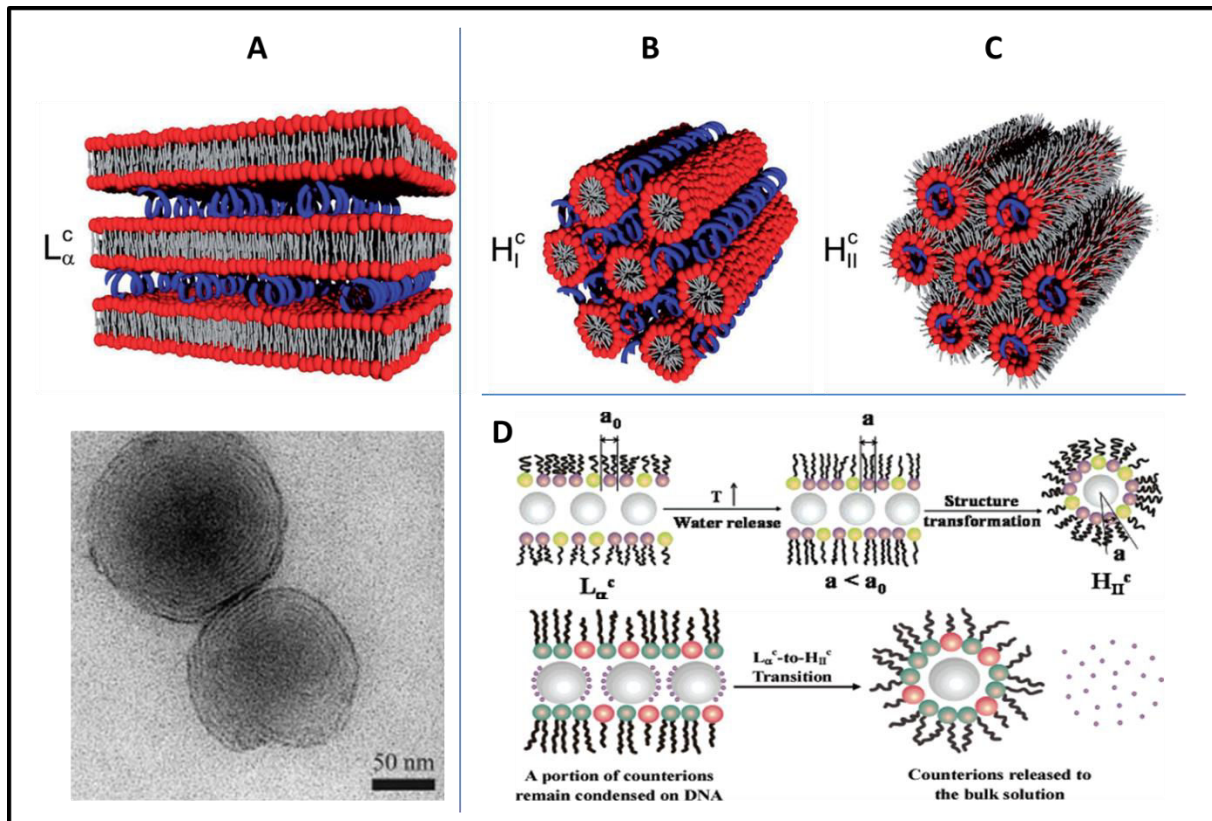


Figure 16: Réarrangements structuraux des lipoplexes. (D'après ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾)
A Structure multi-lamellaire, B Structure hexagonale,
C Structure hexagonale inverse, D Transition de phase.

Les vecteurs de nature polymérique

Comme nous l'avons décrit précédemment, les techniques utilisant des lipides ou des polymères cationiques pour le transport des acides nucléiques sont conceptuellement assez proches. Leur utilisation a d'ailleurs été introduite la même année respectivement par Felgner ⁽⁶⁸⁾ et Wu ⁽⁸⁵⁾. Dans leur article, Wu et Wu ⁽⁸⁵⁾ décrivent la synthèse et l'utilisation d'un vecteur cationique élaboré à partir de poly-L-lysine. Ce transporteur était assez « avant-gardiste » puisqu'il permettait l'internalisation d'un plasmide dans des hépatocytes, de manière spécifique, via le ciblage d'un récepteur porté uniquement par ces cellules. Pour ce faire, la poly-L-lysine est couplée avec une glycoprotéine spécifique du récepteur cible. De même qu'avec des lipides, les interactions électrostatiques entre l'ADN polyanionique et le vecteur polycationique conduisent à la formation d'un complexe hydrosoluble (le polyplexe). Les résultats obtenus ont montré que le plasmide transporté était bien exprimé spécifiquement dans les cellules porteuses du récepteur contrairement aux cellules témoins ne portant pas ce récepteur. De plus, les auteurs ont montré que les polyplexes n'étaient pas internalisés dans

les cellules cibles lorsqu'ils étaient en compétition avec la glycoprotéine en excès, validant ainsi leur hypothèse d'internalisation via une voie d'endocytose récepteur-dépendante.

Nous avons vu précédemment que les vecteurs cationiques après s'être liés à la membrane cellulaire externe via des interactions électrostatiques ou/et par reconnaissance d'un récepteur membranaire vont pénétrer dans les cellules par différentes voies d'endocytose. Ce mécanisme peut conduire à la formation de vésicules intra-cytoplasmiques appelées endosomes. Ces vésicules sont constituées d'une enveloppe externe de lipides et d'un cœur aqueux contenant entre autre les acides nucléiques complexés aux vecteurs. Suite à de nombreux phénomènes de fusion, les endosomes précoces vont évoluer en endosomes tardifs puis en lysosomes secondaires. Ces transformations successives sont la conséquence de la fusion des lysosomes primaires, vésicules riches en hydrolases provenant du réseau trans-golgien, avec les endosomes. Cette évolution est accompagnée d'une acidification progressive du contenu endosomal consécutive à l'intervention des pompes à protons intégrées à la membrane des vésicules. Le milieu acide va permettre d'augmenter l'activité des nombreuses hydrolases présentes dans le lysosome conduisant ainsi à la digestion de son contenu.⁽⁶⁷⁾ Parmi ces enzymes figurent la désoxyribonucléase II, une endonucléase dont l'action va être de couper un brin d'ADN au milieu de la chaîne en libérant des nucléotides.⁽⁸⁶⁾ On voit donc que la voie lysosomale peut être un frein important à la vectorisation est qu'il est nécessaire de trouver un moyen pouvant favoriser une sortie rapide de l'endosome (**Figure 17**).

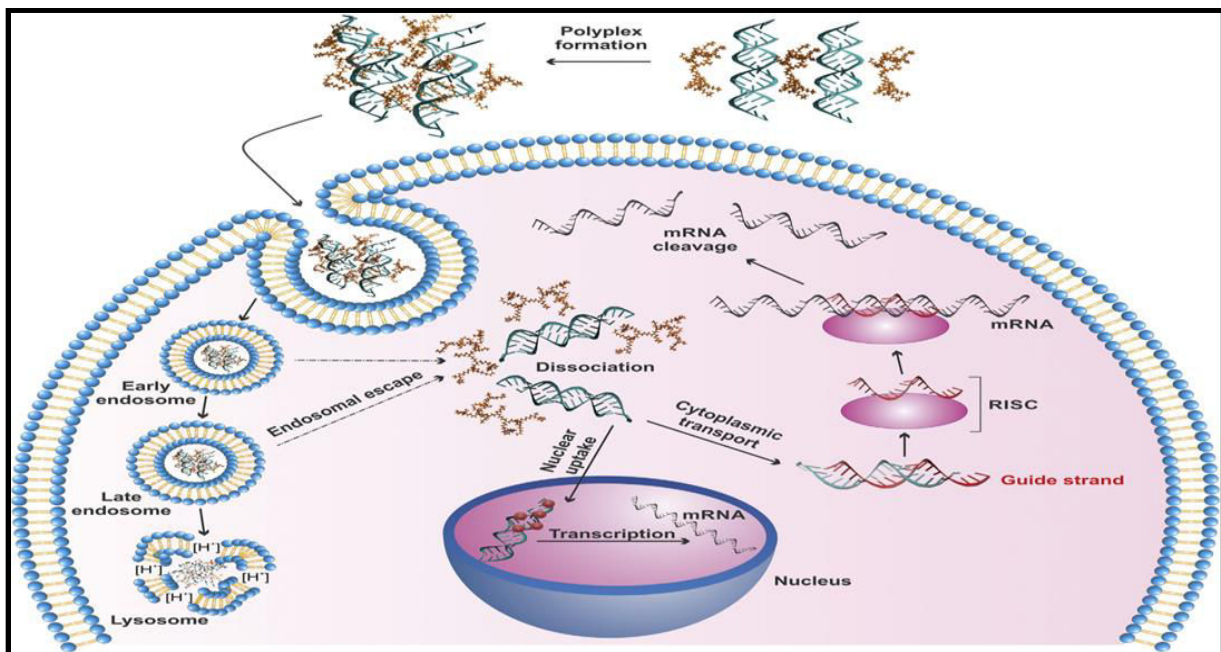
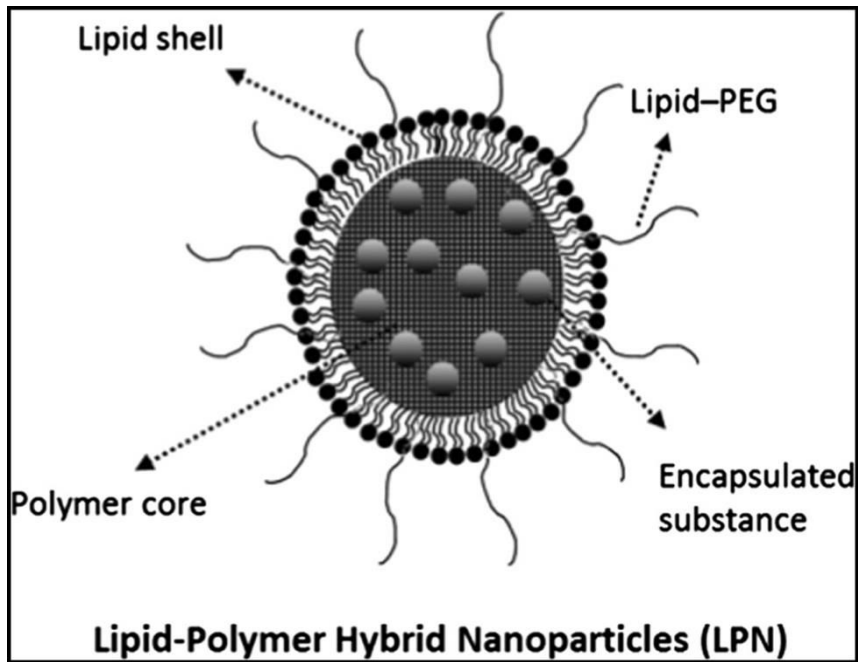


Figure 17: Parcours d'un polyplexe à travers la voie lysosomale.
(D'après D. Menkesdag-Erol et al ⁽⁸⁷⁾)

En dehors des poly-L-lysines, de nombreux polymères cationiques tels que le poly(éthylèneimine) (PEI), le chitosan ou encore le pullulan modifié, ont été employés pour transporter des acides nucléiques.⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾ Outre leur fort pouvoir complexant vis-à-vis des acides nucléiques, certains polymères cationiques possèdent aussi la particularité de se protoner/déprotoner dans la gamme des pH physiologiques, on parle ainsi d'éponge à protons. Cette propriété leur est conférée par le nombre important de groupements amines dont ils sont composés. Ce phénomène est particulièrement observé pour le PEI qui est l'un des polymères ayant une densité de fonctions amines des plus élevée puisqu'il en possède une tous les trois atomes constituant sa chaîne. Cette dernière particularité a d'ailleurs motivée son utilisation dans le transport des acides nucléiques pour s'assurer d'un relargage effectif de l'acide nucléique dans le cytoplasme.⁽⁸⁸⁾ L'hypothèse émise par Behr et son équipe est que le grand nombre de fonctions amines présentes sur le PEI permet de tamponner le milieu endosomal et ainsi de protéger l'acide nucléique de la dégradation par les nucléases. La présence du PEI, en induisant un afflux supplémentaire de protons nécessaire à l'acidification des vésicules, entraîne une perturbation de l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et la vésicule. La diffusion passive des ions Cl⁻ consécutive à l'accumulation de protons conduit alors à une entrée d'eau provoquant le gonflement puis la rupture des vésicules permettant ainsi la libération des complexes dans le cytoplasme. Cette hypothèse reprise par de nombreux auteurs^(67, 91-92), étayée expérimentalement⁽⁹³⁾, n'est cependant pas admise par tous⁽⁹⁴⁾ et des incertitudes demeurent sur le mécanisme exact de libération des complexes dans le cytoplasme. Ce phénomène d'éponge à protons a aussi été décrit pour des dendrimères de poly(amido-amine) (PAMAM)⁽⁹³⁾ Les dendrimères sont des constructions polymériques arborescentes organisées autour d'un cœur et présentant une symétrie centrale, un peu à l'image d'un chou-fleur. Dans le cadre de la vectorisation des acides nucléiques, les dendrimères utilisés sont de nature cationique à l'image du poly(propylène imine) (PPI)⁽⁹⁵⁾ ou du PAMAM, le plus fréquemment rencontré aujourd'hui et dont l'emploi a été décrit pour la 1^{ère} fois en 1996 par Kukowska-Latallo⁽⁹⁶⁾. Par la suite de nombreuses constructions à base de PAMAM ont été utilisées pour transférer un acide nucléique.⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾

Les vecteurs hybrides lipides-polymères

Afin de conjuguer les propriétés des lipides avec celles des polymères, une nouvelle génération de transporteur a naturellement vu le jour.⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾ Il s'agit de nanoparticules hybrides lipides-polymères construites selon le schéma présenté à la **Figure 18**.



*Figure 18: Schéma de nanoparticules hybrides Lipides-Polymères.
(D'après K. Hadinoto et al⁽¹⁰⁰⁾)*

Ces particules sont élaborées à partir d'un cœur polymérique dans lequel les molécules à visée thérapeutiques sont encapsulées. Cette structure est recouverte d'une coquille lipidique permettant d'augmenter la biocompatibilité du polymère et dotée à sa périphérie de lipides fonctionnalisés par des chaînes PEG afin de prolonger la durée de vie de la particule dans la circulation sanguine. Généralement ces particules sont synthétisées en une ou deux étapes : soit les complexes polymériques (polymère + molécule à visée thérapeutique) sont ajoutés à des vésicules lipidiques préformées soit polymère, molécule d'intérêt et lipides sont associés en utilisant une méthode « one-pot ». Ces particules ont montré leur potentialité dans le transport de siRNA même si pour l'instant peu d'essais ont été reportés.⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾

Ainsi, l'un des grands avantages des vecteurs synthétiques, par rapport aux méthodes physiques, est qu'ils permettent d'envisager une administration systémique des acides nucléiques. Cependant, alors que les vecteurs viraux ont démontré leur efficacité à délivrer des acides nucléiques dans les cellules de mammifères, la plupart des vecteurs synthétiques ne sont pas encore capable de transporter efficacement leur charge à travers les multiples barrières de l'organisme.⁽³²⁾ On peut néanmoins espérer, raisonnablement, que nombre de ces difficultés puissent être surmontées un jour grâce aux progrès rapides des nanotechnologies et au développement de nano-plateformes multifonctionnelles.

III. INTERET BIOMEDICAL DES NANOPARTICULES A CŒUR INORGANIQUE

III.1. Nanoparticules à cœur inorganique et vectorisation

Les nanoparticules à cœur inorganique utilisées dans le cadre du transport des acides nucléiques sont constituées, le plus souvent, d'un noyau de silice ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾, d'or ⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾ ou d'oxyde de fer ⁽¹¹²⁻¹¹⁶⁾ recouvert par une couche de nature polymérique ^(105, 109, 112) et/ou lipidique ^(106, 115, 116). L'un des atouts majeurs de ces vecteurs leur est conféré par ce cœur inorganique rigide, structurellement stable et organisé, sur lequel on va pouvoir « accrocher » de manière relativement aisée, certes un acide nucléique, mais aussi des molécules pouvant remplir diverses fonctions : protection, furtivité, ciblage, imagerie... On obtient ainsi des nano-plateformes polyvalentes. Généralement la fixation de ces molécules se fait par l'intermédiaire de fonctions pouvant créer des liaisons plus ou moins fortes avec la surface de la particule. Pour ce faire des groupements fonctionnels tels que les amines, les acides carboxyliques, les alcools, les thiols, les phosphonates ou les phosphates, sont couramment utilisés, comme illustré **Figure 19** dans le cas d'une particule d'oxyde de fer.

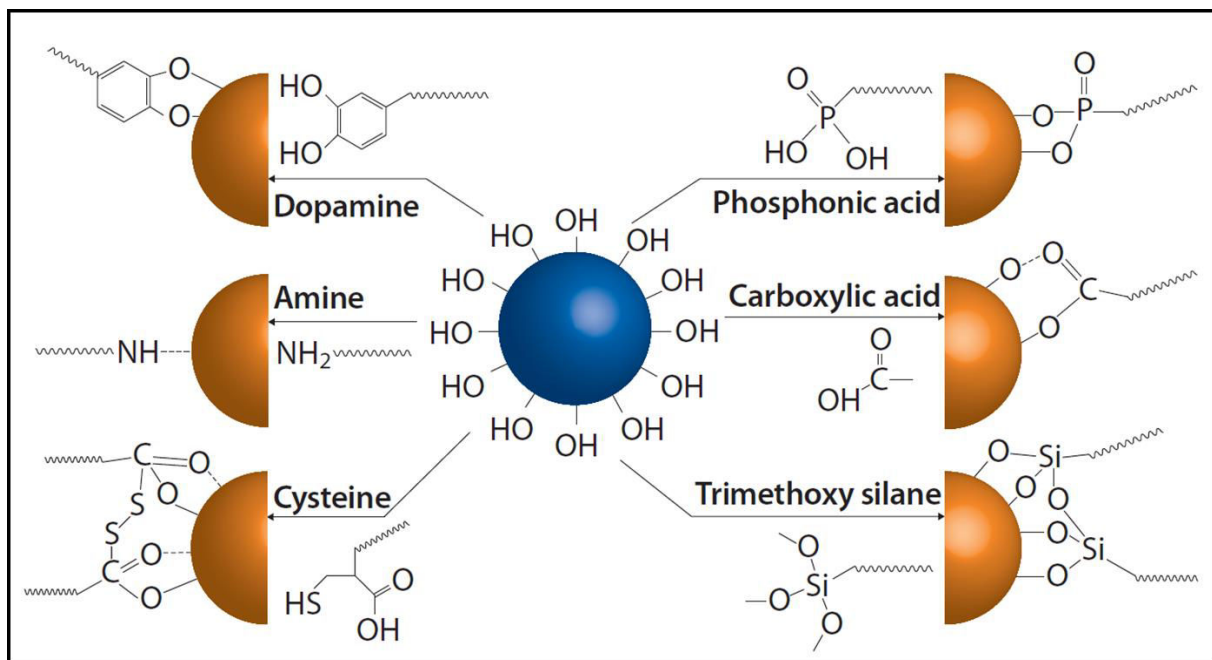


Figure 19: Fonctionnalisation par différents groupements chimiques.
(D'après C. Boyer et al ⁽¹¹⁷⁾)

Les molécules employées pour complexer les acides nucléiques à la surface de la particule sont souvent les mêmes que celles qui sont adoptées dans le cadre de la vectorisation par des nanoparticules organiques à savoir des molécules cationiques (PEI, DOPC, DOPE) permettant d'assurer d'une part la stabilité colloïdale du vecteur et d'autre part la complexation de l'acide

nucléique via des liaisons électrostatiques.^(105, 106, 109, 112, 117) De nombreux polymères ont été testés, mais à l'heure actuelle la plupart des systèmes à base de nanoparticules cationiques qui sont commercialisés pour le transport des acides nucléiques exploitent les propriétés du PEI : PolyMAG (Chemicell, Berlin) PolyMag (Oz Biosciences, Marseille), SEI ou UEI (Ocean NanoTech San Diego). Outre son rôle d'éponge à proton, qui facilite la sortie de l'endosome, il a été montré que le PEI pouvait protéger l'ADN de la dégradation par la désoxyribonucléase de type I (DNase I).⁽¹¹⁸⁾ De nombreuses combinaisons ont été développées pour obtenir un vecteur « idéal » et il est difficile d'en faire une liste exhaustive ou de présenter un schéma général. Il existe cependant des « recettes » que l'on retrouve fréquemment. L'une de ces méthodes met en jeu un procédé multicouche qui est basé sur le dépôt, à la périphérie du cœur inorganique, de molécules ayant des charges opposées.⁽¹¹⁸⁻¹¹⁹⁾ Ainsi, comme illustré **Figure 20**, il est possible de fonctionnaliser une nanoparticule en déposant alternativement une couche de molécules chargées négativement sur une couche de molécules chargées positivement, la stabilité de l'édifice étant alors assurée par les interactions électrostatiques.

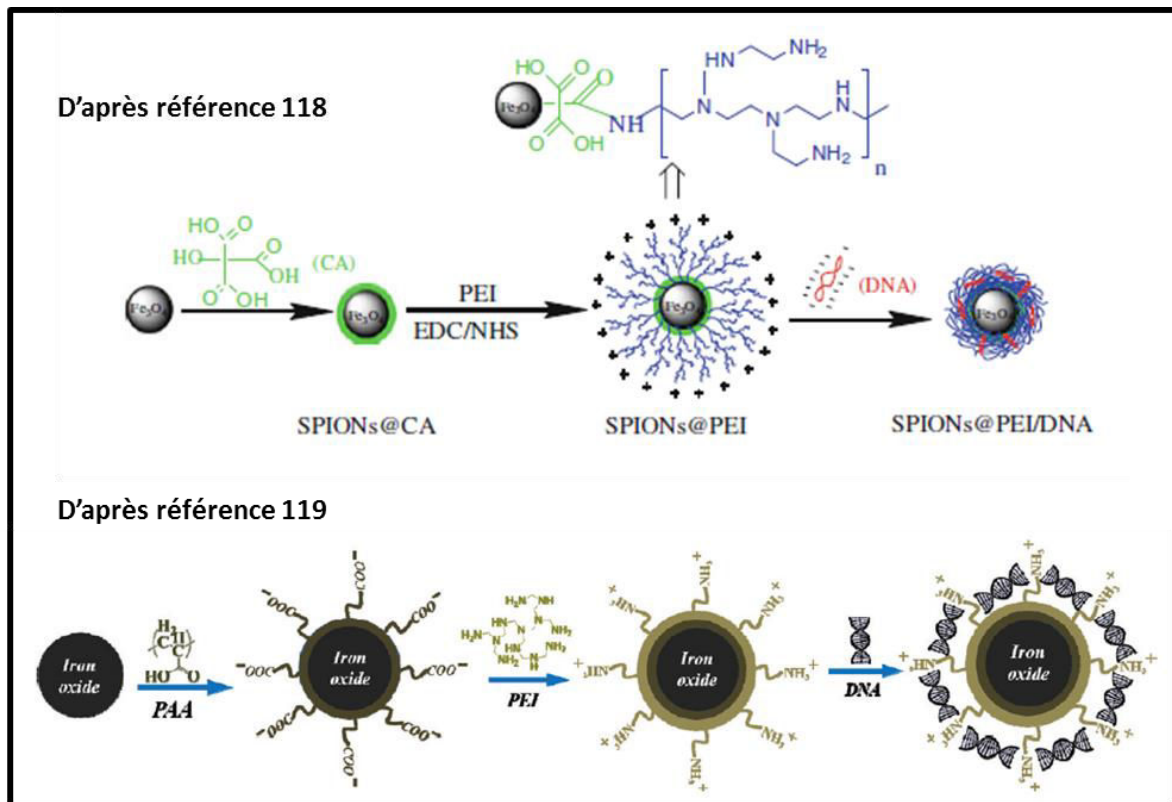


Figure 20: Fonctionnalisation couche par couche. (D'après ⁽¹¹⁸⁻¹¹⁹⁾)

En appliquant ce même principe, Berti et al. ont montré qu'il est possible d'ajouter une couche de PEG afin d'améliorer en parallèle la stabilité colloïdale et la furtivité du complexe.⁽¹²⁰⁾ Pour cela ils sont partis de nanoparticules commerciales fonctionnalisées par du PEI (Ocean Nanotech, Springdale, AK, USA) sur lesquelles ils ont ajouté simultanément un oligonucléotide en simple brin (18 bases) et un polyéthylène glycol d'environ 5 kDa (#130 unités) conjugué à un bloc peptidique constitué de 10 acides glutamiques. Malgré la compétition, vis-à-vis de la complexation avec le PEI, entre les charges négatives des chaînes latérales de l'acide glutamique et celles de l'acide nucléique, ils ont obtenu un bon rendement de complexation de l'ADN et une amélioration considérable de la stabilité colloïdale. En 2010, il a été montré qu'il est possible d'augmenter l'expression d'un gène, transporté par une nanoparticule, par ajout d'un peptide cationique (« cell-penetrating peptide ») complexé à la surface de la particule via des interactions électrostatiques.⁽¹²¹⁾ Là encore, l'acide nucléique (un plasmide) est complexé sur des nanoparticules commerciales, un cœur d'oxyde de fer fonctionnalisées par du PEI (PolyMag, Chemicell, Berlin), par simple incubation à température ambiante pendant 15 minutes ; le peptide est ensuite ajouté, la solution passée au vortex pendant 30 secondes puis suit une période d'incubation de 30 minutes. Dans ces deux articles⁽¹²⁰⁻¹²¹⁾, il a été montré que l'on pouvait optimiser la stabilité colloïdale des complexes ainsi que l'internalisation et l'expression de l'acide nucléique en affinant les ratios entre les divers constituants du système. En résumé, on voit donc qu'avec ce mode de conception « couche par couche », relativement simple à mettre en œuvre, il est possible d'inclure à la périphérie de la nano-plateforme des molécules permettant d'échapper au système réticulo-endothélial, d'accéder à divers mode d'imagerie mais aussi au ciblage de zones spécifiques (organe, cellule, organelles...) en ajoutant par exemple une molécule fluorescente un PEG ou un peptide.

III.2. Nanoparticules à cœur inorganique et ciblage

Le mode d'administration d'un médicament se fait généralement par voie orale ou par injection intraveineuse. La propagation de la molécule thérapeutique dans l'organisme s'effectue ensuite par voie systémique. Cette méthode a pour résultat de délivrer des quantités variables de médicament dans la majorité des organes et tissus et dans de nombreux cas seule une petite quantité de la molécule administrée va atteindre sa cible. Une voie intéressante pour augmenter l'efficacité d'un médicament va être de favoriser son ciblage vers une zone spécifique de l'organisme afin d'y envoyer la dose idéale de molécule thérapeutique. Ceci permet également d'atténuer les effets secondaires hors cible. Cette approche peut être

développée dans le cadre de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires ou le diabète mais un champ d'application particulièrement pertinent est celui de l'oncologie. D'autant plus pertinent, que dans certains cancers, le cancer du poumon par exemple, on observe une grande variabilité clinique entre les patients.⁽¹²²⁾ Par conséquent, pour augmenter l'efficacité d'un traitement, il est nécessaire de le personnaliser. On voit donc bien l'intérêt de concevoir des médicaments faciles à fabriquer, avec des cibles pertinentes et les nanoparticules à cœur inorganique se prêtent tout à fait au développement d'une telle stratégie.

Il y a presque 30 ans, Matsumura et Maeda ont démontré que pour certaines macromolécules, un phénomène de ciblage dit « passif », conduit à leur accumulation dans les tumeurs.⁽¹²³⁾ Ce mécanisme désigné par la suite comme l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) est lié à l'existence d'une perméabilité vasculaire accrue au niveau des zones tumorales. Dans les zones « saines » les macromolécules suffisamment grosses (10-500 nm) ne vont pas pouvoir traverser aisément l'endothélium vasculaire et si elles échappent au système réticulo-endothélial (c'est le cas des macromolécules peu hydrophobes et peu chargées), elles vont alors circuler dans l'organisme pendant des temps assez long et ainsi pouvoir se concentrer dans les tumeurs (*Figure 21*).⁽¹²⁴⁾

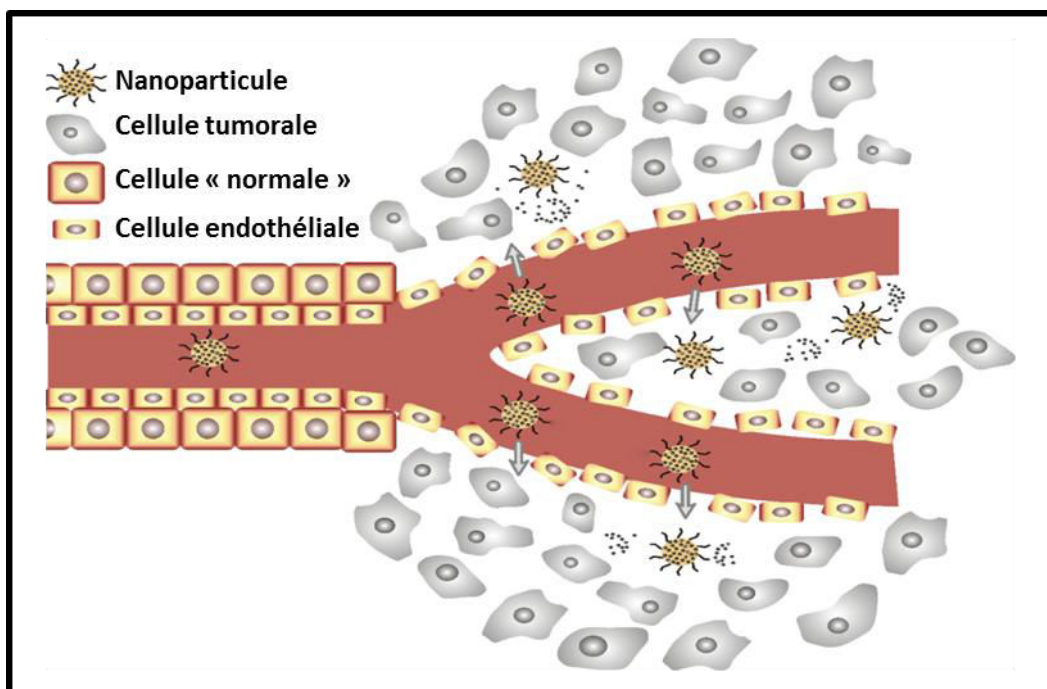


Figure 21: Effet EPR. (D'après R. Dinarvand et al⁽¹²⁵⁾)

Ce mécanisme intéressant conduit généralement à une augmentation de l'accumulation des macromolécules de 20 à 30%, en comparaison avec des molécules thérapeutiques de plus petite taille. Cependant même si cet effet n'est pas négligeable, il reste encore insuffisant pour améliorer de façon significative l'efficacité des macromolécules et dans un cadre thérapeutiques les nano-systèmes doivent être conjugués à des molécules permettant soit d'augmenter l'effet EPR soit d'envisager un ciblage dit « actif ».^(124, 126)

Au sein des molécules susceptibles de remplir cette mission, les peptides sont des candidats intéressants puisqu'ils entrent naturellement en jeu dans de nombreux processus de reconnaissance cellulaire. Parmi les peptides utilisés pour le ciblage de tumeurs il existe ceux comportant le motif RGD (R = arginine, G = glycine, D = acide aspartique). Ce motif est reconnu par les intégrines $\alpha_v\beta_3$, des glycoprotéines ayant un rôle dans la migration et l'adhésion cellulaire lors de la croissance tumorale. Ces molécules sont surexprimées à la surface des cellules tumorales et des cellules endothéliales nouvellement créées lors de la vascularisation de la tumeur. Les intégrines représentent donc une cible de choix pour le développement de nano-systèmes à visée diagnostique ou ayant une action anti-cancéreuse.⁽¹²⁷⁻¹³⁰⁾ Certains auteurs ont aussi combiné plusieurs modes de ciblage, effet EPR, peptide RGD et ciblage magnétique à l'aide d'un aimant placé à proximité de la tumeur en utilisant les différentes propriétés d'une nano-plateforme.⁽¹²⁹⁾ Il est aussi possible de greffer, sur une même plateforme, plusieurs peptides ayant des propriétés complémentaires. Ainsi Pan et al. ont utilisé un peptide RGD et un peptide TAT pour délivrer de la doxorubicine, un agent anticancéreux intercalant de l'ADN, dans le noyau de cellules tumorales dans un modèle murin.⁽¹³⁰⁾ Les peptides TAT sont des séquences peptidiques dérivées de la protéine TAT (« Trans-Activator of Transcription) qui est impliquée dans l'activation de la transcription du virus HIV. Il a été montré que la composition de ce type de peptide facilite l'entrée dans le cytoplasme (Cell Penetrating Peptide) puis dans le noyau des cellules (Nuclear Localization Sequence).⁽¹³¹⁻¹³²⁾ La conjugaison de ces deux peptides a ainsi permis de cibler efficacement le noyau de cellules tumorales et d'obtenir au bout de 17 jours une inhibition de 98% de la croissance tumorale.⁽¹³⁰⁾

Ces dernières années, diverses molécules – peptides, aptamères, vitamines – ont été conjuguées à des nanoparticules pour le ciblage de nombreux récepteurs connus pour être surexprimés dans différents types de cancer : EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), uPAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor), GRPR (Gastrin-Releasing Peptide Receptor), TfR (Transferrin Receptor), FR (Folate Receptor) sigma-2, neuropiline-1, somatostatine ...^(126, 131-132) Cependant à l'heure

actuelle, les thérapies ciblées se heurtent encore à la découverte de ligands pouvant se lier à leur cible avec une grande spécificité et une bonne affinité. Dans une étude récente, menée sur 8 lignées cellulaires de cancer du poumon, des chercheurs ont pu identifier 11 peptides ayant une forte affinité pour ces cellules.⁽¹²²⁾ Pour cela ils ont utilisé la technique du « Phage display », qui, un peu à l'image de la technologie SELEX pour les aptamères, permet à partir de bibliothèques aléatoires de sélectionner un peptide ayant une forte affinité pour une cible donnée, dans ce cas la membrane plasmique de cellules cancéreuses. La tétramérisation de ces peptides a permis d'obtenir, pour certains, une affinité pour les cellules de l'ordre du picomolaire avec une spécificité vis-à-vis de cellules cancéreuses pouvant être jusqu'à 400 fois supérieure à celle observée pour des cellules bronchiales « saines ». La généralisation de cette technique, en multipliant les bibliothèques et les lignées cellulaires, permettra certainement d'obtenir des peptides ciblant des cellules avec une très grande spécificité.

III.3. Utilisation des propriétés physiques des nanoparticules à cœur inorganique

La théranostique, contraction de thérapie et diagnostic, est un nouveau paradigme apparu en nano-médecine il y a une dizaine d'années.⁽¹³³⁻¹³⁴⁾ Des nanoparticules conçues à l'origine dans un but thérapeutique pour l'administration ciblée de médicament ou l'imagerie sont maintenant utilisées simultanément comme outil de diagnostic et de traitement de la maladie. Ce nouveau concept s'applique particulièrement aux nanoparticules à cœur inorganique dont les propriétés physiques peuvent être utilisées en imagerie. Ainsi les nanoparticules d'oxyde de fer sont utilisées cliniquement en imagerie par résonance magnétique (IRM) alors que le potentiel des nanoparticules d'or a été démontré en imagerie optique ou tomographie axiale assistée par ordinateur (Computed Tomography (CT), ou encore « Scanner »).⁽¹³⁵⁾

Le scanner est une technique d'imagerie médicale basée sur l'absorption des rayons X. L'image est produite par traitement informatique des données acquises pour différentes coupes et selon différents angles. Cette technique permet d'obtenir une très bonne visualisation du squelette en raison du contraste entre les zones osseuses très denses et les tissus environnants beaucoup plus perméables aux rayons X. Il est cependant plus difficile de différencier sur une image différents tissus mous ayant des propriétés d'absorption similaires. Dans ce cas, pour améliorer la qualité des images, on fait actuellement appel à un agent de contraste iodé. L'iode a été choisi pour son fort coefficient d'absorption des rayons X, mais la période d'élimination des petites molécules iodées étant assez rapide, il n'est pas possible d'avoir accès à des temps d'observation très long. De plus ces agents iodés peuvent présenter

une certaine toxicité rénale et déclencher des réactions allergiques violentes (choc anaphylactique) chez certains patients en raison des doses importantes et répétées nécessaires à l'obtention d'un bon contraste. Pour ces raisons, on observe un intérêt croissant dans le développement d'agent de contrastes alternatifs élaborés à partir d'éléments chimiques possédant un masse atomique élevée (Or, Bismuth, Ytterbium) ; ces éléments étant connus pour avoir une absorption élevée des rayonnements X.⁽¹³⁶⁻¹³⁷⁾ Ainsi de nombreuses études ont été menées reportant l'utilisation de nanoparticules d'or possédant des aptitudes à l'imagerie X supérieures à celles des molécules iodées utilisées à l'heure actuelle (**Figure 22**).⁽¹³⁷⁻¹⁴¹⁾

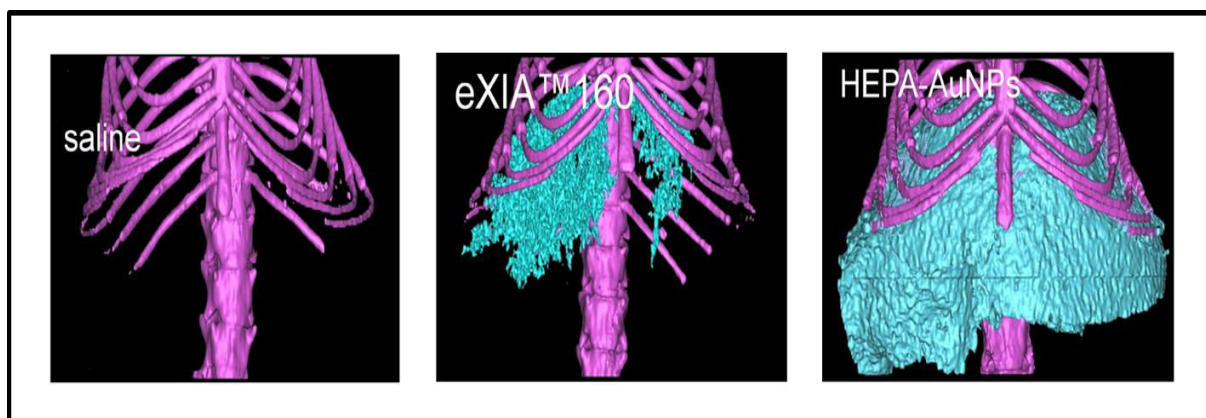


Figure 22: Images 3D (microCT) d'un foie de souris 2h après l'injection d'une solution saline, d'un agent de contraste iodé (eXIA™ 160, 800 mg d'iode/kg) et de nanoparticules d'or (HEPA-AuNPs, 250 mg Au/kg). (D'après H. Lusic et al⁽¹³⁷⁾)

Ces bons résultats sont liés aux propriétés particulières des nanoparticules utilisées. Tout d'abord, l'or, de par son numéro atomique élevé, possède un coefficient massique d'atténuation des rayons X plus de 2.5 fois supérieur à celui de l'iode ce qui lui confère un pouvoir contrastant plus important.^(136, 139-140) De plus, les nanoparticules, lorsqu'elles sont revêtues d'une couche de PEG, vont pouvoir circuler beaucoup plus longtemps dans l'organisme que les petites molécules iodées.⁽¹³⁹⁻¹⁴⁰⁾ Ainsi Kim & al ont montré dans une étude que leurs particules ont un temps de circulation dans le sang supérieur à 4 heures alors que la molécule iodée utilisée à titre de comparaison à un temps de circulation inférieur à 10 minutes.⁽¹³⁹⁾ Enfin l'un des avantages des nanoparticules est qu'elles vont pouvoir s'accumuler dans les tumeurs par ciblage passif via l'effet EPR augmentant ainsi le contraste dans des zones tumorales et permettant d'envisager une détection précoce.^(136, 137, 140, 141)

Dans le traitement des cancers, une autre propriété intéressante des nanoparticules d'or est qu'elles peuvent exalter localement les effets de la radiothérapie permettant ainsi d'adapter spécifiquement la dose de rayonnement à la tumeur tout en diminuant les effets secondaires.⁽¹⁴¹⁻¹⁴²⁾ D'après Hainfeld, l'absorption de rayons X par une particule d'or entraîne la libération d'électrons de différentes énergies ayant un pouvoir de pénétration allant de quelques nanomètres à quelques microns.⁽¹⁴¹⁾ En complémentarité de l'action des rayons X, les électrons ainsi libérés vont entraîner des phénomènes d'ionisations, la création de radicaux libres et provoquer des dommages irréversibles aux cellules cancéreuses. D'autres synergies utilisant les propriétés physiques des nanoparticules d'or ont été développées. J. West et N. Halas ont ouvert la voie de la thérapie photothermique en synthétisant des nanoparticules de type cœur-coquille pouvant absorber dans le proche infrarouge.⁽¹⁴³⁻¹⁴⁴⁾ Les propriétés optiques de leurs particules, constituées d'un cœur de silice recouvert par une coquille d'or, peuvent être modulées en jouant sur le diamètre du cœur et l'épaisseur de la coquille de façon à absorber la lumière dans le proche infrarouge. Lorsque des nanoparticules d'or sont excitées à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption, les électrons du métal vont être amenés à un niveau énergétique plus élevé. Le retour des électrons à un niveau énergétique plus bas va conduire à la production de chaleur via des phénomènes non radiatifs. L'augmentation de la température des nanoparticules ainsi générée va alors entraîner la mort des cellules dans lesquelles elles ont été internalisées. Ce phénomène est appelé hyperthermie. Le ciblage d'une zone tumorale par de telles nanoparticules permet donc d'envisager la destruction des cellules cancéreuses consécutivement à l'irradiation par une longueur d'onde appropriée, ici dans le proche infrarouge. Cette fenêtre optique est particulièrement intéressante pour des applications biomédicales étant donné la plus faible absorption des molécules biologiques dans cette gamme de longueur d'onde.^(140, 144) Ces particules sont actuellement développées par la société Nanospectra Biosciences et un essai clinique est en cours dans le cadre du traitement du cancer du poumon. Cette propriété des nanoparticules d'or a été mise à profit par Hainfeld et son équipe en combinaison avec un traitement par radiothérapie.⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁶⁾ Leurs résultats démontrent une réelle synergie entre l'hyperthermie et la radiothérapie permettant d'envisager une réduction des doses de rayons X pour une efficacité thérapeutique augmentée.⁽¹⁴⁶⁾

L'hyperthermie peut être également provoquée à l'aide de nanoparticules magnétiques constituées par des oxydes de fer tels que la maghémite ou la magnétite. Dans ce cas le phénomène physique responsable de l'échauffement des particules n'est pas provoqué par un

rayonnement dans le proche infrarouge mais par un champ magnétique alternatif.⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁸⁾ Dans une étude clinique réalisée entre 2005 et 2009 sur 66 patients atteints par un glioblastome, Maier-Hauff & al ont démontré que la conjugaison de la thermothérapie et de la radiothérapie permettait de prolonger de 6 mois, valeur moyenne obtenue en comparaison avec la seule radiothérapie, la durée de vie des patients atteints et ce en appliquant des doses réduites de rayons X.⁽¹⁴⁸⁾

Même si les protocoles actuels nécessitent encore d'être adaptés, les progrès actuels dans la conception des nanoparticules permettent d'envisager des nano-plateformes multifonctionnelles conçues pour le ciblage, la vectorisation, l'imagerie multimodale ou encore le traitement des cancers par radiothérapie et/ou hyperthermie.⁽¹⁴⁹⁻¹⁵⁰⁾

Une des particularités physiques des nanoparticules de maghémite utilisées dans le laboratoire est liée à leurs propriétés magnétiques. De par leur taille, les nanoparticules d'oxyde de fer telles la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou la magnétite (Fe_3O_4) ont un comportement superparamagnétique et vont pouvoir s'aimanter en présence du champ magnétique généré par un aimant permanent. Cette propriété a naturellement été mise à profit pour le développement de nano-vecteurs pouvant être guidés à l'aide d'un aimant. Comme nous l'avons vu précédemment dans ce chapitre, la mise au point d'un système sûr et efficace pour le transport des acides nucléiques fait toujours l'objet d'intenses recherches. Un des principaux obstacles est d'amener l'acide nucléique en suffisamment grande quantité au niveau des cellules/tissus cibles. La magnétofection, basée sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques pouvant transporter des acides nucléiques sous l'influence d'un gradient de champ magnétique, permet de combiner les avantages des méthodes physiques et des vecteurs synthétiques.⁽¹⁵¹⁾ Dans la majorité des applications, l'association de la nanoparticule magnétique avec l'acide nucléique, ou le vecteur génique (polyplexe, lipoplexe, virus), se fait par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques ou hydrophobes.⁽¹⁵¹⁻¹⁵²⁾ Les complexes formés sont attirés à la périphérie des cellules/tissus à l'aide d'un aimant permanent et les nanoparticules sont internalisées par l'intermédiaire des mécanismes naturels que sont l'endocytose la phagocytose ou encore la macropinocytose (**Figure 23**).

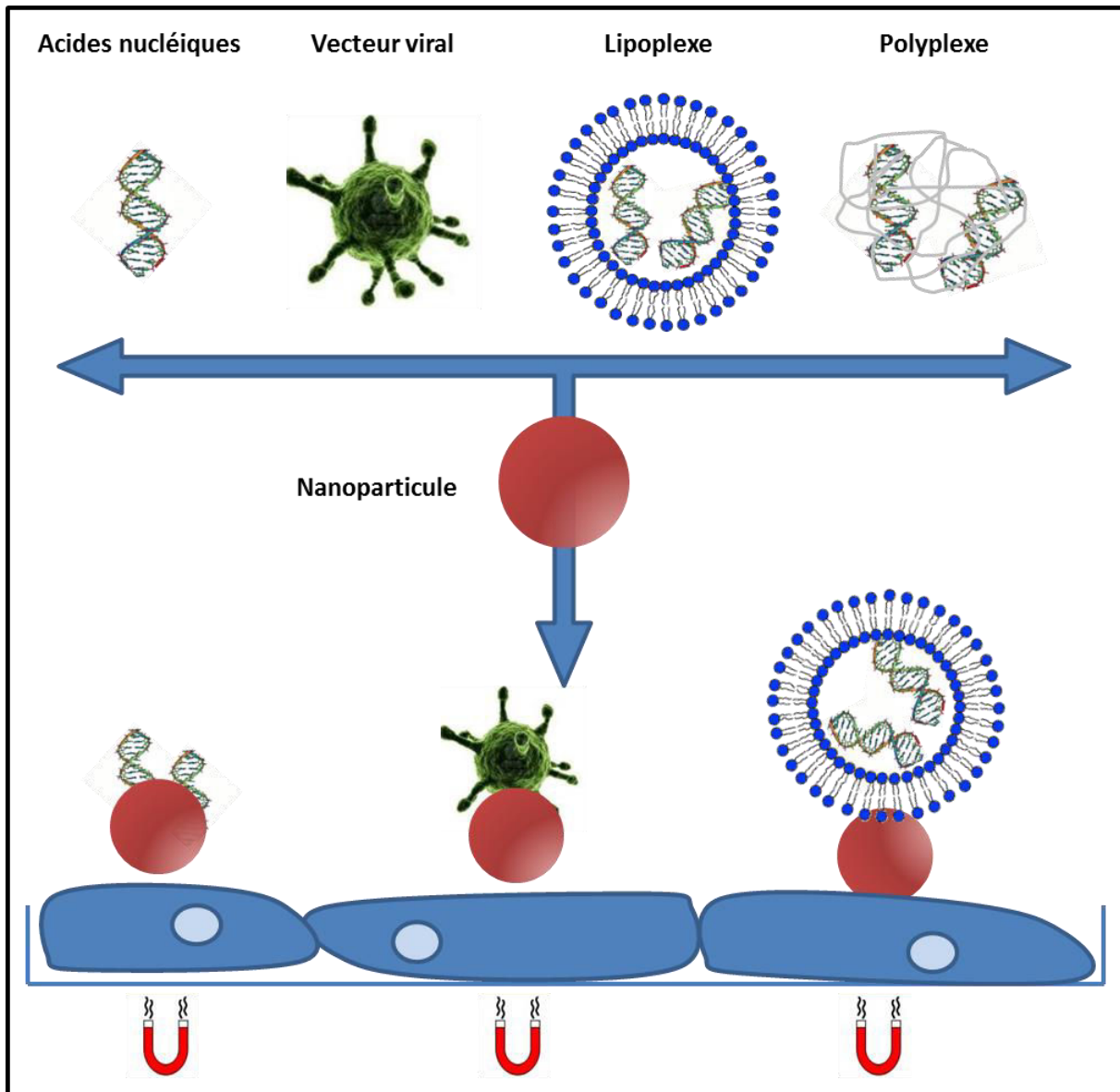


Figure 23: Schéma de principe de la magnétofection

Suite à la commercialisation de nanoparticules soit polyvalentes, pour le transport de tous types d'acides nucléiques, soit plus spécialisées, pour le transport de siRNA ou de vecteurs viraux, la magnétofection a fait preuve de son efficacité *in vitro* pour de nombreuses lignées cellulaires ce qui en fait un bon outil en biologie.⁽¹⁵¹⁻¹⁵²⁾ De même *in vivo* il existe de nombreuses publications reportant l'utilisation de nanoparticules magnétiques pour délivrer des acides nucléiques.⁽¹⁵²⁾ L'application de la magnétofection *in vivo* est cependant limitée à des zones superficielles ou peu profondes, quelques dizaines de mm, par le fait qu'il est actuellement très difficile de générer un gradient de champ permettant de cibler une zone précise à l'intérieur d'un organisme à l'aide d'un aimant permanent (**Figure 24A**).⁽¹⁵³⁾

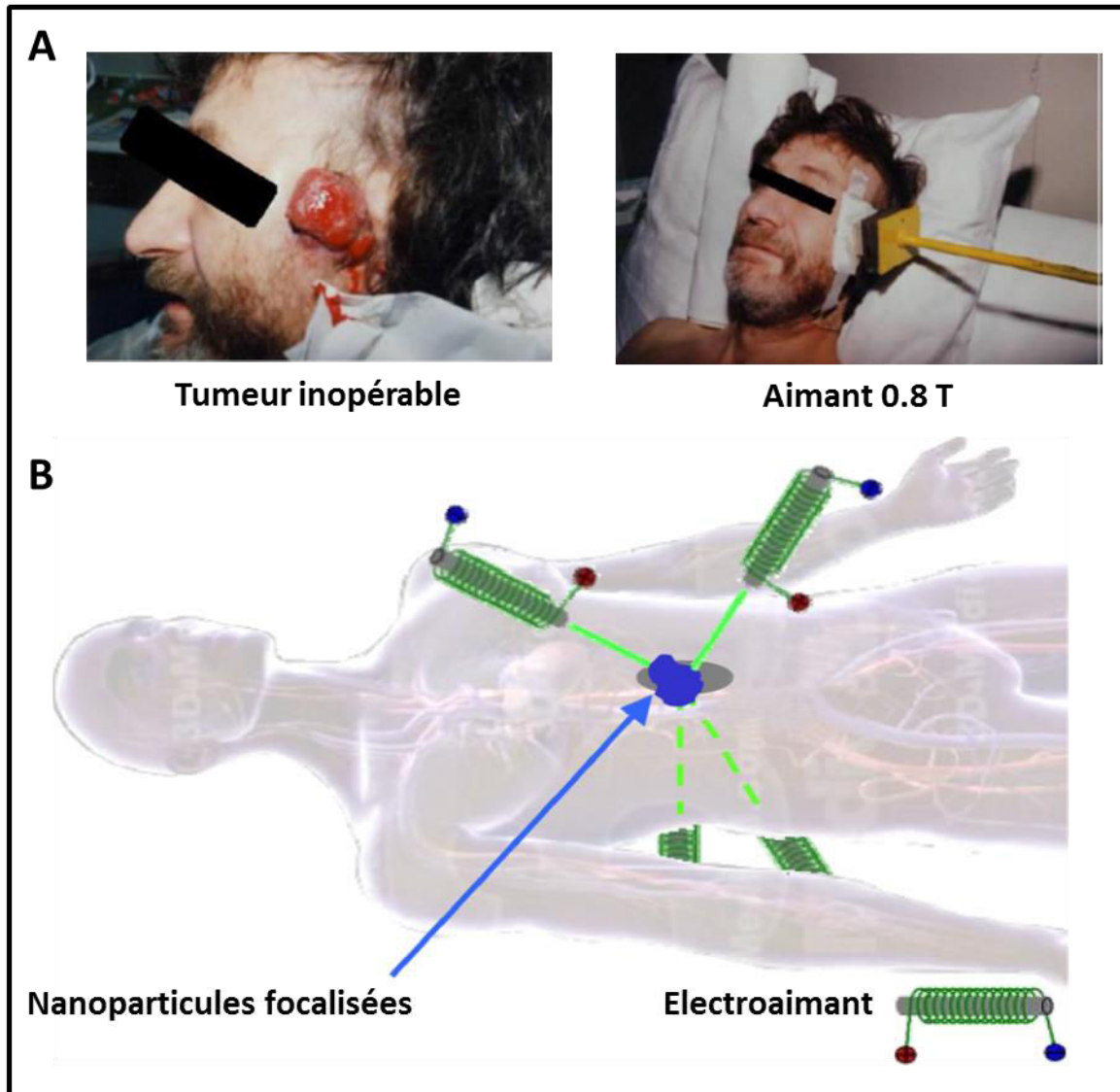


Figure 24: Ciblage magnétique in vivo. (D'après B. Shapiro et al ⁽¹⁵³⁾)

Une solution pour atteindre les zones profondes de l'organisme peut alors être d'implanter chirurgicalement un aimant lorsque cela est possible. Cependant l'idéal serait de pouvoir créer un piège magnétique en combinant spatialement des aimants autour d'un patient afin d'attirer les nanoparticules dans une zone ciblée. Malheureusement il semblerait que ce montage soit théoriquement impossible à réaliser à l'aide de champs magnétiques statiques.⁽¹⁵³⁾ Selon B. Shapiro une façon de contourner cette loi serait de faire varier le champ magnétique spatialement et temporellement de façon à induire un contrôle dynamique du ferrofluide injecté (**Figure 24B**).⁽¹⁵³⁾ Les travaux qu'il mène avec son équipe sont dirigés dans ce sens mais ne sont encore qu'à la phase de modélisation et de nombreuses étapes doivent franchies avant l'utilisation clinique de tels systèmes.

Nous avons vu dans ce chapitre que durant ces dernières décennies, les multiples travaux portant sur l'étude de la structure des acides nucléiques, conjugués au développement spectaculaire des connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire de la cellule, ont permis d'envisager, à moyen terme, l'utilisation thérapeutique des oligonucléotides. L'une des dernières barrières à laquelle se heurte l'emploi d'oligonucléotide en tant que médicament est le développement de vecteurs efficaces pouvant transporter leur charge à travers les multiples barrières de l'organisme. Afin de surmonter cette difficulté, l'une des approches actuelles est le développement de nano-plateformes multifonctionnelles permettant, certes, la vectorisation d'un oligonucléotide, mais aussi de remplir d'autres fonctions telles que le ciblage ou l'imagerie multimodale. Les nanoparticules d'oxyde de fer, déjà utilisées en IRM, sont une des voies possibles permettant de répondre à cette problématique. Au-delà de leur potentiel thérapeutique, de telles particules sont aussi un formidable outil pour la recherche en biologie moléculaire. Une partie de ce travail de thèse a donc été consacrée à l'élaboration et la caractérisation d'un nanovecteur à base de maghémite, pouvant délivrer des oligonucléotides dans des cellules en culture. Pour autant, même si beaucoup de mécanismes cellulaires impliquant les acides nucléiques ont été élucidés, il reste néanmoins de nombreuses énigmes dont la résolution nécessite encore des études structurales *in vitro*. Nous verrons ainsi dans le chapitre 2 comment la spectroscopie optique peut faire avancer l'état des connaissances sur les interactions entre acides nucléiques et protéines.

Références bibliographiques

1. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 280-284.
2. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 285-288.
3. Henry S, Stecker K, Brooks D, Monteith D, Conklin B, Bennett F. Chemically modified oligonucleotides exhibit decreased immune stimulation in mice. *JPET* **2000**; 292: 468-479.
4. Lind KE, Mohan V, Manoharan M, Ferguson D. Structural characteristics of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified nucleic acids from molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res* **1998**; 26: 3694-3699.
5. Zon G. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides: introductory concepts and possible molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol Lett.* **1995**; 82/83: 419-424.
6. Berger CW Jr, Sultatos LG. The effects of the phosphorothioate insecticide fenitrothion on mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of estradiol. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1997**; 37: 150-157.
7. Osada T, Uehara H, Kim H, Ikai A. mRNA analysis of single living cells. *J. Nanobiotechnology* **2003**; 1: 2.

8. Giovannangeli C, Diviacco S, Labrousse V, Gryaznov S, Charneau P, Helene C. Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides: The integrated HIV-1 provirus as a target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**; 94: 79–84.
9. Boulware SB, Christensen LA, Thames H, Coghlan L, Vasquez KM, Finch RA. Triplex-forming oligonucleotides targeting c-MYC potentiate the anti-tumor activity of gemcitabine in a mouse model of human cancer. *Mol. Carcinog.* **2013**; DOI: 10.1002/mc.22026.
10. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**; 391: 806-811.
11. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **2003**; 425: 415-419.
12. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**; 409: 363-366.
13. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **2000**; 404: 293-296.
14. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. *Science* **2001**; 293: 1146-1150.
15. Zhou J, Ka-To S, Burnett JC, Rossi JJ. Nanoparticle-based delivery of RNAi therapeutics : progress and challenges. *Pharmaceuticals* **2013**; 6: 85-107.
16. Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**; 346: 818-822.
17. Toulmé J-J, Giegé R. Les aptamères: des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection *in vitro*. *Médecine/Sciences* **1998**; 14: 155-166.
18. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**; 249: 505-510.
19. Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acids aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.* **2011**; 18: 4206-4214.
20. Viores SA. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2006**; 1: 263-268.
21. Famulok M, Hartig JS, Mayer G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chem. Rev.* **2007**; 107: 3715-3743.
22. Ahmad MZ, Akhter S, Mallik N, Anwar M, Tabassum W, Ahmad FJ. Application of decoy oligonucleotides as novel therapeutic strategy: a contemporary overview. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2013**; 10: 71-84.
23. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **2000**; 408: 740-745.
24. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**; 98: 9237-9242.
25. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **1995**; 374: 546-549.
26. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α /beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* **2001**; 31: 2154-2163.
27. Carpentier AF. Immunothérapie des cancers par oligonucléotides immunostimulants. *Médecine/Sciences* **2005**; 21: 73-77.

28. Kline JN. Eat dirt : CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2007**; 4: 283-288.
29. Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* **2012**; 22: 77-89.
30. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* **2012**; 1:27.
31. Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee RJ. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J.* **2009**; 11: 195-203.
32. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**; 15: 541-555.
33. Gaynor JW, Campbell BJ, Cosstick R. RNA interference: a chemist's perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2010**; 39: 4169-4181.
34. Prakash TP. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Chem. Biodivers.* **2011**; 8: 1616-1641.
35. Deleavey GF, Damba MJ. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem. Biol.* **2012**; 19: 937-954.
36. Sen M, Thomas SM, Kim S, Yeh JI, Ferris RL, Johnson JT, Duvvuri U, Lee J, Sahu N, Joyce S, Freilino ML, Shi H, Li C, Ly D, Rapireddy S, Etter JP, Li P-K, Wang L, Chiosea S, Seethala RR, Gooding WE, Chen X, Kaminski N, Pandit K, Johnson DE, Grandis JR. First-in-Human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov.* **2012**; 2: 694-705.
37. Kay MA. State-of-the-art gene based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **2011**; 316-328.
38. Ayuni EL, Gazdhar A, Giraud M-N, Kadner A, Gugger M, Cecchini M, Caus T, Carrel TP, Schmid RA, Tevæarai HT. In vivo electroporation mediated gene delivery to the beating heart. *PLoS One* **2010**; 5: e14467.
39. Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, Hannaman D, Gardiner DF, Dugin DP, Boente-Carrera M, Vittorino R, Caskey M, Andersen J, Huang Y, Cox JH, Tarragona-Fiol, Gill DK, Cheeseman H, Clark L, Dally L, Smith C, Schmidt C, Park HH, Kopycinski JT, Gilmour J, Fast P, Bernard R, Ho DD. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One* **2011**; 6: e19252.
40. Rhodes K, Clark I, Zatcoff M, Eustaquio T, Hoyte KL, Koller MR. Cellular Laserfection. *Methods Cell Biol.* **2007**; 82: 309-333.
41. Tsukakoshi M, Kurata S, Nomiya Y, Ikawa Y, Kasuya T. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Appl. Phys. B* **1984**; 35: 135-140.
42. Fechtmeier M, Boylan JF, Parker S, Siskin JE, Patel GL, Zimmer SG. Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**; 84: 8463-8467.
43. Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **1996**; 7: 1339-1346.
44. Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med. Biol.* **1997**; 23: 953-959.
45. Mulvana H, Eckersley RJ, Tang MX, Pankhurst Q, Stride E. Theoretical and experimental characterization of magnetic microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* **2012**; 38: 864-875.
46. Zolocheska O, Figueiredo ML. Advances in sonoporation strategies for cancer. *Front. Biosci. (Schol Ed)* **2012**; 4: 988-1006.
47. Wrenn SP, Dicker SM, Small EF, Dan NR, Mleczko M, Schmitz G, Lewin PA. Bursting bubbles and bilayers. *Theranostics* **2012**; 2: 1140-1159.
48. Fan Z, Liu H, Mayer M, Deng CX. Spatiotemporally controlled single cell sonoporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**; 109: 16486-16491.

49. Rychak JJ, Klivanov AL. Nucleic acid delivery with microbubbles and ultrasound. *Adv. Drug Deli. Rev.* **2014**; 72: 82-93.
50. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **1987**; 327: 70-73.
51. Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Sletten M, Sanford JC. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**; 85: 4305-4309.
52. Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga P. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**; 85: 8502-8505.
53. Mousavi M, Mousavi A, Habashi AA, Dehsara B. Genetic transformation of date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. 'Estamaram') via particle bombardment. *Mol. Biol. Rep.* **2014**; DOI 10.1007/s11033-014-3720-6.
54. Russell J, Roy MK, Sanford JC. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* **1992**; 98: 1050-1056.
55. Uchida M, Li XW, Mertens P, Alpar HO. Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**; 1790: 754-764.
56. Yang N-S, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**; 87: 9568-9572.
57. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, De Vit MJ, Mc Elligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**; 88: 2726-2730.
58. Ginsberg BA, Gallardo HF, Rasalan TS, Adamow M, Mu Z, Tandon S, Bewkes BB, Roman R-A, Chapman PB, Schwartz GK, Carvajal RD, Panageas KS, Terzulli SL, Houghton AN, Yuan JD, Wolchok JD. Immunologic response to xenogeneic gp100 DNA in melanoma patients: comparison of particle-mediated epidermal delivery with intramuscular injection. *Clin. Canc. Res.* **2010**; 16: 4057-4065.
59. Abe J, Furumoto H, Yoshida K, Kato T, Saijo Y, Irahara M. Gene gun-mediated skin transfection with FL gene suppresses the growth of murine fibrosarcoma. *J. Med. Invest.* **2011**; 58: 39-45.
60. Mao C-P, He L, Tsai Y-C, Peng S, Kang TH, Pang X, Monie A, Hung C-F, Wu T-C. In vivo microRNA-155 expression influences antigen-specific T cell-mediated immune responses generated by DNA vaccination. *Cell Biosci.* **2011**; 1: 3.
61. Wu A, Zeng Q, Kang TH, Peng S, Roosinovich E, Pai SI, Hung C-F. Innovative DNA vaccine for human papillomavirus (HPV)-associated head and neck cancer. *Gene Ther.* **2011**; 18: 304-312.
62. Boudreau EF, Josleyn M, Ullman D, Fisher D, Dalrymple L, Sellers-Myers K, Loudon P, Rusnak J, Rivard R, Schmaljohn C, Hooper JW. A phase 1 clinical trial of hantaan virus and puumala virus M-segment DNA vaccines for hemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine* **2012**; 30: 1951-1958.
63. Davtyan H, Ghochikyan A, Movsesyan N, Ellefsen B, Petrushina I, Cribbs DH, Hannaman D, Evans CF, Agadjanyan MG. Delivery of a DNA vaccine for Alzheimer's disease by electroporation versus gene gun generates potent and similar immune responses. *Neurodegener. Dis.* **2012**; 10: 261-264.
64. Joseph SK, Sambanthamoorthy S, Dakshinamoorthy G, Munirathinam G, Ramaswamy K. Protective immune responses to biolistic DNA vaccination of *Brugia malayi* abundant larval transcript-2. *Vaccine* **2012**; 30: 6477-6482.

65. Uchida M, Natsume H, Kishino T, Seki T, Ogihara M, Juni K, Kimura M, Morimoto Y. Immunization by particle bombardment of antigen-loaded poly-(DL-lactide-co-glycolide) microspheres in mice. *Vaccine* **2006**; 24: 2120-2130.
66. Martin-Ortigosa S, Wang K. Proteolistics : a biolistic method for intracellular delivery of proteins. *Transgenic Res.* **2014**; 23: 743-756.
67. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**; 66: 2873-2896.
68. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**; 84: 7413-7417.
69. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsay P, Martin M, Felgner PL. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **1994**; 269: 2550-2560.
70. Cao A, Briane D, Coudert R, Vassy J, Lievre N, Olsman E, Tamboise E, Salzmann JL, Rigaut JP, Taillandier E. Delivery and pathway in MCF7 cells of DNA vectorized by cationic liposomes derived from cholesterol. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**; 10: 369-380.
71. Desigaux L, Sainlos M, Lambert O, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Vigneron JP, Lehn P, Lehn JM, Pitard B. Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**; 104: 16534-16539.
72. Sakashita M, Mochizuki S, Sakurai K. Hepatocyte-targeting gene delivery using a lipoplex composed of galactose-modified aromatic lipid synthesized with click chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**; 22: 5212-5219.
73. Hui SW, Langner M, Zhao YL, Ross P, Hurley E, Chan K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys. J.* **1996**; 71: 590-599.
74. Mochizuki S, Kanegae N, Nishina K, Kamikawa Y, Koiwai K, Masunaga H, Sakurai K. The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**; 1828: 412-418.
75. Sternberg B, Sorgi FL, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* **1994**; 356: 361-366.
76. Rädler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR. Structure of DNA-cationic liposomes complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **1997**; 275: 810-814.
77. May S, Ben-Shaul A. DNA-lipid complexes: stability of honeycomb-like and spaghetti-like structures. *Biophys. J.* **1997**; 73: 2427-2440.
78. Koltover I, Salditt T, Rädler JO, Safinya CR. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **1998**; 281: 78-81.
79. Harries D, May S, Gelbart WM, Ben-Shaul A. Structure, stability, and thermodynamics of lamellar DNA-lipid complexes. *Biophys. J.* **1998**; 75: 159-173.
80. Hsu WL, Chen HL, Liou W, Lin HK, Liu WL. Mesomorphic complexes of DNA with the mixtures of a cationic surfactant and a neutral lipid. *Langmuir* **2005**; 21: 9426-9431.
81. Hsu WL, Li YC, Chen HL, Liou W, Jeng US, Lin HK, Liu WL, Hsu CS. Thermally-induced order-order transition of DNA-cationic surfactant complexes. *Langmuir* **2006**; 22: 7521-7527.
82. Allain V, Bourgaux C, Couvreur P. Self-assembled nucleolipids : from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *Nucleic Acids Res.* **2012**; 40: 1891-1903.

- 83.** Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther.* **2001**; 8: 677-686.
- 84.** Koynova R, Wang L, Mac Donald RC. An intracellular lamellar-nonlamellar phase transition rationalizes the superior performance of some cationic lipid transfection agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**; 103: 14373-14378
- 85.** Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **1987**; 262: 4429-4432.
- 86.** Howell DP, Krieser RJ, Eastman A, Barry MA. Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection. *Mol. Ther.* **2003**; 8: 957-963.
- 87.** Meneksedag-Erol D, Tang T, Uludag H. Molecular modeling of polynucleotide complexes. *Biomaterials* **2014**; 35: 7068-7076.
- 88.** Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, 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. USA* **1995**; 92: 7297-7301.
- 89.** Lee KY, Kwon IC, Kim YH, Jo WH, Jeong SY. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J. Control. Release* **1998**; 51: 213-220.
- 90.** Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y. Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation based on metal coordination. *J. Control. Release* **2002**; 83: 287-302.
- 91.** Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**; 4: 581-593.
- 92.** Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**; 58: 32-45.
- 93.** Sonawane ND, Szoka FC Jr, Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **2003**; 278: 44826-44831.
- 94.** Benjaminsen RV, Matthebjerg MA, Henriksen JR, Moghimi SM, Andresen TL. The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Mol. Ther.* **2013**; 21: 149-157.
- 95.** Taratula O, Garbuzenko OB, Kirkpatrick P, Pandya I, Savla R, Pozharov VP, Minko T. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release* **2009**; 140: 284-293.
- 96.** Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**; 93: 4897-4902.
- 97.** Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem. Commun. (Camb.)* **2006**: 2362-2364.
- 98.** Arima H, Yoshimatsu A, Ikeda H, Ohyama A, Motoyama K, Higashi T, Tsuchiya A, Niidome T, Katayama Y, Hattori K, Takeuchi T. Folate-PEG-appended dendrimer conjugate with α -cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. *Mol. Pharm.* **2012**; 9: 2591-2604.
- 99.** Liu C, Liu X, Rocchi P, Qu F, Iovanna JL, Peng L. Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjug. Chem.* **2014**; 25: 521-532.
- 100.** Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**; 85: 427-443.

- 101.** Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine* **2013**; 9: 474-491.
- 102.** Xue HY, Narvikar M, Zhao JB, Wong HL. Lipid encapsulation of cationic polymers in hybrid nanocarriers reduces their non-specific toxicity to breast epithelial cells. *Pharm. Res.* **2013**; 30: 572-583.
- 103.** Desai PR, Marepally S, Patel AR, Voshavar C, Chaudhuri A, Singh M. Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *J. Control. Release* **2013**; 170: 51-63.
- 104.** Shi J, Xu Y, Xu X, Zhu X, Pridgen E, Wu J, Votruba AR, Swami A, Zetter BR, Farokhzad OC. Hybrid lipid-polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. *Nanomedicine* **2014**; 10: 897-900.
- 105.** Xia T, Kovoichich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, Zink JI, Nel AE. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano* **2009**; 3: 3273-3286.
- 106.** Ashley CE, Carnes EC, Epler KE, Padilla DP, Phillips GK, Castillo RE, Wilkinson DC, Wilkinson BS, Burgard CA, Kalinich RM, Townson JL, Chackerian B, Willman CL, Peabody DS, Wharton W, Brinker CJ. Delivery of small interfering RNA by peptide-targeted mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers. *ACS Nano* **2012**; 6: 2174-2188.
- 107.** Buchman YK, Lellouche E, Zigdon S, Bechor M, Michaeli S, Lellouche JP. Silica nanoparticles and polyethyleneimine (PEI)-mediated functionalization: a new method of PEI covalent attachment for siRNA delivery applications. *Bionconjug. Chem.* **2013**; 24: 2076-2087.
- 108.** Salem AK, Searson PC, Leong KW. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nat. Mater.* **2003**; 2: 668-671.
- 109.** Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**; 100: 9138-9143.
- 110.** Huo S, Jin S, Ma X, Xue X, Yang K, Kumar A, Wang PC, Zhang J, Hu Z, Liang XJ. Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry. *ACS Nano* **2014**; 8: 5852-5862.
- 111.** Chen Z, Zhang L, He Y, Li Y. Sandwich-type Au-PEI/DNA/PEI-Dexa nanocomplex for nucleus-targeted gene delivery in vitro and in vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**; 6: 14196-14206.
- 112.** Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, Gänsbacher B, Plank C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **2002**; 9: 102-109.
- 113.** Xiang JJ, Tang JQ, Zhu SG, Nie XM, Lu HB, Shen SR, Li XL, Tang K, Zhou M, Li GY. IONP-PLL: a novel non-viral vector for efficient gene delivery. *J. Gene Med.* **2003**; 5: 803-817.
- 114.** Mykhaylyk O, Antequera YS, Vlaskou D, Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat. Protocol.* **2007**; 2: 2391-2411.
- 115.** Jiang S, Eltoukhy AA, Love KT, Langer R, Anderson DG. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery. *Nano Lett.* **2013**; 13: 1059-1064.
- 116.** Biswas S, Gordon LE, Clark GJ, Nantz MH. Click assembly of magnetic nanovectors for gene delivery. *Biomaterials* **2011**; 32: 2683-2688.
- 117.** Boyer C, Whittaker MR, Bulmus V, Liu J, Davis TP. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater.* **2010**; 2: 23-30.

- 118.** Zhou Y, Tang Z, Shi C, Shi S, Qian Z, Zhou S. Polyethylenimine functionalized magnetic nanoparticles as a potential non-viral vector for gene delivery. *J. Mater. Sci. Med.* **2012**; 23: 2697-2708.
- 119.** Sun SL, Lo YL, Chen HY, Wang LF. Hybrid polyethylenimine and polyacrylic acid-bound iron oxide as a magnetoplex for gene delivery. *Langmuir* **2012**; 28: 3542-3552.
- 120.** Berti L, Woldeyesus T, Li Y, Lam KS. Maximization of loading and stability of ssDNA: iron oxide nanoparticle complexes formed through electrostatic interaction. *Langmuir* **2010**; 26: 18293-18299.
- 121.** Song HP, Yang JY, Lo SL, Wang Y, Fan WM, Tang XS, Xue JM, Wang S. Gene transfer using self-assembled ternary complexes of cationic magnetic nanoparticles, plasmid DNA and cell-penetrating Tat peptide. *Biomaterials* **2010**; 31: 769-778.
- 122.** McGuire MJ, Gray BP, Li S, Cupka D, Byers LA, Wu L, Rezaie S, Liu YH, Pattisapu N, Issac J, Oyama T, Diao L, Heymach JV, Xie XJ, Minna JD, Brown KC. Identification and characterization of a suite of tumor targeting peptides for non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **2014**; 4: 4480.
- 123.** Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**; 46: 6387-6392.
- 124.** Kobayashi H, Turkbey B, Watanabe R, Choyke PL. Cancer drug delivery: considerations in the rational design of nanosized bioconjugates. *Bioconjug. Chem.* **2014**; Sous-presse.
- 125.** Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine* **2011**; 6: 877-895.
- 126.** Accardo A, Aloj L, Aurilio M, Morelli G, Tesauro D. Receptor binding peptides for target-selective delivery of nanoparticles encapsulated drugs. *Int. J. Nanomedicine* **2014**; 9: 1537-1557.
- 127.** Bolley J, Lalatonne Y, Haddad O, Letourneur D, Soussan M, Pérard-Viret J, Motte L. Optimized multimodal nanoplatforms for targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins. *Nanoscale* **2013**; 5: 11478-11489.
- 128.** Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujcic D & al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072): a multicenter, randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**; 15: 1100-1108.
- 129.** Schleich N, Po C, Jacobs D, Ucakar B, Gallez B, Danhier F, Pr at V. Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J. Control. Release* **2014**; 194: 82-91.
- 130.** Pan L, Liu J, He Q, Shi J. MSN-Mediated sequential vascular-to-cell nuclear-targeted drug delivery for efficient tumor regression. *Adv. Mater.* **2014**; 26: 6742-6748.
- 131.** Cardarelli F, Serresi M, Albanese A, Bizzarri R, Beltram F. Quantitative analysis of Tat peptide binding to import carriers reveals unconventional nuclear transport properties. *J. Biol. Chem.* **2011**; 286: 12292-12299.
- 132.** Pan L, He Q, Liu J, Chen Y, Ma M, Zhang L, Shi J. Nuclear-targeted drug delivery of TAT peptide-conjugated monodisperse mesoporous silica nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**; 134: 5722-5725.
- 131.** Ding W, Guo L. Immobilized transferrin Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticle with high doxorubicin loading for dual-targeted tumor delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2013**; 8: 4631-4639.
- 132.** Dykman LA, Khlebtsov NG. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells. *Chem. Rev.* **2014**; 114: 1258-1288.

- 133.** McCarthy JR, Jaffer FA, Weissleder R. A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications. *Small* **2006**; 2: 983-987.
- 134.** Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (Lond)* **2008**; 3: 137-140.
- 135.** Key J, Leary JF. Nanoparticles for multimodal *in vivo* imaging in nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **2014**; 9: 711-726.
- 136.** De La Vega JC, Häfeli UO. Utilization of nanoparticles as X-ray contrast agents for diagnostics imaging applications. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**; DOI: 10.1002/cmmi.1613.
- 137.** Lusic H, Grinstaff MW. X-ray-computed tomography contrast agents. *Chem. Rev.* **2013**; 113: 1641-1666.
- 138.** Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* **2006**; 79: 248-253.
- 139.** Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for *in vivo* X-ray computed tomography imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**; 129: 7661-7665.
- 140.** Curry T, Kopelman R, Shilo M, Popovtzer R. Multifunctional theranostic gold nanoparticles for targeted CT imaging and photothermal therapy. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**; 9: 53-61.
- 141.** Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine (Lond)* **2013**; 8: 1601-1609.
- 142.** Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* **2004**; 49: N309-N315.
- 143.** Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**; 100: 13549-13554.
- 144.** O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* **2004**; 209: 171-176.
- 145.** Hainfeld JF, O'Connor MJ, Lin P, Qian L, Slatkin DN, Smilowitz HM. Infrared-transparent gold nanoparticles converted by tumors to infrared absorbers cure tumors in mice by photothermal therapy. *PLoS One* **2014**; 9: e88414.
- 146.** Hainfeld JF, Lin L, Slatkin DN, Dilmanian FA, Vadas TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. *Nanomedicine* **2014**; 10: 1609-1617.
- 147.** Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Heat-inducible TNF-alpha gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. *Cancer Gene Ther.* **2001**; 8: 649-654.
- 148.** Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehof H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **2011**; 103: 317-324.
- 149.** Li J, Hu Y, Yang J, Wei P, Sun W, Shen M, Zhang G, Shi X. Hyaluronic acid-modified Fe₃O₄@Au core/shell nanostars for multimodal imaging and photothermal therapy of tumors. *Biomaterials* **2015**; 38: 10-21.
- 150.** McQuade C, Al Zaki A, Desai Y, Vido M, Sakhuja T, Cheng Z, Hickey RJ, Joh D, Park SJ, Kao G, Dorsey JF, Tsourkas A. A multifunctional nanoplatform for imaging, radiotherapy, and the prediction of therapeutic response. *Small* **2014**; doi: 10.1002/smll.201401927.
- 151.** Sapet C, Laurent N, Le Gourrierc L, Augier S, Zelphati O. MagnétofectionTM *in vitro* et *in vivo* : une voie vers la thérapie génique. *Ann. Biol. Clin.* **2010** ; 68 : 133-142.

- 152.** Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection – Progress and prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**; 63: 1300-1331.
- 153.** Shapiro B. Towards dynamic control of magnetic fields to focus magnetic carriers to targets deep inside the body. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**; 321: 1594-1599.

Chapitre 2

Interactions Acides Nucléiques et Protéines: Deux Etudes Structurales

I. INTRODUCTION : L'ARN NON-CODANT DsrA ET LA PROTEINE Hfq

II. ETUDE DE L'AUTO-ASSOCIATION DE DsrA PAR SPECTROSCOPIE UV ET FTIR

III. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE FTIR DE L'INTERACTION DE Hfq AVEC UN ADN DOUBLE BRIN

Ce chapitre est consacré à l'étude des interactions entre DsrA, un petit ARN non-codant présent chez la bactérie E. Coli, et la protéine Hfq constituée de 6 monomères assemblés en une structure nanométrique d'environ 7 nm de diamètre et 2.5 nm d'épaisseur. En réponse à un stress thermique subi par la bactérie, DsrA va interagir avec sa cible ARNm par l'intermédiaire de la protéine Hfq. Des incertitudes demeurent d'une part sur la structure secondaire adoptée par DsrA, en particulier concernant la deuxième tige-boucle et d'autre part sur les sites d'interactions entre la protéine Hfq et sa cible. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à ces deux problématiques par une étude par spectroscopie d'absorption UV et infrarouge. Après un point rapide sur l'état de l'art, nous présenterons les résultats de nos investigations sur la structure de DsrA puis une étude des interactions de Hfq avec une double hélice d'ADN. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Véronique Arluison du laboratoire Jean Perrin CNRS-FRE 3132.

I. INTRODUCTION : L'ARN NON-CODANT DSRA ET LA PROTEINE HFQ

Les petits ARNs non-codants (ncRNA ou sRNA) sont largement répandus au sein de tous les organismes vivants. Ils ont une taille qui varie entre 50 et 200 nucléotides et ne possèdent pas de cadre ouvert de lecture pour le ribosome ; ils ne sont donc pas traduits en protéines. On considère que chez l'homme, plus de 95% de l'ADN est non-codant engendrant l'existence de centaines de ces ARNs non-codants. Chez les bactéries, même si la partie non-codante du génome est beaucoup plus réduite, 25% environ, les ncRNAs sont tout de même présents en nombre important.⁽¹⁾ Ainsi chez *E. Coli* plus de 70 ARNs non-codant ont été découverts.⁽²⁾ Les ncRNAs jouent un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Certains vont interagir directement avec des protéines modifiant ainsi leur activité alors que d'autres, la majorité, vont s'apparier avec une spécificité plus ou moins importante avec des ARNm modulant ainsi leur traduction. L'appariement entre ces deux types d'ARN a lieu, dans la plupart des cas, au niveau de la région 5' non traduite (5'-UTR) de l'ARNm. Généralement les mécanismes d'action des ncRNAs sont de deux types. Dans un cas, l'association du ncRNA avec sa cible bloque l'approche du ribosome au niveau de son site de liaison à l'ARNm (Ribosome Binding Site = RBS) ce qui a comme conséquence de réprimer sa traduction (régulation négative). Dans l'autre cas, au contraire, l'association du ncRNA avec l'ARNm va rendre la séquence RBS accessible et entraîner l'activation de la traduction de l'ARN messenger (régulation positive).⁽¹⁻²⁾

I.1 La protéine Hfq

La protéine Hfq a été découverte dans la bactérie *Escherichia Coli* en tant que « facteur de l'hôte » nécessaire à la réplication de l'ARN du phage Q_β (Host factor q).⁽³⁻⁴⁾ Par la suite, des travaux ont montré qu'il existe en fait une famille de protéines Hfq présentes dans de nombreuses souches bactériennes. Généralement ces protéines sont thermostables et comptent entre 70 et 110 acides aminés par monomère se stabilisant sous la forme de structures quaternaires de type homohexamère ou homoheptamère. Chez *E. Coli*, la souche que nous avons utilisée pour cette étude, Hfq est constituée de 6 monomères identiques caractérisés par une hélice α du côté N-terminal suivie par 5 brins β formant un feuillet courbé. Chaque monomère d'un poids moléculaire de 11,4 kDa est constitué de 102 acides aminés. Les 6 monomères s'assemblent en une structure torique d'environ 7 nm de diamètre et 2.5 nm d'épaisseur. L'hexamère cyclique se forme par interaction entre le brin β_4 d'un monomère et le brin β_5 du monomère suivant (**Figure 1**).

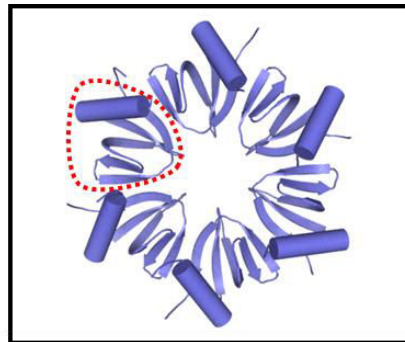


Figure 1: Structure hexamérique de Hfq

Au-delà de son rôle dans la réplication du phage Q_β, cette protéine joue un rôle régulateur dans l'expression des gènes à un niveau post transcriptionnel en modulant la stabilité des ARNm. La protéine Hfq a en fait un rôle pléiotropique et elle est nécessaire à l'action de nombreux petits ARNs régulateurs non traduits. Ainsi Hfq en interaction avec d'autres protéines est impliquée dans de nombreux mécanismes de réponse au stress et il a été observé que des mutations de Hfq provoquent de multiples changements phénotypiques dans la cellule. Si on sait aujourd'hui que Hfq intervient dans beaucoup de mécanismes, ses sites d'interactions avec les ARNs restent encore méconnus puisqu'une seule structure cristallographique d'un complexe Hfq-ARN a été résolue à ce jour. Il s'agit de la protéine Hfq de *S.aureus* liée à un hepta-oligoribonucléotide riche en uracile.⁽⁵⁾ D'autres études montrent que Hfq a une préférence pour les ARNs riches en adénine et qu'elle se lie au niveau des queues de poly(A).

Si 80 à 90% de Hfq est présent dans le cytoplasme en association avec les ribosomes, le reste est présent dans le nucléoïde. L'ensemble des protéines associées au nucléoïde joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes. Dans le nucléoïde, des protéines telles que Hfq se lient de préférence à des zones d'ADN courbé.⁽⁶⁾ Il a été montré par ailleurs que la présence, dans la séquence, d'adénines consécutives facilite la condensation de l'ADN par la formation de courbure au niveau du brin.⁽⁷⁾

I.2 L'ARN non-codant DsrA

Il existe de nombreuses preuves démontrant que l'expression des ncRNAs est induite par des conditions de stress et DsrA est un composant clé dans la machinerie de réponse à un stress thermique.^(1, 8) Cet ARN constitué d'environ 85 nucléotides à une demi-vie de 4 minutes entre 37 et 42°C. Cette demi-vie passe à environ 23 minutes lorsque la température s'abaisse à 25°C.⁽⁸⁾ DsrA agit chez *E. Coli* au niveau de deux ARNs messagers RpoS et H-NS en induisant ou inhibant leur traduction.⁽⁸⁻⁹⁾ Le gène *rpoS* code pour une des 7 sous-unités de l'ARN polymérase. Il s'agit de la sous-unité σ^S impliquée dans la mise en place de la phase stationnaire de croissance et la résistance aux stress. Ce gène est connu pour être régulé par au moins 3 ncRNAs : RprA, DsrA et OxyS. RprA et DsrA régulent positivement la traduction de *rpoS* alors qu'OxyS agit négativement.⁽²⁾ L'interaction de DsrA avec l'ARN messager de RpoS est assez spécifique. Le site de liaison sur RpoS est situé dans la région 5'-UTR environ 70 à 80 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction dans une zone structurée en double hélice contenant le RBS.⁽¹⁰⁾ L'appariement entre ces deux brins d'ARN se fait sur une longueur d'environ 23 nucléotides dans une zone située entre les nucléotides 8 et 32 de DsrA (**Figure 2**).

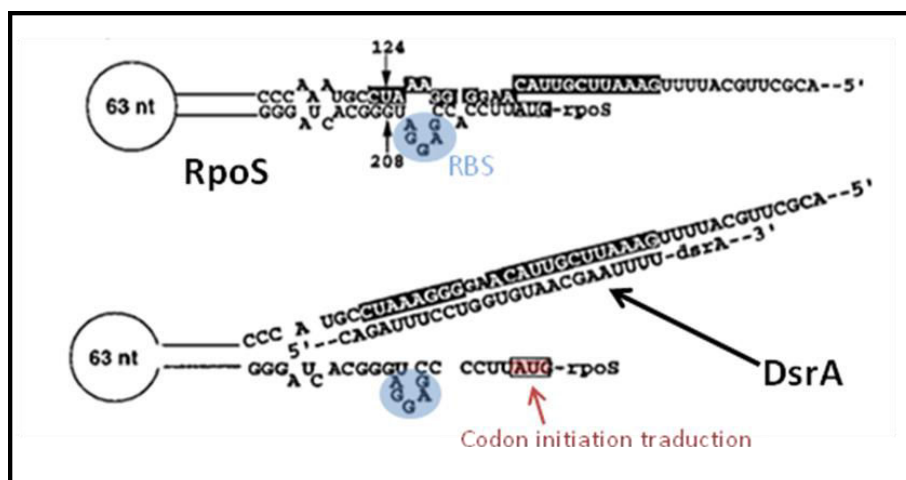


Figure 2 : Modèle d'appariement entre DsrA et RpoS (D'après N. Majdalani et al⁽¹⁰⁾).

Le plus souvent la complémentarité entre les ncRNAs et leur cible ARNm est assez réduite ce qui a comme conséquences d’entraîner une spécificité d’interaction peu élevée ainsi qu’une stabilité des complexes relativement faible. Chez les bactéries, pour palier à ces inconvénients, l’appariement se fait souvent par l’intermédiaire de la protéine Hfq.⁽²⁾ L’un des rôles de Hfq serait de se lier simultanément à DsrA et RpoS afin de favoriser l’ouverture de la tige de RpoS puis l’appariement avec DsrA (**Figure 3**).⁽¹¹⁾

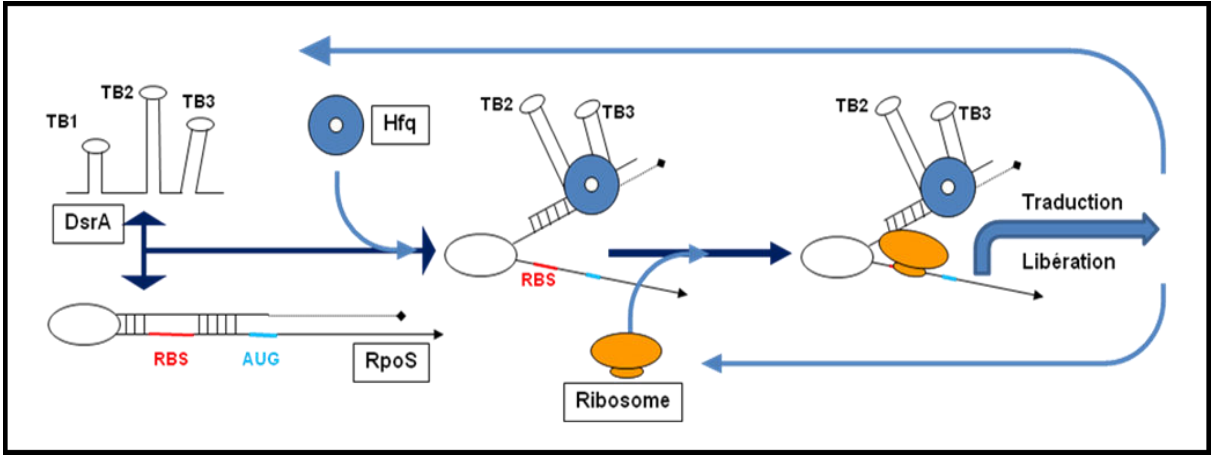


Figure 3 : Modèle de régulation de la traduction de RpoS par DsrA et Hfq.

La fixation de DsrA, en présence de Hfq, sur l’un des brins de RpoS entraîne la libération du brin complémentaire contenant le RBS ; le ribosome peut alors s’y fixer et la traduction de RpoS débuter. Le site de fixation de Hfq à l’ARNm serait situé au niveau des nucléotides 106 à 112 de RpoS.⁽¹²⁾ Pour ce qui est du site de fixation de Hfq sur DsrA certains auteurs privilégient la région allant des nucléotides 26 à 32 ⁽¹²⁾ alors que d’autres soulignent l’importance des deux dernières tige-boucles (**Figure 4**).^(1, 13)

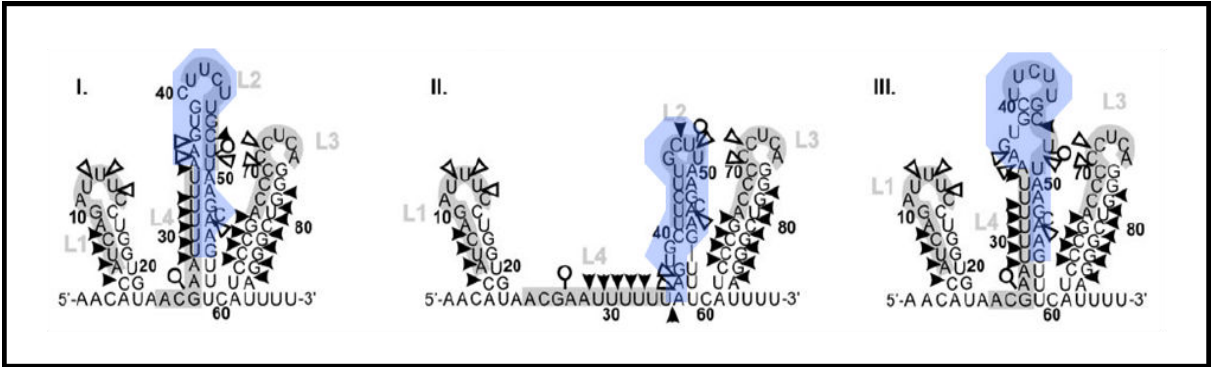


Figure 4 : 3 différents modèles structuraux pour DsrA (D’après K. Rolle et al ⁽¹⁾). Surlignée en bleu la séquence A22 utilisée dans cette étude.

Historiquement la structure secondaire de DsrA a été prédite par l'utilisation de programmes bioinformatiques. Par la suite, des techniques de biologie moléculaire (RNase footprinting) ont permis d'améliorer la connaissance de la structure secondaire. Il existe à l'heure actuelle trois modèles de repliement. DsrA serait formé de trois tiges boucles séparées par des régions non appariées. La structure des deux tiges-boucles situées aux extrémités 5' (TB1) et 3' (TB3) semble faire consensus pour tous les auteurs, cependant les modèles diffèrent pour la longueur et la structure de la deuxième tige-boucle (TB2) ainsi que par la présence d'une partie centrale en simple brin plus ou moins longue (**Figure 4**). L'incertitude structurale concernant la deuxième tige-boucle nous a amené à nous intéresser à la structure de DsrA et plus particulièrement à une partie de ce domaine située entre les nucléotides 35 et 56 (**Figure 4 en bleu**). Cette séquence de 22 nucléotides possède la particularité d'être partiellement auto-complémentaire. En effet les 14 derniers nucléotides sont entièrement auto-complémentaires au sens Watson-Crick alors que les 8 premiers font intervenir deux appariements bancals (Wobble G.U).

II ETUDE DE L'AUTO-ASSOCIATION DE DSRA PAR SPECTROSCOPIE UV ET FTIR

Dans cette étude, nous avons utilisé les spectroscopies d'absorption dans l'infrarouge et l'ultraviolet pour obtenir des données structurales susceptibles de faire avancer la connaissance sur DsrA. L'absorption des acides nucléiques à 260 nm dans l'ultra-violet (UV) est due à des transitions électroniques entre les orbitales moléculaires $\pi \rightarrow \pi^*$ des bases puriques et pyrimidiques. D'une manière générale, un acide nucléique aura donc une absorption différente lorsqu'il est sous une forme structurée que lorsqu'il est sous une forme dénaturée en simples brins. Ainsi, une augmentation de l'absorption, liée à un changement de la configuration électronique des bases, est observée lors de la dénaturation d'une structure en double hélice. Une façon simple de rompre cette structure est d'apporter de l'énergie sous forme de chaleur en utilisant une cellule thermostatée. L'apport de chaleur va alors entraîner une rupture des liaisons hydrogènes entre les bases. Dans certaines conditions, ce processus sera réversible et le refroidissement de la solution s'accompagnera d'une reformation de la structure. Alors que la dénaturation (fusion) de la structure induit un effet hyperchrome, la structuration en double-hélice (hybridation) provoque un effet hypochrome. Dénaturation et hybridation peuvent ainsi être suivies par spectroscopie UV et cette technique permet d'obtenir des informations thermodynamiques sur la stabilité de la structure. Pour cela, on enregistre les variations de la densité optique, à une longueur d'onde donnée (# 260 nm), en

fonction de la température de l'échantillon. Les variations de l'absorption en fonction de la température de l'échantillon sont représentées **Figure 5** pour une expérience type avec un ADN.

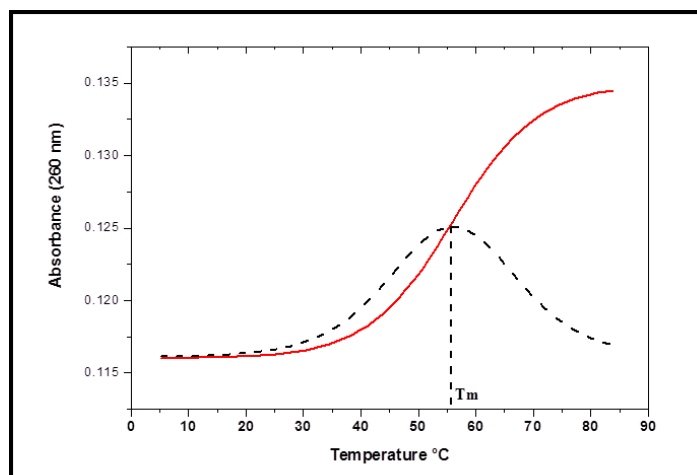


Figure 5 : Courbe de fusion d'un ADN type.

La plupart du temps la courbe observée, appelée courbe de fusion, est une sigmoïde dont le point d'inflexion permet de définir la température de fusion (T_m = Temperature of melting) de la structure étudiée. Cette valeur représente la température à laquelle la moitié de la structure a été dénaturée. Dans des conditions expérimentales données, elle varie en fonction du nombre et du type de paires de bases dont les liaisons hydrogènes ont été rompues. La température de fusion pourra aussi varier en fonction des conditions de salinité de l'échantillon ainsi qu'en fonction de la concentration de la molécule étudiée. Typiquement pour une structure intramoléculaire (formée par repliement de l'acide nucléique sur lui-même) la température de fusion sera indépendante de la concentration en acide nucléique alors que pour une structure intermoléculaire (formée par association de plusieurs brins) elle variera en fonction de cette concentration.⁽¹⁴⁾ Ainsi pour l'étude d'ARNs susceptibles de former des structures intramoléculaires (tige-boucle) ou intermoléculaires (duplexe), il sera très utile d'enregistrer des courbes de fusion à des concentrations différentes en ARN, toutes choses étant égales par ailleurs.

La courbe de dénaturation-hybridation de DsrA, enregistrée dans les conditions générales de l'expérience UV décrites en annexe (*Annexe I* ; I. Expériences UV), est présentée **Figure 6**.

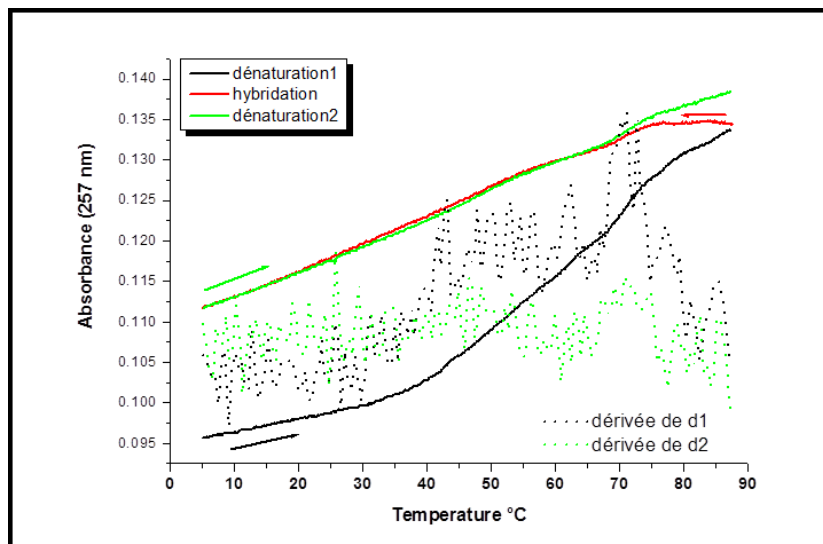


Figure 6 : Courbes de dénaturation-hybridation de DsrA.
 $[DsrA] = 0,07 \mu M$, 10 mM cacodylate de sodium

Cette courbe est très complexe et il est quasiment impossible de déterminer le nombre de structures ainsi que leur point de fusion. Une des raisons invocables est qu'il existe plusieurs structures de stabilité proche et que les fusions se superposent. Il est à noter que la courbe de la première dénaturation (d1) est différente des deux autres. L'explication de ce phénomène peut être liée aux conditions de formation initiale de la structure observée lors de la première dénaturation, même si l'aspect cinétique n'est pas à écarter en première approche. Très probablement, une structure s'est formée à concentration élevée en ARN ($1,4 \mu M$ en brin) dans la solution mère alors que dans les conditions de l'expérience UV ($0,07 \mu M$ en brin), cette structure est défavorisée et ne se reforme pas ou mal. Une autre expérience de dénaturation-hybridation (données non présentées) menée avec le même échantillon 1 mois après et à une vitesse deux fois plus lente ($0,08^\circ C/minute$) donne un résultat en tout point similaire aux courbes d'hybridation (h) et de deuxième dénaturation (d2) de la **Figure 6** confirmant ainsi que l'aspect cinétique n'est pas prépondérant dans la formation de la structure observée lors de la première fusion.

Compte tenu de la difficulté à obtenir des courbes de fusion aisément interprétables nous avons décidé de travailler sur la séquence 5'**AAGUGCUUCUUGCUUAAGCAAG**3', séquence qui correspond au deuxième domaine de DsrA situé entre la première et la dernière tige-boucle. Cette séquence restreinte nommée A22, est subdivisée elle-même en deux autres sous séquences de 14 et 8 nucléotides, C14 (5'**CUUGCUUAAGCAAG**3') et A8 (5'**AAGUGCUU**3'). La démarche est d'étudier par spectroscopie UV et IR, les structures de

façon progressive au fur et à mesure que la longueur de la séquence augmente afin de remonter à une structure possible pour DsrA. Les différents oligonucléotides utilisés sont décrits en annexe (*Annexe I ; II. Oligonucléotides et protéine Hfq*).

Le **Tableau 1** reporte pour chaque oligonucléotide, la séquence et les structures possibles.

	Structure intramoléculaire	Structures intermoléculaires	
	a	b	c
A8			
C14			
A22			

Tableau 1 : Structures possibles pour les séquences A8, C14 et A22.

De par sa séquence primaire, il est possible d'envisager 3 structures pour la séquence A8 : une structure intramoléculaire en tige-boucle (**Tableau 1a**) et un duplexe intermoléculaire avec ou sans boucle interne (**Tableau 1b et c**). La structure tige-boucle est énergétiquement peu favorable étant donné la composition et la longueur de la tige.

L'oligonucléotide C14, de par sa séquence primaire peut également présenter deux structures secondaires : une structure intramoléculaire en tige-boucle (**Tableau 1a**) et un duplexe intermoléculaire (**Tableau 1b**). Étant donné la composition en bases et la longueur de la tige, la structure intramoléculaire de C14 devrait cette fois être plus stable que pour A8.

Enfin, l'oligonucléotide A22 présente lui aussi deux structures potentielles : une structure intramoléculaire en tige-boucle (**Tableau 1a**) et un duplexe intermoléculaire (**Tableau 1b**). Une multimérisation de ces deux structures peut même être envisagée au regard de la composition des extrémités pendantes.

II.1 Séquence A8

Afin de déterminer si la structure de la séquence A8 est intra ou intermoléculaire, nous avons fait varier la concentration en ARN. Les expériences de fusion ont été menées dans les conditions standards (*Annexe I*, I. Expériences UV) avec des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 μM . La courbe de première dénaturation (d1) est représentée, après normalisation pour chaque concentration, *Figure 7*.

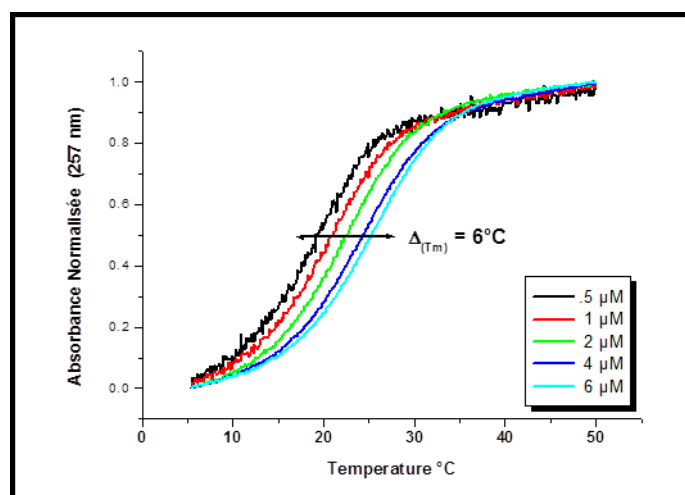


Figure 7 : Première dénaturation (d1) pour la séquence A8.
Conditions standards avec des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 μM .

Les données expérimentales recueillies à partir des courbes de fusions sont résumées dans le *Tableau 2*.

	[A8]				
	0.5 μM	1 μM	2 μM	4 μM	6 μM
T_m °C	19	21	23	24	25
% Hyp d1	10	10	10	11	11
% Hyp d2	8	8	9	10	10

Tableau 2 : Effet de la concentration en ARN.
Valeurs calculées des points de fusion (T_m) et de l'hyperchromisme (% Hyp) pour la première et deuxième dénaturation (d1 et d2) dans des conditions standards.

Une augmentation de la concentration en oligonucléotide entraîne un accroissement de la température de fusion. La variation de T_m mesurée entre les deux concentrations extrêmes est de 6°C. Cette variation va donc dans le sens d'une structure intermoléculaire stabilisée par une concentration élevée en ARN.

L'hyperchromisme calculé à partir des données expérimentales est environ de 10% pour toutes les concentrations lors de la première fusion (d1). Toutefois une légère diminution de

l'hyperchromisme est observée lors de la deuxième fusion (d2) pour les expériences à plus basse concentration en acide nucléique. Cette différence peut être expliquée en tenant compte des conditions expérimentales. L'échantillon est préparé à partir d'une solution mère relativement concentrée, 0.6 mM, ce qui favorise les interactions intermoléculaires. Lorsque la structure se forme en solution plus diluée (1 μ M, d2), l'équilibre simples brins \leftrightarrow duplexe est légèrement déplacé en faveur des simples brins et l'hyperchromisme diminue.

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il est possible de conclure que dans ces conditions, la séquence A8 adopte une structure intermoléculaire en duplexe (**Tableau 1b et 1c**). Il est toutefois impossible de déterminer à partir de ces données si le duplexe possède ou non une boucle interne.

Afin de confirmer ce résultat, le spectre infrarouge de la séquence A8 a été comparé à ceux de différentes séquences d'ARN (**Figure 8**).

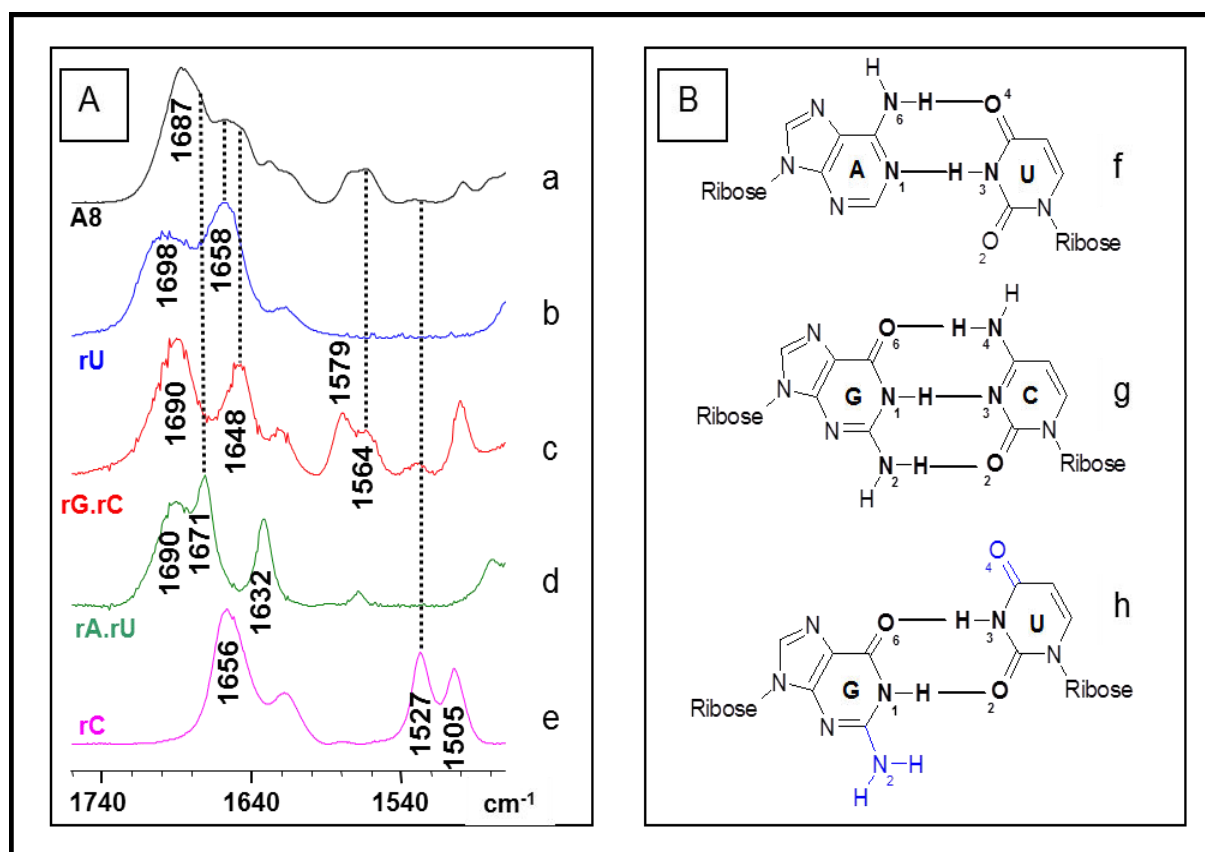


Figure 8 : Appariement des bases.

A. Spectres IRTF enregistrés dans D_2O dans la région $1750\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ de la séquence A8 (a), Poly rU (b), Poly rG. Poly rC (c), Poly rU.Poly rA (d) et poly rC (e).

B. Modèles d'appariements Watson-Crick adénine-uracile (f), guanine-cytosine (g) et modèle d'appariement de type wobble guanine-uracile (h).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique appropriée à l'étude des acides nucléiques et des protéines qui permet de mettre en évidence leurs interactions. Cette technique a permis d'obtenir des bandes marqueurs spécifiques du type d'appariement des bases, de la conformation des sucres et des phosphates ainsi que de l'orientation relative des brins entre eux (*Annexe II, I. Étude des acides nucléiques et des protéines par spectroscopie infrarouge*).⁽¹⁵⁾

Le Poly(rC), **Figure 8A.e**, présente une bande d'absorption des C2=O2 de la cytosine à 1527 et 1656 cm^{-1} . Dans le cas d'un appariement de type Watson-Crick comme celui de la séquence caractéristique Poly(rG).Poly(rC) (**Figure 8A.c**), la bande d'absorption des C2=O2 est déplacée vers 1648 cm^{-1} et l'intensité de la bande à 1527 cm^{-1} diminue considérablement. Des effets similaires sont observés sur le spectre de la séquence A8, **Figure 8A.a**, ce qui suggère que les cytosines sont engagées dans un appariement de type Watson-Crick et élimine le modèle intramoléculaire (**Tableau 1a**). Ces résultats sont confortés par le fait que lorsque la séquence A8 est portée à 85°C, ce qui permet de dissocier l'appariement, on observe une augmentation de l'intensité de la bande à 1527 cm^{-1} sur le spectre IRTF (données non présentées).

Le Poly(rG).Poly(rC) est également caractérisé par une bande à 1564 cm^{-1} qui met en jeu les C=N du cycle de la guanine. L'intensité de cette bande augmente lorsque ce groupement n'est pas engagé dans un appariement mais ceci s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de la bande à 1579 cm^{-1} avec une prédominance de cette dernière. Une inversion du rapport d'intensité entre les bandes d'absorption de la guanine à 1579 et 1564 cm^{-1} est observée sur le spectre de la séquence A8 ce qui suggère qu'une partie des guanines sont engagées dans un appariement qui n'est pas de type Watson-Crick.

Le spectre de la séquence A8 présente une bande à 1658 cm^{-1} caractéristique d'un C4=O4 d'uracile libre comme dans le Poly(rU) ⁽¹⁵⁾ (**Figure 8A.b**) ce qui peut laisser supposer la formation d'un duplexe contenant un appariement de type wobble entre guanine et uracile (**Tableau 1b, Figure 8B.h**) mais aussi la formation d'un duplexe imparfait, avec une boucle interne, dans lequel les paires GU ne sont pas associées (**Tableau 1c**).

La région 800-750 cm^{-1} est caractéristique des vibrations d'élongations des doubles liaisons hors du plan des bases. Les spectres des séquences A22, C14 et A8 ainsi qu'un récapitulatif

des bandes d'absorption attendues dans cette région pour des bases engagées ou non dans un appariement de type Watson-Crick sont présentés respectivement **Figure 9** et **Tableau 3**.

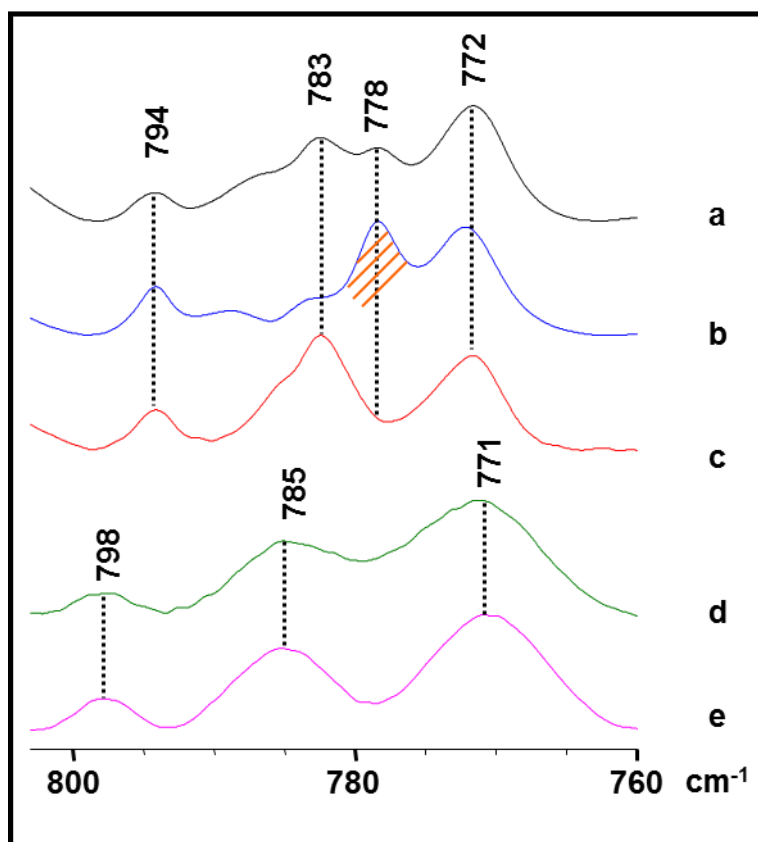


Figure 9 : Spectres IRTF enregistrés dans D_2O dans la région $800-750\text{ cm}^{-1}$.

A 5°C des séquences A22 (a), A8 (b), C14 (c) et à 95°C des séquences A8 (d) et A22 (e).

Adénine		Cytosine		Guanine		Uracile	
Libre	Liée (W-C)	Libre	Liée (W-C)	Libre	Liée (W-C)	Libre	Liée (W-C)
798	794	787	784	785	781	770	772

Tableau 3 : Attribution des bandes caractéristiques des bases libres et associées. Observations dans D_2O dans la région $800-750\text{ cm}^{-1}$ sur les spectres IRTF de Poly(rA), Poly(rA).Poly(rU), Poly(rC), Poly(rC).Poly(rG), GmP à 95°C et Poly(rU).

On remarque sur le spectre de la séquence A8, lorsque l'ARN est auto-associé, l'absence de la bande de la guanine libre à 785 cm^{-1} et la présence d'une absorption vers 778 cm^{-1} (**Figure 9b et d, Tableau 3**). Etant donné la structure primaire de cet ARN et sachant que les guanines sont appariées, il est tout à fait raisonnable de proposer que cette bande, à 778 cm^{-1} , soit caractéristique d'une guanine engagée dans une liaison hydrogène avec l'uracile au sein d'un

appariement de type wobble (**Figure 8B.h**). L'ensemble des résultats présentés ci-dessus est d'ailleurs tout à fait en accord avec ce modèle d'appariement. En effet, on dénote sur le spectre de la séquence A8, des C4=O4 d'uracile libres (1658 cm^{-1}) et des bandes caractéristiques de l'absorption des guanines qui sont modifiées par rapport à un appariement Watson-Crick classique. Ainsi, l'augmentation de l'intensité de la bande à 1564 cm^{-1} est tout à fait en accord avec un N2H de la guanine non engagé dans une liaison hydrogène alors que dans le même temps le N1H à 1579 cm^{-1} est engagé avec le C2=O2 de l'uracile. En conséquence, dans nos conditions expérimentales, la structure la plus probable pour la séquence A8 est le duplexe intermoléculaire contenant deux appariements de type wobble (**Tableau 1b** et **Figure B.8h**).

II.2 Séquence C14

Dans une démarche similaire à celle adoptée pour la séquence A8, nous avons enregistré les courbes de fusion de la séquence C14 à des concentrations croissantes dans des conditions de salinité standards (**Annexe I**, I. Expériences UV). La première dénaturation (d1) est représentée, après normalisation pour chaque concentration, sur la **Figure 10**.

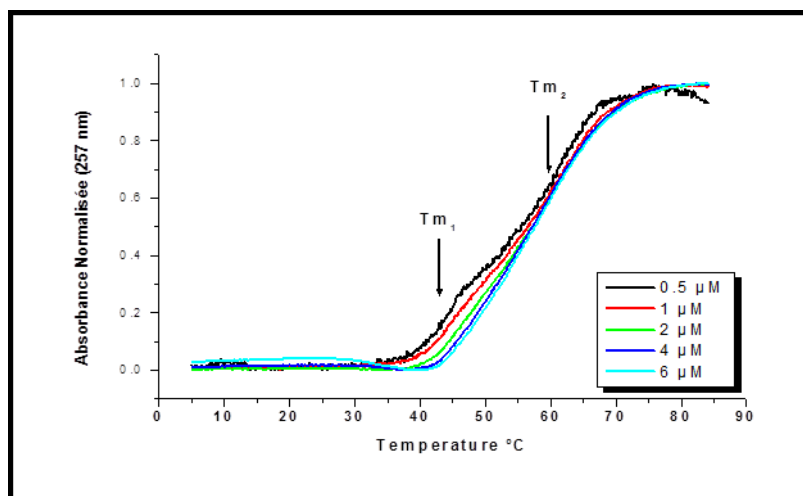


Figure 10 : Première dénaturation (d1) pour la séquence C14.

Conditions standards avec des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 µM.

Contrairement à A8, on observe une courbe bi-phasique pour la fusion à $0.5\text{ }\mu\text{M}$ en ARN, ce qui laisse supposer deux structures différentes dans la solution. Le caractère bi-phasique semble décroître au fur et à mesure que la concentration en ARN augmente. Les données expérimentales recueillies à partir des courbes de fusions sont résumées **Tableau 5**.

	[C14]									
	0.5 μ M		1 μ M		2 μ M		4 μ M		6 μ M	
	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}
T _m °C d1	44	61	44	61	47	60	?	59	?	58
T _m °C d2	44	61	45	61	45	59	?	58	?	58

Tableau 5 : Effet de la concentration en ARN.

Valeurs calculées des points de fusion (T_m) et de l'hyperchromisme (% Hyp) pour les première et deuxième dénaturations (d1 et d2) dans des conditions standards à des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 μ M.

Jusqu'à une concentration de 2 μ M, la dérivée donne deux maxima séparés (données non montrées). Au-delà, la courbe de la dérivée demeure dissymétrique mais il devient très difficile de déterminer deux points de fusion. On note T_{m1} la température de fusion la plus basse et T_{m2} la plus élevée. Il semble que la structure ayant le point de fusion le plus bas (T_{m1}) soit stabilisée par l'augmentation de la concentration en ARN. La valeur de T_{m1} augmentant, les deux parties de la courbe de fusion viennent se superposer; il devient alors impossible de les distinguer. La température de fusion située vers 60°C (T_{m2}) semble elle peu sensible aux variations de la concentration en brin.

Afin d'essayer de séparer les deux valeurs de T_m, nous avons décidé de diminuer les concentrations en NaCl et KCl par rapport aux conditions standards, avec une concentration en ARN de 1 μ M. Les données expérimentales recueillies à partir des courbes de fusions sont résumées dans le **Tableau 5**.

	[KCl] ; [NaCl]									
	0 ; 0		0 ; 10		50 ; 10		100 ; 10		140 ; 10	
	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}
T _m °C d1	40	59	40	59	42	61	43	62	45	61
T _m °C d2	-	58	-	59	?	61	44	61	45	61

Tableau 5 : Effet de la concentration en NaCl et KCl.

Valeurs calculées des points de fusion (T_m) pour les première et deuxième dénaturations (d1 et d2) dans des conditions variables en KCl et NaCl.

Les expériences présentées ci-après **Figure 11** ont été réalisées avec un tampon cacodylate de sodium à 10 mM et des concentrations variables en KCl et NaCl.

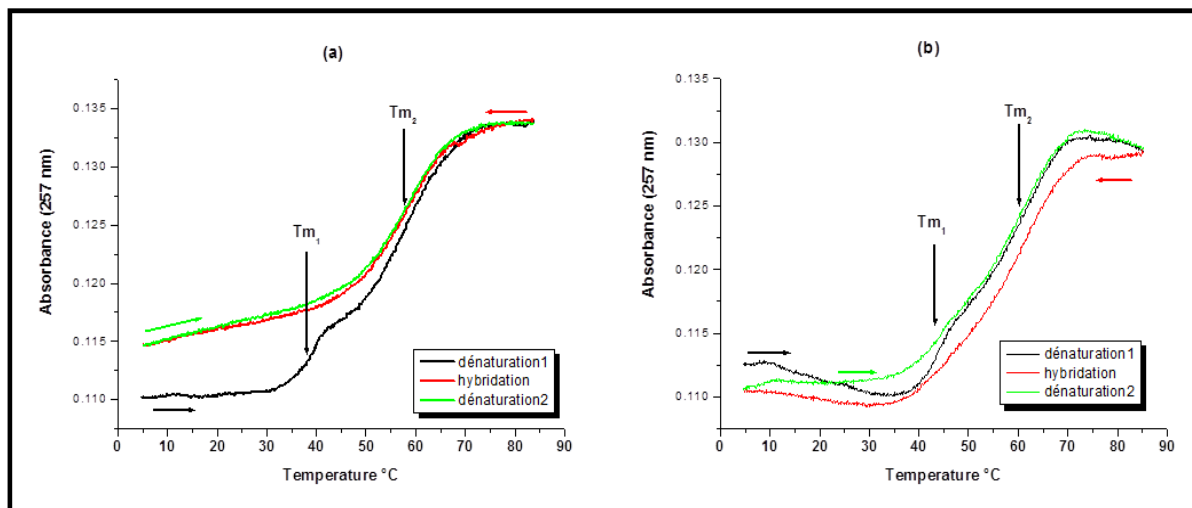


Figure 11 : Courbes de dénaturation-hybridation de la séquence C14.
 En présence de 10 mM NaCl et 10 mM cacodylate de sodium (a) et 10 mM NaCl, 10 mM cacodylate de sodium et 100 mM KCl (b).

A basse salinité, la première fusion (d1) diffère de la deuxième (d2). En effet, pour une concentration en KCl inférieure à 50 mM, les courbes de la deuxième dénaturation sont monophasiques et l'on ne détecte qu'un seul point de fusion (**Figure 11a**). Au-delà de 50 mM KCl, on retrouve des courbes bi-phasiques aussi bien pour la première fusion qu'à la seconde (**Figure 11b**).

On déduit de ces expériences que la structure formée à plus haute concentration dans la solution mère (0,2 mM) ne se reforme pas dans des conditions de basse salinité (**Figure 11a**) alors que pour une salinité plus élevée cette structure se stabilise (**Figure 11b**).

Les résultats présentés ci-dessus pour la séquence C14 suggèrent que la température de fusion la plus basse correspond à une structure sensible à la concentration en sel et en ARN alors que la plus élevée semble beaucoup moins réagir aux variations de concentrations. Au vu de ces informations, il est possible de conclure que, dans ces conditions, C14 adopte une structure intermoléculaire en duplexe (**Tableau 1a**) qui a une température de fusion vers 40°C (T_{m1}) ainsi qu'une structure intramoléculaire plus stable en tige-boucle (**Tableau 1b**) avec une valeur de T_m vers 60°C (T_{m2}), cette dernière structure étant majoritaire.

Les spectres IRTF des séquences C14 et A8 sont présentés sur la **Figure 12** en bleu et en rouge respectivement.

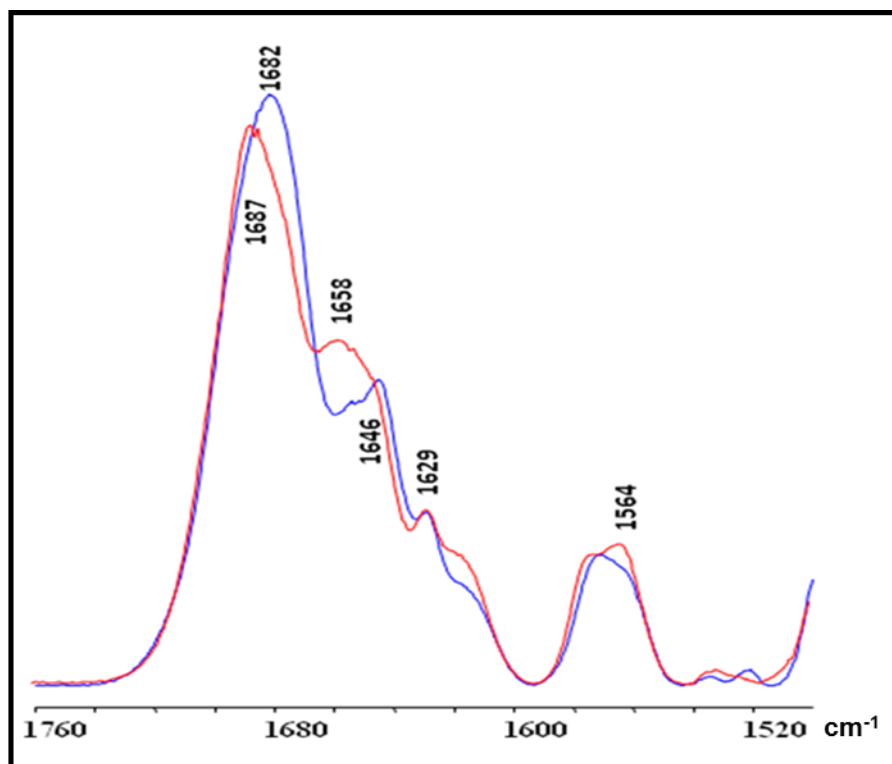


Figure 12 : Spectres IRTF enregistrés dans D_2O dans la région $1750-1500\text{ cm}^{-1}$.
A8 spectre rouge ; C14 spectre bleu.

Sur le spectre du C14 (**Figure 12** en bleu) on remarque une bande située à 1646 cm^{-1} caractéristique d'un $C2=O2$ de cytosine engagé dans une liaison Watson-Crick.⁽¹⁵⁾ Les carbonyles des uraciles, attendus à 1690 cm^{-1} pour le $C2=O2$ et 1671 cm^{-1} pour le $C4=O4$ ⁽¹⁵⁾, ainsi que celui de la guanine sont superposés à 1682 cm^{-1} . Il est à noter que le $C6=O6$ des guanines attendu vers 1690 cm^{-1} dans un Poly rG.Poly rC⁽¹⁵⁾ montre une très grande variabilité de fréquence en fonction de l'empilement des bases dans la séquence. On remarque aussi sur le spectre du C14, l'absence des deux bandes précédemment attribuées à l'appariement G.U situées à 1658 et 1564 cm^{-1} .

Dans le cas d'une structure intramoléculaire (**Tableau 1a**) on s'attend à avoir 50% des adénines non appariées. Ceci aurait pour conséquence une augmentation importante de l'intensité de la bande liée au $N6D$ située vers 1629 cm^{-1} . Ce phénomène n'est pas observé sur le spectre. De plus la bande caractéristique de l'adénine située dans la zone des vibrations des bases hors du plan montre une composante unique à 794 cm^{-1} ce qui ne serait pas le cas si 50% des adénines étaient non appariées (**Figure 9c** et **Tableau 3**).

Ces résultats montrent que dans nos conditions expérimentales la séquence C14 adopte majoritairement une structure intermoléculaire telle que celle représentée sur **Tableau 1b**.

II.3 Séquence A22

La première courbe de dénaturation (d1) est représentée, après normalisation, pour différentes concentrations en ARN sur la **Figure 13**.

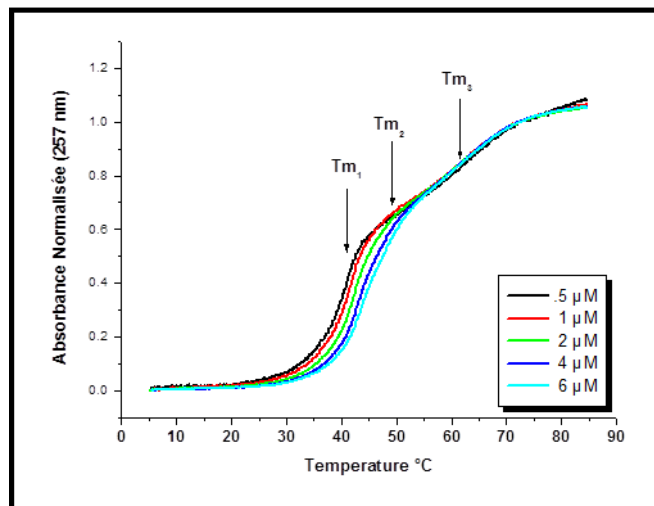


Figure 13 : Première dénaturation (d1) pour la séquence A22.

Conditions standards avec des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 μM .

On note T_{m1} la valeur de la température de fusion la plus basse, T_{m2} la valeur intermédiaire et T_{m3} la plus élevée. Les données expérimentales recueillies à partir de ces courbes de fusions sont résumées dans le **Tableau 6**.

	[A22]														
	0.5 μM			1 μM			2 μM			4 μM			6 μM		
	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
d1	41	-	62	41	-	62	42	?	62	43	47	62	44	48	62
d2	40	-	61	42	-	62	44	-	62	44	47	62	46	62	
Hd1		18			18			17.5			17			17	
Hd2		10			11			13			14			14	

Tableau 6 : Effet de la concentration en ARN.

Valeurs calculées des points de fusion (T_m) et du % d'hyperchromisme (H) pour les première et deuxième dénaturations (d1 et d2) dans des conditions standards à des concentrations en brin de 0.5, 1, 2, 4 et 6 μM .

A basse concentration on observe une courbe bi-phasique. Lorsque la concentration augmente les dérivées montrent trois points de fusion lors de la première dénaturation (**Tableau 6**). Lors de la deuxième fusion (d2), la présence de trois T_m semble moins nette. Le point de fusion le plus élevé (T_{m3}) situé vers 62°C semble peu sensible aux variations de concentration. La, ou les, premières transitions semblent quant à elles sensibles aux variations de la concentration. Une forte différence d'hyperchromisme est observée entre la première fusion et la seconde à basse concentration en ARN. Cet écart diminue au fur et à mesure que la concentration en acide nucléique augmente. Ce phénomène est semblable à celui observé avec le C14. De la même façon, on peut supposer que la structure formée à haute concentration en oligonucléotide dans la solution mère (0,2 mM) ne se reforme pas à plus basse concentration. Comme pour la séquence C14, nous avons décidé de diminuer les concentrations en NaCl et KCl afin de séparer T_{m1} de T_{m2} . Les expériences présentées ci-après ont été réalisées avec un tampon cacodylate de sodium à 10 mM. La concentration en ARN était de $1\mu\text{M}$. Différentes concentrations en KCl et NaCl ont été utilisées. Les courbes de fusion présentées sur la **Figure 14** montrent bien la présence de trois T_m à basse salinité.

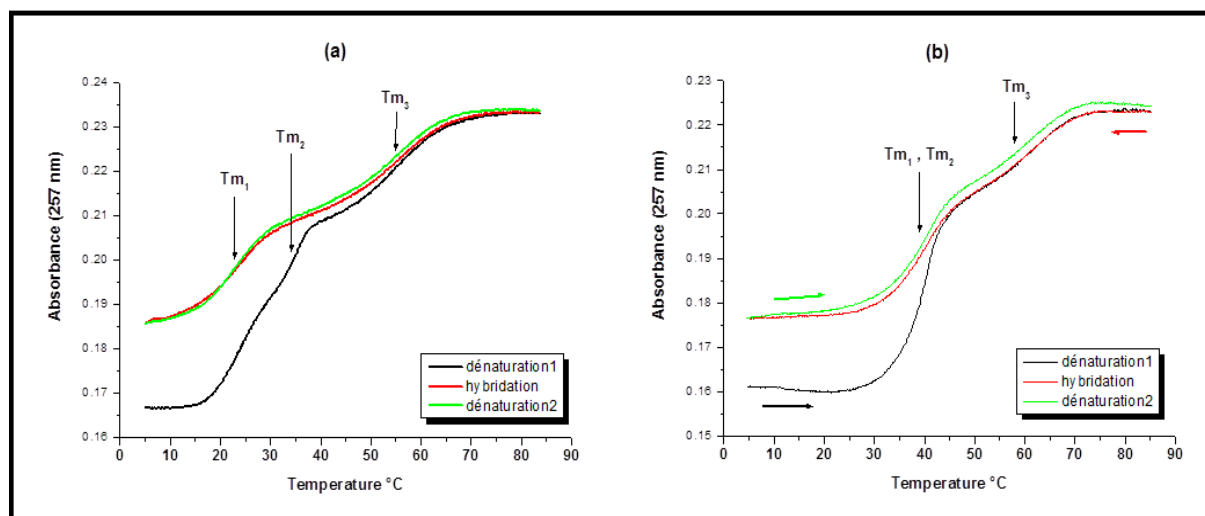


Figure 14 : Courbes de dénaturation-hybridation de la séquence A22.

En présence de 10 mM NaCl et 10 mM cacodylate de sodium (a) et 10 mM NaCl, 10 mM cacodylate de sodium et 100 mM KCl (b).

Les données expérimentales recueillies à partir de ces courbes de fusions sont résumées dans le **Tableau 7**.

	[KCl] ; [NaCl]														
	0 ; 0			0 ; 10			50 ; 10			100 ; 10			140 ; 10		
	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}
d1	21	35	55	24	35	55	?	37	60	?	41	62	?	41	62
d2	20	-	55	24	-	55	-	36	60	-	41	62	-	42	62
Hd1		16			17			17			17			18	
Hd2		11			11			11			12			12	

Tableau 7 : Effet de la concentration en NaCl et KCl.

Valeurs calculées des points de fusion (T_m) et du % d'hyperchromisme (H) pour les premières et deuxièmes dénaturations ($d1$ et $d2$) à des conditions variables en KCl et NaCl.

Quelle que soit la concentration saline, on observe toujours un écart d'hyperchromisme à peu près constant entre la première fusion et la deuxième. Encore une fois cela va dans le sens d'une structure formée à haute concentration dans la solution stock qui ne se reforme pas dans les conditions de l'expérience de fusion. Il semble que la structure dont le point de fusion est le plus bas en absence de sel (T_{m1}) soit fortement influencée par l'augmentation de la salinité alors que les deux autres le sont plus modérément. La structure la moins influencée par les conditions de formation est celle dont le point de fusion est le plus haut (T_{m3}). Au vu de la séquence A22, on peut proposer que la structure intramoléculaire en tige-boucle soit la plus stable (**Tableau 1a**) et que les deux structures les moins stables (T_{m1} et T_{m2}) correspondent aux structures intermoléculaires (**Tableau 1b**).

Les spectres IR des séquences A22, C14 et A8 sont représentés sur la **Figure 15** respectivement en noir, en bleu et en rouge.

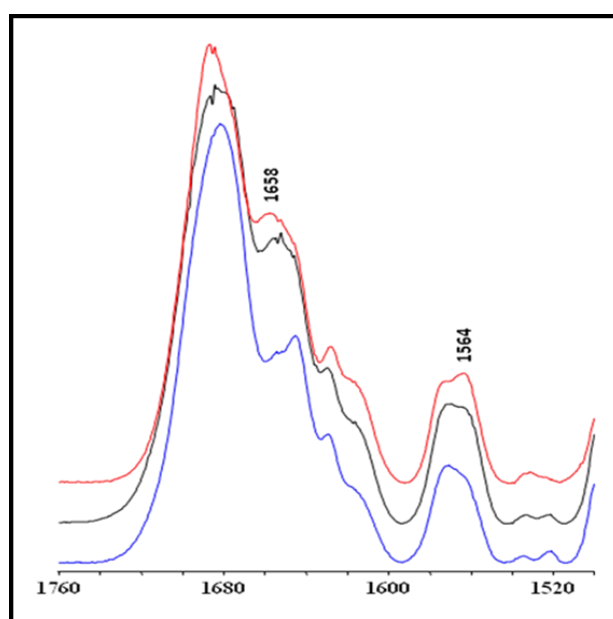


Figure 15 : Spectres IRTF enregistrés dans D₂O dans la région 1750-1500 cm⁻¹.
A8 spectre rouge ; C14 spectre bleu et A22 spectre noir.

On peut remarquer que le spectre de la séquence A22 correspond à la superposition des spectres des séquences A8 et C14. En effet si l'on additionne, à l'aide du logiciel de traitement des spectres Spectrum, le spectre de la séquence A8 avec celui de la séquence C14 on retrouve toutes les bandes du spectre de la séquence A22 (données non présentées). On retrouve ainsi dans le spectre de la séquence A22, **Figure 15** en noir, les bandes caractéristiques de l'appariement G.U (1658 et 1564 cm^{-1}) présentes dans le spectre de la séquence A8, **Figure 15** en rouge. Il en est de même pour les bandes caractéristiques des vibrations des bases hors du plan comme on peut le voir sur la **Figure 9a** (comparer avec **Figure 9b et 9c**).

Les conditions de concentration élevée de l'infrarouge favorisent les structures intermoléculaires au dépend de celles qui sont intramoléculaires. Pour les séquences A8 et A22, ces conditions permettent la formation des paires de base de type wobble, comme l'appariement G.U qui peut exister dans ces deux structures. On peut donc envisager pour la séquence A22, à la concentration utilisée pour l'analyse infrarouge, la structure présentée **Figure 16**.

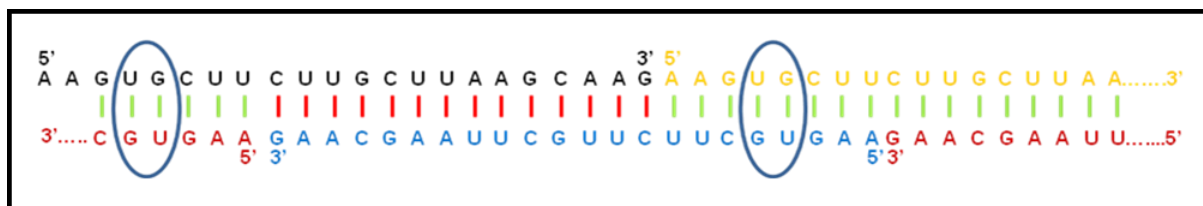


Figure 16 : Structure Intermoléculaire proposée en infrarouge pour la séquence A22.
Les paires de bases de type wobble sont entourées en bleu.

Dans des conditions où l'appariement G.U ne se fait pas, alors la « multimérisation » est beaucoup moins favorable et on retrouve alors la structure intermoléculaire à deux brins.

II.4 Un modèle pour DsrA

Selon les conditions de salinité ou de concentration en ARN, la séquence primaire des brins A8, C14 et A22 s'organise en différentes formes structurales qui peuvent coexister ou non en fonction du mode de préparation de l'échantillon. Des équilibres entre ces différentes formes sont bien sur tout à fait envisageables.

Les différentes formes structurales que nous proposons dans les conditions de l'analyse UV sont résumées **Figures 17**.

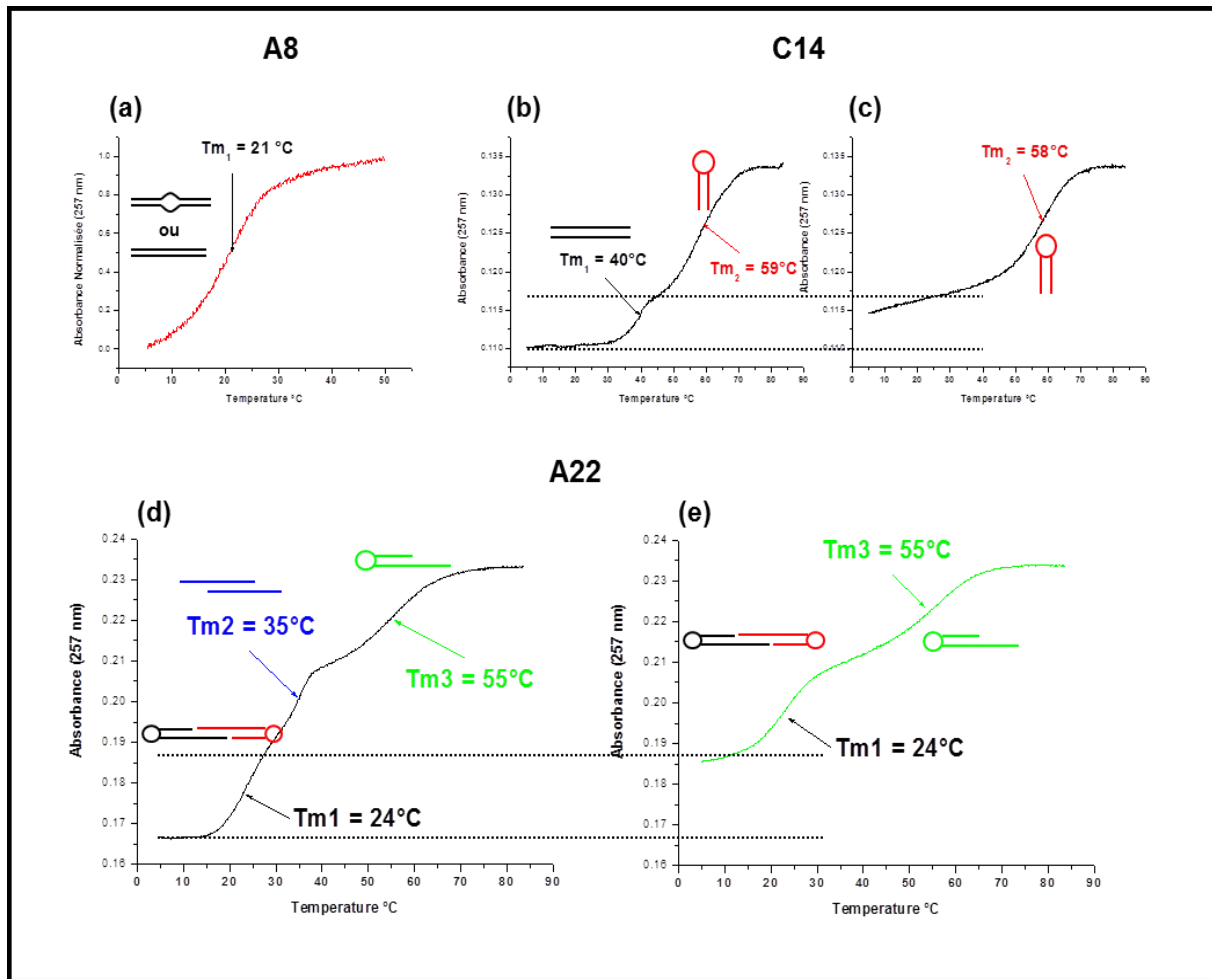


Figure 17: Structures proposées pour les séquences A8, C14 et A22 en UV.
 (a) séquence A8 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM cacodylate de sodium, 1 μ M brin, dénaturation 1, (b) et (c) séquence C14 10 mM cacodylate de sodium, 1 μ M brin, dénaturation 1 et 2 respectivement, (d) et (e) séquence A22 10 mM cacodylate de sodium, 1 μ M brin, dénaturation 1 et 2 respectivement.

Ainsi pour la séquence A8, nous proposons un duplexe intermoléculaire contenant ou non une boucle interne (**Figure 17a, Tableau 1b-c**). Pour la séquence C14, la forme présente majoritairement en solution est selon nous la structure en tige-boucle (**Figures 17b-c, Tableau 1a**). Dans les conditions de l'UV, la séquence A22 est présente sous deux formes, une structure en tige-boucle dimérisée ou sous forme de monomère (**Figures 17e, Tableau 1a-b**). On voit ainsi qu'à la concentration des expériences UV (1 μ M brin) la forme favorisée est la tige-boucle pour les séquences C14 et A22.

Dans les conditions de l'infrarouge, environ 20 mM brin en ARN, le nombre de formes possible est beaucoup plus limité qu'en UV puisque l'on observe une seule forme structurale pour chaque séquence. Les formes majoritaires observées sont les structures intermoléculaires en duplexe (**Figure 18**).

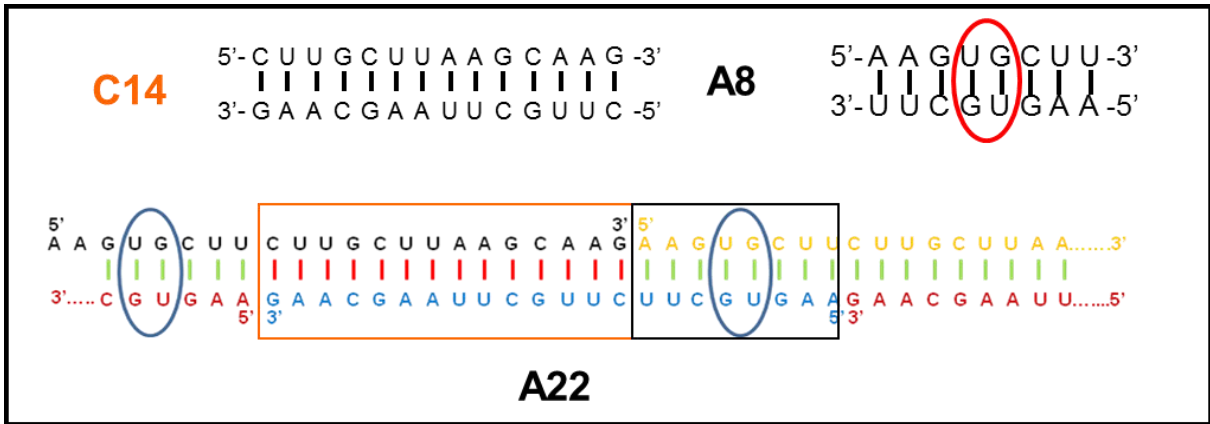


Figure 18: Formes structurales majoritaires observées en infrarouge pour les séquences A8, C14 et A22.
 Les paires de bases de type wobble sont entourées en rouge et bleu.

L'étude des séquences A8, C14 et A22 avait pour objectif d'obtenir des informations structurales afin de proposer un modèle de repliement pour DsrA, en particulier dans la région de la deuxième tige-boucle. Le programme de repliement des ARNs, RNAfold ⁽¹⁶⁾, permet d'obtenir plusieurs repliements possibles de la séquence DsrA. A « basse » température on obtient un repliement très proche du modèle I de la **Figure 3**. A plus haute température, le modèle I n'est plus énergétiquement favorable et la structure la plus stable est représentée **Figure 19**.

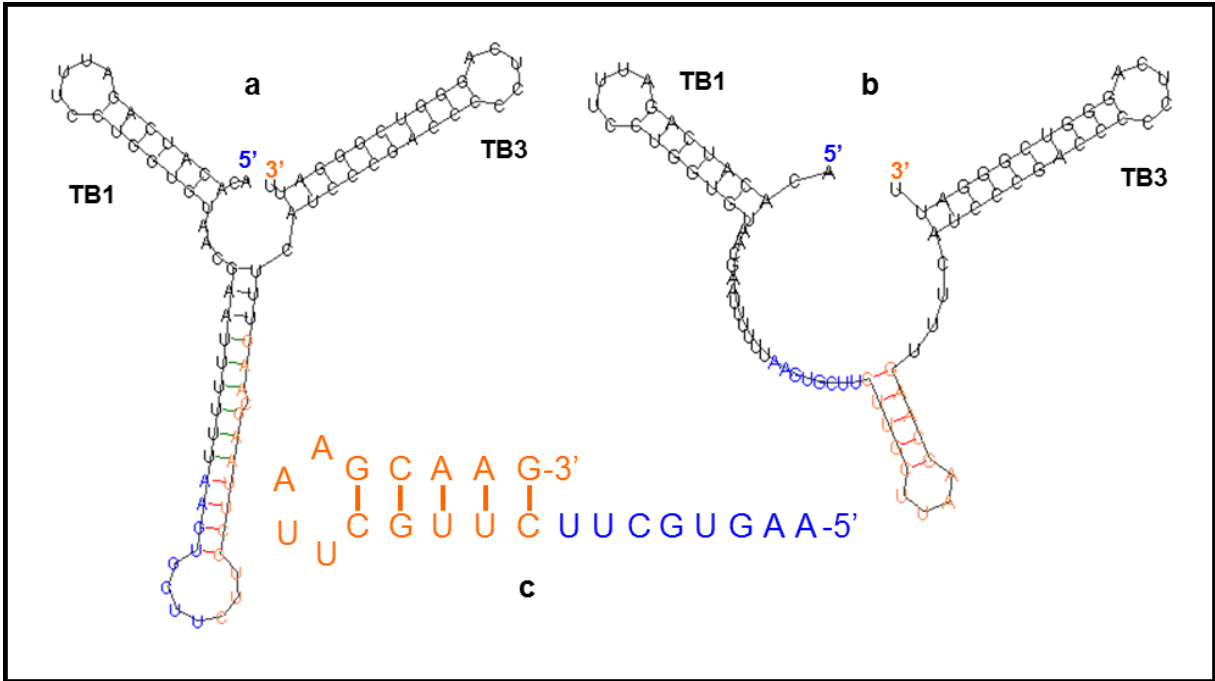


Figure 19 : Modèles DsrA obtenus par RNAfold ⁽¹⁶⁾.
 (a) à « basse » température, (b) à plus haute température, (c) pour comparaison modèle proposé pour la séquence A22 dans les conditions de l'UV.

Ainsi les résultats des expériences UV sur la séquence A22 sont tout à fait compatibles avec le repliement proposé par le programme RNAfold.

Le modèle structural de la séquence A22 dans les conditions de l'infrarouge, **Figure 18**, nous amène à envisager une dimérisation de DsrA. Lorsque l'on utilise le programme RNAfold ⁽¹⁶⁾ avec deux brins DsrA, là encore, selon la température imposée lors du calcul de minimisation de l'énergie, plusieurs structures possibles sont obtenues, **Figure 20**.

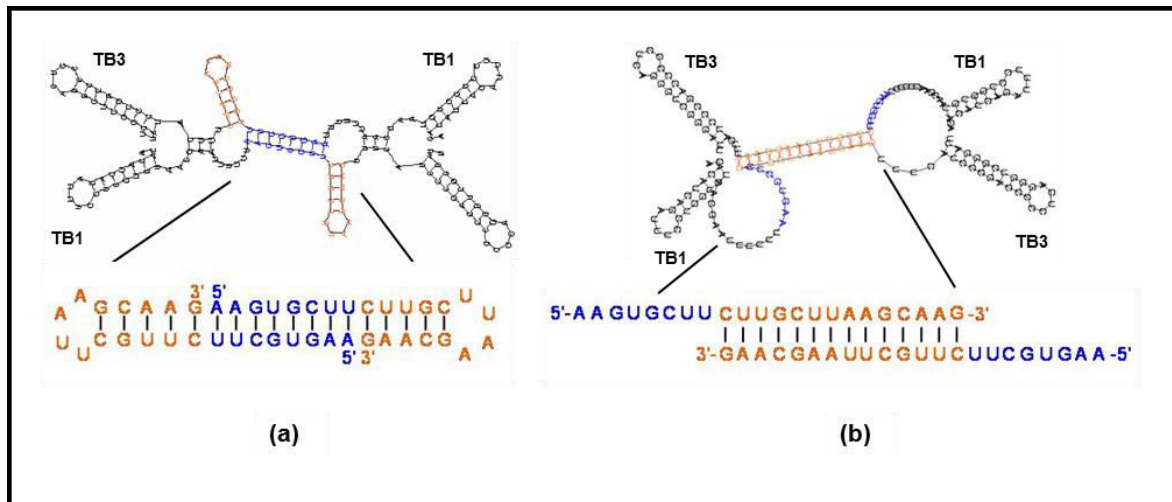


Figure 20 : Modèles de dimérisation de DsrA obtenus par RNAfold ⁽¹⁶⁾. (a) à « basse » température, (b) à plus haute température.

Les appariements proposés pour le dimère de DsrA, **Figure 20**, sont en total accord avec les propositions de structure faites dans les paragraphes précédents. Ainsi le dimère à « basse » température, **Figure 20a**, est constitué entre autre de la structure en tige-boucle proposée pour la séquence C14, en orange sur la **Figure 20a**, ainsi que de la structure intermoléculaire impliquant deux appariements de type wobble proposée pour la séquence A8. Le motif représenté en orange et bleu sur la **Figure 20a** est en fait le modèle de la séquence A22 proposé dans les conditions de l'UV. De même on remarque que le duplexe intermoléculaire avec les extrémités 5' pendantes que l'on voit sur la **Figure 20b** est entièrement compatible avec les propositions issues des résultats infrarouge.

Nous nous sommes limités avec le programme RNAfold à un dimère de DsrA mais on aurait pu aussi envisager des structures plus complexes avec 3, 4 ou 10 monomères de DsrA. Ainsi il est tout à fait possible d'étendre à DsrA le modèle de polymérisation décrit en infrarouge pour la séquence A22, **Figure 18**. Des travaux effectués par l'équipe de Véronique Arluison, en utilisant des techniques comme la microscopie en transmission ou la microscopie à force atomique, ont ainsi montré une polymérisation assez complexe de DsrA. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

L'ensemble de ces résultats montre que le domaine central DsrA est variable et que selon les conditions du milieu, plusieurs structures stables d'un point de vue thermodynamique sont envisageables. Une étude structurale par RMN permettrait de vérifier ces hypothèses bien que la variabilité de la partie centrale risque de perturber l'analyse des résultats.

III. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE FTIR DE L'INTERACTION DE HFQ AVEC UN ADN DOUBLE BRIN

La régulation de RpoS par DsrA s'établit par l'intermédiaire de la protéine Hfq mais les sites d'interactions aussi bien sur les ARNs que sur la protéine sont assez mal connus. Ainsi, dans une deuxième étape, les interactions potentielles de Hfq avec un ADN double brin dA₂₀.dT₂₀ ont été étudiées par spectrométrie IRTF.

III.1. Spectre Infra Rouge du complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq

La spectroscopie IRTF nous a permis d'obtenir des informations sur la structure du complexe formé entre Hfq et une double hélice d'ADN, dA₂₀-dT₂₀.

La **Figure 21** présente le spectre enregistré en solution dans D₂O du complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq préparé avec un rapport ADN/protéine de 7 paires de bases A-T par hexamère de protéine (*Annexe I, II. Oligonucléotides et protéine Hfq et III. Expériences infrarouge*).

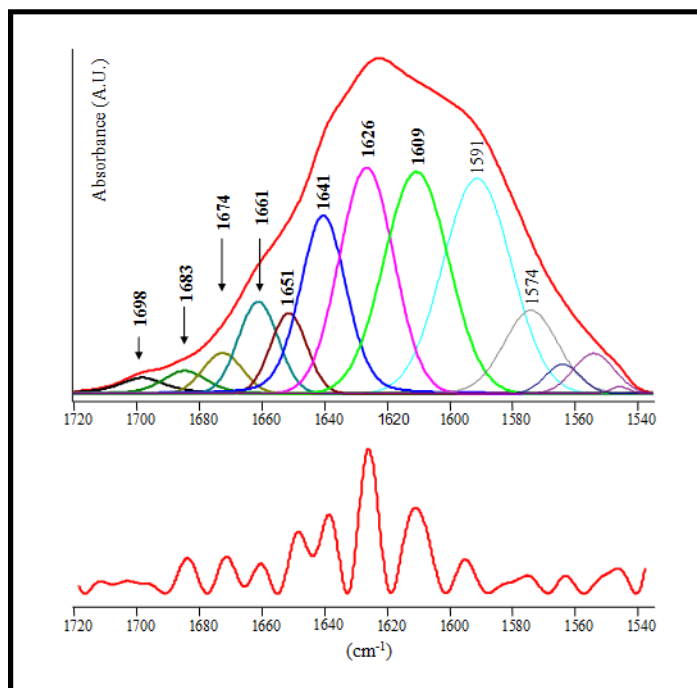


Figure 21 : Spectre IRTF du complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq
 Haut : spectre enregistré en solution dans D₂O (en rouge) ainsi que les différentes contributions obtenues par déconvolution. Bas : dérivée quatrième du spectre.

Le domaine spectral de 1720 à 1535 cm^{-1} rend compte d'une part des bandes d'absorption de l'acide nucléique attribuables aux vibrations des doubles liaisons des bases dans leurs plans et d'autre part, celles attribuées aux vibrations Amide I de la protéine (*Annexe II*, I. Étude des acides nucléiques et des protéines par spectroscopie infrarouge). Dans cette région, les absorptions attribuées aux acides nucléiques sont sensibles à l'appariement des bases ainsi qu'aux interactions dues à leur empilement. Celles attribuées aux vibrations de la protéine (essentiellement une vibration d'élongation du carbonyle des groupements peptidiques CONH) sont sensibles à l'établissement d'une liaison hydrogène sur ce carbonyle et sont donc caractéristiques de la structure secondaire adoptée par la protéine (hélice α , feuillet β parallèle ou antiparallèle...). Une procédure de décomposition du massif en composantes a été utilisée, et les différentes contributions sont également présentées. Dans la partie inférieure de la **Figure 21** est représentée la courbe dérivée quatrième du spectre. Les positions des maxima de cette courbe donnent une bonne estimation des positions des bandes utilisées par la suite pour les calculs d'ajustement des composantes.

Les attributions des différentes contributions trouvées sont données dans le **Tableau 8**.

	Thymine C2=O2	Feuillet β	Coude β	Thymine C4=O4	Hélice α	T cycle Feuillet β pelote	Adénine Feuillet β .	β agg
ADN ⁽¹⁹⁾	1696			1662		1640	1624	
Complexe	1698	1683	1674	1661	1651	1641	1626	1609
Hfq ⁽²⁰⁾		1683	1670		1659	1641	1636	1609

Tableau 8 : bandes d'absorption IR de l'acide nucléique et de la protéine dans le complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq avec pour comparaison les valeurs pour le duplexe dA₂₀-dT₂₀ seul et la protéine Hfq seule.

Les attributions des spectres du complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq ont été effectuées par comparaison avec ceux de double-hélices de polynucléotides pouvant adopter différentes géométries, à savoir le d(A-T)_n en conformation soit de type famille B soit de type famille A, et le rA_n-dT_n en conformation hétéronome.

Trois bandes sont dues aux vibrations des thymines (élongation du C2=O2 à 1698 cm^{-1} , élongation du C4=O4 à 1661 cm^{-1} et vibration du cycle à 1641 cm^{-1}). La bande située à 1626 cm^{-1} , est attribuée à une vibration du cycle de l'adénine couplée à une déformation du

groupement ND₂.⁽¹⁹⁾ Les autres bandes correspondent à des vibrations Amide I de portions de la protéine adoptant diverses conformations : feuillets β antiparallèles à 1683 cm⁻¹, coudes β à 1674 cm⁻¹, hélices α à 1651 cm⁻¹, pelote statistique à 1641 cm⁻¹, structures β associées à 1626 et 1609 cm⁻¹.⁽²⁰⁾ Afin d'obtenir des informations concernant la structure de l'ADN dans le complexe, nous avons soustrait du spectre du complexe le spectre de la protéine obtenu dans les mêmes conditions. Ceci a été effectué pour les spectres enregistrés en solution dans D₂O et dans H₂O. Les résultats obtenus sont discutés ci-dessous.

III.2. Ouverture partielle de la double-hélice dans le complexe

La **Figure 22** présente le spectre, en solution dans D₂O, de l'ADN dans le complexe.

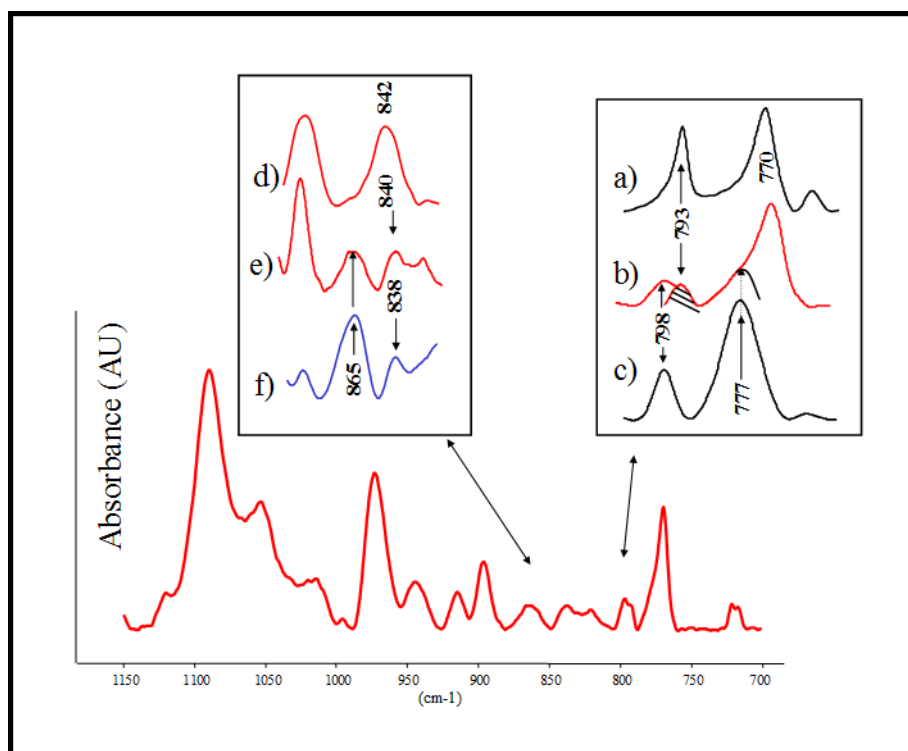


Figure 22 : Spectre (D₂O) de l'ADN dans le complexe obtenu par soustraction du spectre de Hfq.
 Insert droit : région spectrale 810-750 cm⁻¹ : ouverture partielle de la double-hélice
 Insert gauche : région spectrale 900-800 cm⁻¹ : conformation des sucres

Ce spectre a été obtenu par différence en soustrayant le spectre de la protéine de celui du complexe à l'aide du logiciel de traitement de spectre (Spectrum). Deux régions d'intérêt sont montrées à plus grande échelle dans les inserts. L'insert de droite présente le domaine agrandi entre 810 et 750 cm⁻¹. Le spectre de l'ADN dans le complexe, **Figure 22b**, est comparé avec ceux du dA₂₀-dT₂₀ enregistrés à 4°C, **Figure 22a** double-hélice, et à 80°C, **Figure 22c** double-hélice dénaturée. Dans cette région, on attend une absorption de l'adénine autour de

795 cm^{-1} et une absorption de la thymine autour de 770 cm^{-1} . Ces absorptions se déplacent lors de la fusion de la double-hélice, ce qui reflète la rupture des liaisons hydrogène A-T. C'est ainsi que lors de l'élévation de la température, la bande de l'adénine dans le spectre de dA₂₀-dT₂₀ se déplace de 793 à 798 cm^{-1} (dans un simple brin dA₁₅ elle est observée à 798 cm^{-1}) tandis que la bande de thymine se déplace de 770 à 777 cm^{-1} (dans le simple brin dT₁₅ elle est observée à 777 cm^{-1} , **Tableau 9**) (comparer les courbes a et c **Figure 22**).

dA ₁₅	dT ₁₅	dA ₂₀ -dT ₂₀			Attribution
simple brin	simple brin	double-hélice	double-hélice	ADN dans le	
		T=4°C	dénaturée	complexe	
			T=80°C		
798			798	798	A libre
		793		793	A liée
	777		777	777	T libre
		770		770	T liée

Tableau 9 : mise en évidence de l'ouverture partielle de la double-hélice induite par Hfq (nombres d'ondes IR en cm^{-1}).

Le spectre de l'ADN dans le complexe, **Figure 22b**, présente les deux « jeux » d'absorptions ce qui reflète la coexistence d'adénines et de thymines libres avec des adénines et des thymines appariées par liaison hydrogène. Ceci indique une ouverture partielle de la structure en double-hélice lors de l'interaction avec Hfq.

III.3. Conformation des thymidines

Dans les acides nucléiques contenant des paires de bases A-T, on observe dans la région 1290-1270 cm^{-1} une absorption de la thymidine très sensible à la géométrie de ce nucléotide.⁽²¹⁾ La **Figure 23** présente les spectres enregistrés en solution dans H₂O de l'ADN dans le complexe (**Figure 23a**), du dA₂₀-dT₂₀ seul (**Figure 23b**) et d'un film hydraté de d(A-T)_n enregistrés à 100% d'humidité relative (**Figure 23c**, conformation B) et 58% d'humidité relative (**Figure 23d**, conformation A).

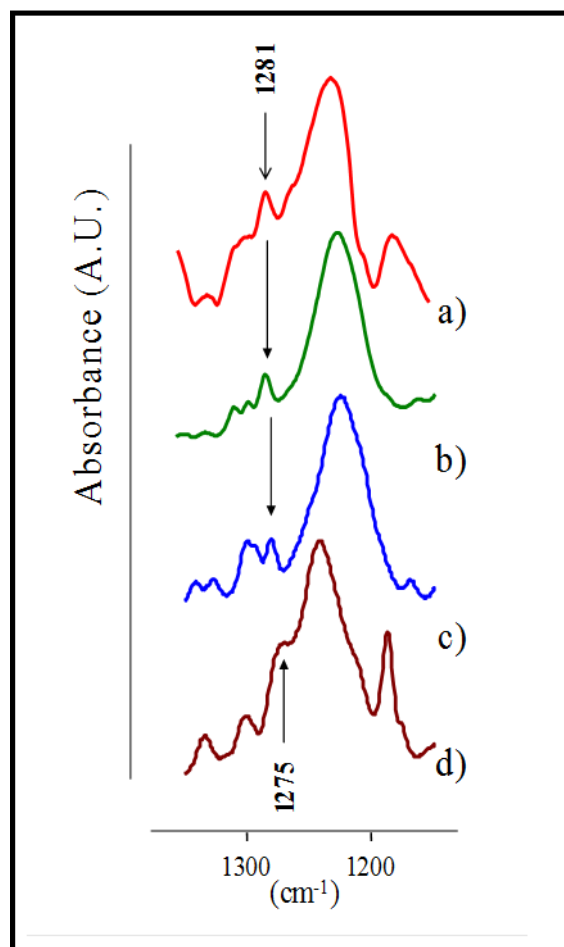


Figure 23 : Spectres dans la région des vibrations d'élongation antisymétrique des groupements phosphates de :
 a) $dA_{20}.dT_{20}$ dans le complexe (solution H_2O), b) $dA_{20}.dT_{20}$ (solution H_2O), c) $d(A-T)_n$ forme B (film 100% HR), d) $d(A-T)_n$ forme A (film 58% HR)

D'autres spectres de référence ne sont pas montrés, mais les nombres d'ondes des bandes d'intérêt sont indiqués dans le **Tableau 10**.

	dT avec sucres de type S	dT avec sucres de type N
$dA_{20}-dT_{20}$ dans le complexe	1281	
$dA_{20}-dT_{20}$	1281	
$rA_{15}-dT_{15}$	1281	
dT_{15}	1281	
$d(A-T)_n$ RH 100%	1281	
$d(A-T)_n$ RH 58%		1275

Tableau 10 : marqueurs de la conformation du sucre dans les désoxythymidines (cm^{-1}).

La transition conformationnelle B→A dans le d(A-T)_n induite par diminution de l'humidité relative est reflétée par un déplacement de la bande de thymidine de 1281 à 1275 cm⁻¹. Ces deux nombres d'onde correspondent aux positions trouvées pour des nucléotides avec des thymines liées respectivement à des sucres en géométries de type S et N. Nous voyons que l'absorption de la thymidine dans le spectre du complexe est située à 1281 cm⁻¹ (**Figure 23a**), c'est-à-dire à la même position que pour le dA₂₀-dT₂₀ libre et que pour les autres structures possédant des thymidines avec des sucres de type S. L'absence de bande autour de 1275 cm⁻¹ nous permet d'exclure l'hypothèse de thymidines avec des sucres de type N dans le complexe.

III.4. Conformation des sucres : mise en évidence de changements structuraux

La spectroscopie IR nous permet de caractériser directement la géométrie des sucres dans les acides nucléiques grâce à des bandes marqueurs des différentes conformations situées dans le domaine 900-800 cm⁻¹. Une absorption située vers 840 cm⁻¹ indique l'existence de sucres de type S (par exemple dans le spectre de dA_n-dT_n, **Figure 22d**) alors qu'une absorption vers 865 cm⁻¹ est caractéristique de sucres de type N.⁽²²⁾

Le **Tableau 11** rassemble les résultats concernant les conformations des sucres de l'acide nucléique dans le complexe avec Hfq.

	Attribution de la géométrie des sucres			
	type N		type S	
dA₂₀-dT₂₀			842	dA, dT
dA₂₀-dT₂₀ dans le complexe avec Hfq	865	dA	840	dA,dT
dA₇			841	dA
dA₇ dans le complexe avec Hfq	867	dA	838	dA
rA₁₅-dT₁₅	865	rA	838	dT
dT₁₅			836	dT

Tableau 11 : absorptions IR caractéristiques des conformations des sucres (nombres d'ondes en cm⁻¹).

Nous observons sur le spectre de l'ADN dans le complexe (**Figure 22e**) l'émergence de sucres de type N quand le dA₂₀-dT₂₀ interagit avec Hfq (bande à 865 cm⁻¹). Dans les double-hélices hétéronomes formées par un brin dT_n et un brin rA_n, les sucres du brin dT_n sont dans une géométrie de type S et ceux du brin rA_n dans une géométrie de type N. Ainsi dans le

spectre du rA₁₅-dT₁₅ (**Figure 22f**) deux bandes sont observées à 865 et 838 cm⁻¹ que l'on peut attribuer respectivement aux sucres de type N du rA₁₅ et de type S du dT₁₅.

Dans le cas du complexe dA₂₀-dT₂₀-Hfq, les deux conformations de sucres sont observées. Cependant, ainsi qu'indiqué dans le paragraphe précédent, on ne trouve pas de thymidines avec des sucres de type N.

Ces deux faits réunis nous permettent de proposer que l'interaction avec Hfq entraîne une transition partielle des sucres du brin dA₂₀ qui passent d'une géométrie de type S vers une géométrie de type N. Les sucres du brin dT₂₀, quant à eux restent inchangés. Une telle transition avait déjà été observée (données non publiées) dans le cas d'un complexe formé entre un simple brin dA₇ et la protéine Hfq (**Tableau II**, lignes 3 et 4). Nous pouvons également remarquer qu'il a été proposé, par RG Brennan et TM Link, qu'un oligoribonucléotide rA₁₈ en conformation de type N pourrait occuper de façon « quasi parfaite » le site distal de Hfq.⁽⁴⁾

En résumé, cette étude par spectroscopie IRTF a montré qu'une ouverture partielle de la double-hélice d'ADN a lieu lors de l'interaction avec Hfq. La géométrie du brin dT₂₀ n'est pas affectée avec des sucres en conformation S. Au contraire la géométrie du brin dA₂₀ change et les sucres adoptent une conformation de type N, semblable à celle observée dans les ARN simple brins. Ces changements structuraux peuvent être à l'origine de l'affinité inattendue de Hfq pour cette double-hélice d'ADN.

L'étude de l'auto-association de DsrA a été réalisée par spectroscopie UV et FTIR, en étudiant les structures de séquences de plus en plus complexes (A8, C14 et A22). Deux modèles d'appariement pour le dimère de DsrA sont proposés en fonction de la température. Une perspective intéressante, serait d'étudier les interactions de la protéine Hfq avec l'ARN non-codant DsrA.

Jusqu'à présent, peu de données structurales existent sur l'interaction de Hfq avec des ADN. Cette étude nous a permis de montrer que l'association de Hfq avec un duplexe dA₂₀-dT₂₀, se fait par ouverture partielle de la double-hélice en entraînant une transition S → N de la conformation des sucres du brin purine. Ces résultats inattendus, décrivant l'interaction de Hfq avec un duplexe d'ADN, nous incitent à étudier les interactions potentielles de cette protéine avec d'autres séquences d'ADN. On sait par exemple qu'un monomère Hfq est semblable, structurellement et fonctionnellement, aux protéines eucaryotes de type Sm et il a

été montré que ces protéines sont impliquées dans la réplication de la télomérase.⁽²³⁾ Il serait donc intéressant de voir si les tetraplexes de guanine peuvent interagir avec Hfq.

Ce travail a donné lieu à 2 publications :
Geinguenaud & al, RNA Biol. 2009 ; 6 : 434-445.
Geinguenaud & al, Phys. Chem. Chem. Phys. 2011 ; 13 : 1222-1229.

Références bibliographiques

1. Rolle K, Zywicki M, Wysko E, Barciszewska MZ, Barciszewska J. Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from E.Coli and its functional consequences. *J. Biochem* 2006 ; **139** : 431-438.
2. Urban JH, Vogel J. Translational control and target recognition by Escherichia coli small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Research* 2007 ; **35** : 1018-1037.
3. Franze De Fernandez MT, Hayward WS, August JT. Bacterial proteins required for replication of phage Q β ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 1972 ; **247** : 824-831.
4. Brennan RG, Link T. Hfq structure, function and ligand binding. *Current Opinion in Microbiology* 2007 ; **10** : 125-133.
5. Schumacher M, Pearson R, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan R. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *Embo J.* 2002 ; **21** : 3546-3556.
6. Azam TA, Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* 1999 ; **274** : 33105-33113.
7. Tolstorukov M, Virnik KM, Adhya S, Zhurkin VB. A-tract clusters may facilitate DNA packaging in bacterial nucleoid. *Nucleic Acids Res.* 2005 ; **33** : 3907-3918.
8. Repoila F, Gottesman S. Signal transduction cascade for regulation of RpoS : temperature regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* 2001 ; **183** : 4012-4023.
9. Sledjeski D, Gottesman S. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 ; **92** : 2003-2007.
10. Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 ; **95** : 12462-12467.
11. Arluison V, Hohng S, Roy R, Pellegrini O, Régner P, Ha T. Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA. *Nucleic Acids Research* 2007 ; **35** : 999-1006.
12. Lease R, Woodson S. Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J. Mol. Biol.* 2004 ; **344** : 1211-1223.
13. Brescia C, Mikulecky P, Feig A, Sledjeski D. Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* 2003 ; **9** : 33-43.
14. Mergny J-L, Lacroix L. Des Tms, encore des Tms, toujours des Tms ! *Regard sur la Biochimie* 2002 ; **2** : 36-52.
15. Tsuboi M, Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids. *in: E.G.J. Brame (Ed.), Applied Spectroscopy Reviews, Dekker, New York* 1969 ; 45-90.
16. <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>.

17. Cayrol B, Geinguenaud F, Lacoste J, Busi F, Le Dérout J, Piétrement O, Le Cam E, Régnier P, Lavelle C, Arluison V. Auto-assembly of *E. coli* DsrA small noncoding RNA. *RNA Biology* 2009 ; **6** : 434-445.
18. Lavelle C, Buckle M. Nucleic acid-protein interactions : Wedding for love or circumstances ? *Biochimie* 2009 ; **91** : 943-950.
19. Taillandier E, Liquier J. Vibrational Spectroscopy of Nucleic Acids in Handbook of Vibrational Spectroscopy (2002), J. M. Chalmers and P. R. Griffith Ed., Wiley Pub. Co., pp3465-3480.
20. Arluison V, Mura C, Romero Guzman M, Liquier J, Pellegrini O, Gingery M, Regnier P, Marco S. Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins : Hfq and other Sm-like proteins. *Journal of Molecular Biology* 2006; **356** : 86-96.
21. Liquier J, Akhebat A, Taillandier E, Ceolin, F, Huynh Dinh T, Igolen J. Characterization by IRTF spectroscopy of the oligoribonucleotide duplexes r(A-U)₆ and r(A-U)₈ *Spectrochimica Acta* 1991 ; **47A** : 177-186.
22. Adam S, Liquier J, Taboury JA, Taillandier E. Right- and left-handed helices of poly d(A-T).poly d(A-T) investigated by I.R. spectroscopy. *Biochemistry* 1986 ; **25** : 3220-3225.
23. Toro I, Thore S, Mayer C, Basquin J, Seraphin B, Suck D. RNA binding in an Sm core domain :X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *Embo J.* 2001; **20**: 2293-2303.

Chapitre 3

Ciblage de STAT3 par un Oligonucléotide Leurre

I. PRESENTATION DE STAT3 : INTERET DE CIBLER STAT3

II. CONCEPTION, SYNTHÈSE DU VECTEUR

**III. DÉTERMINATION DU NOMBRE D'OLIGONUCLEOTIDES PAR
NANOPARTICULE**

**IV. ÉTUDE STRUCTURALE DE L'OLIGONUCLEOTIDE À LA SURFACE DE LA
NANOPARTICULE**

V. ÉVALUATION BIOLOGIQUE DU VECTEUR

Ce chapitre porte sur l'élaboration et la caractérisation d'un nanovecteur superparamagnétique permettant de délivrer des oligonucléotides dans des cellules en culture. Le but de ce projet est de mettre au point un vecteur capable de transporter un oligonucléotide leurre ayant la potentialité d'interagir avec le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) une protéine impliquée dans le développement de nombreux cancers. Ce vecteur a été testé sur des cellules issues d'un adénocarcinome du colon (SW480) en collaboration avec le groupe du Dr. Rémi Fagard de l'Unité INSERM 978.

I. PRESENTATION DE STAT3 : INTERET DE CIBLER STAT3

I.1. Rôle physiologique de STAT3 et son implication dans l'oncogénèse

La famille des protéines STATs « Signal Transducers and Activators of Transcription » est composée, chez les mammifères, de 7 membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Ce sont des facteurs de transcription qui régulent la transcription des gènes en s'y fixant. Les STATs participent à la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la croissance, la prolifération ou l'apoptose et remplissent ainsi différentes fonctions biologiques en participant à l'embryogenèse, le développement de l'organisme, l'induction de réponses inflammatoires et immunitaires.⁽¹⁻⁵⁾

La présence d'une forme constitutivement active de STAT3 a été démontrée dans les cellules et tissus de nombreuses tumeurs humaines alors que dans les cellules « saines » l'activation de STAT3 est étroitement contrôlée et transitoire.^(4, 6-9) Ainsi, STAT3, sous sa forme activée, est impliquée dans la régulation de gènes qui codent pour des protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1). De telles protéines par interactions avec des molécules pro-apoptiques vont induire une inhibition de l'apoptose à l'origine de la survie des cellules cancéreuses. Plusieurs études ont aussi démontré que STAT3 régule la transcription de la survivine un autre inhibiteur de l'apoptose.⁽¹⁰⁾ Outre son implication dans la régulation de l'apoptose, STAT3 est également impliquée dans les mécanismes de métastase et d'invasion cellulaire ce qui en fait une cible attractive pour le développement de thérapie contre les cancers en dépit de son implication dans de nombreux processus cellulaires et de son rôle critique dans l'embryogenèse. En tout état de cause, ainsi que le démontre le nombre croissant de publications sur le sujet, **Figure 1**, le développement d'outils permettant l'inhibition de STAT3 et ainsi une meilleure connaissance du rôle de STAT3 dans les cellules ne peut être que bénéfique à la compréhension globale des mécanismes régulant l'oncogénèse.

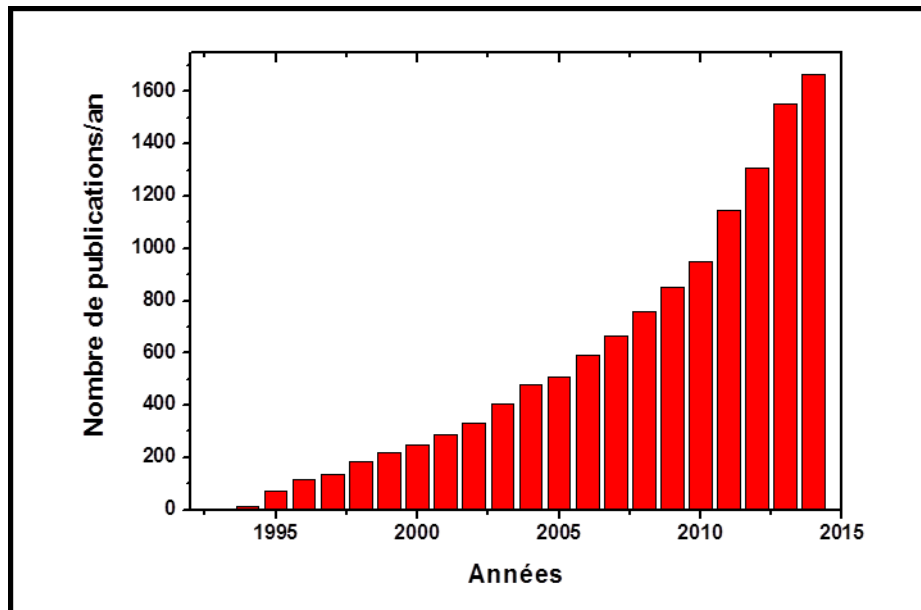


Figure 1 : Progression des publications sur « STAT3 » dans la base de données PubMed.

I.2. Structure et mode d'action de STAT3

La protéine STAT3, protéine de 92 kDa constituée de 770 acides aminés, est un facteur de transcription, présent à l'état latent dans le cytoplasme. Elle est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain), d'un site de phosphorylation, d'un domaine SH2 (Src Homology 2) qui va permettre la phosphorylation et d'un domaine d'activation de la transcription dans sa partie C-terminale, **Figure 2.**^(1, 11, 12)

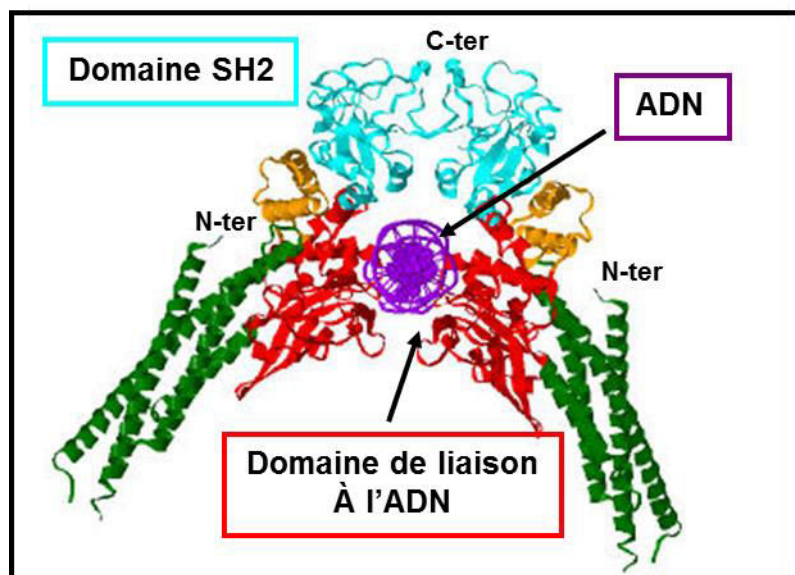


Figure 2 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de STAT3 lié à un ADN. (D'après PDB ID : 1BG1 et J. Bromberg et al⁽¹⁾)

STAT3 peut être activée dans le cytoplasme par phosphorylation de la tyrosine 705 au cours d'un processus faisant intervenir les kinases de la famille JAK « Janus Kinase », elles mêmes stimulées par des récepteurs de cytokines tels que celui de l'interleukine 6 (IL-6)^(2, 13), **Figure 3**, ou de l'interféron gamma (IFN γ)⁽¹⁴⁾. En dehors des cytokines, d'autres voies d'activation sont possibles qui font intervenir des facteurs de croissance comme EGF, VEGF, ou encore des hormones telles que la leptine.^(1, 15) Une fois activée par phosphorylation, STAT3 va former un homodimère qui va être pris en charge par des importines et subir une translocation dans le noyau à l'intérieur duquel le dimère va se fixer, via le DBD, sur l'ADN génomique et activer la transcription de gènes cibles, **Figure 3**.^(16, 17)

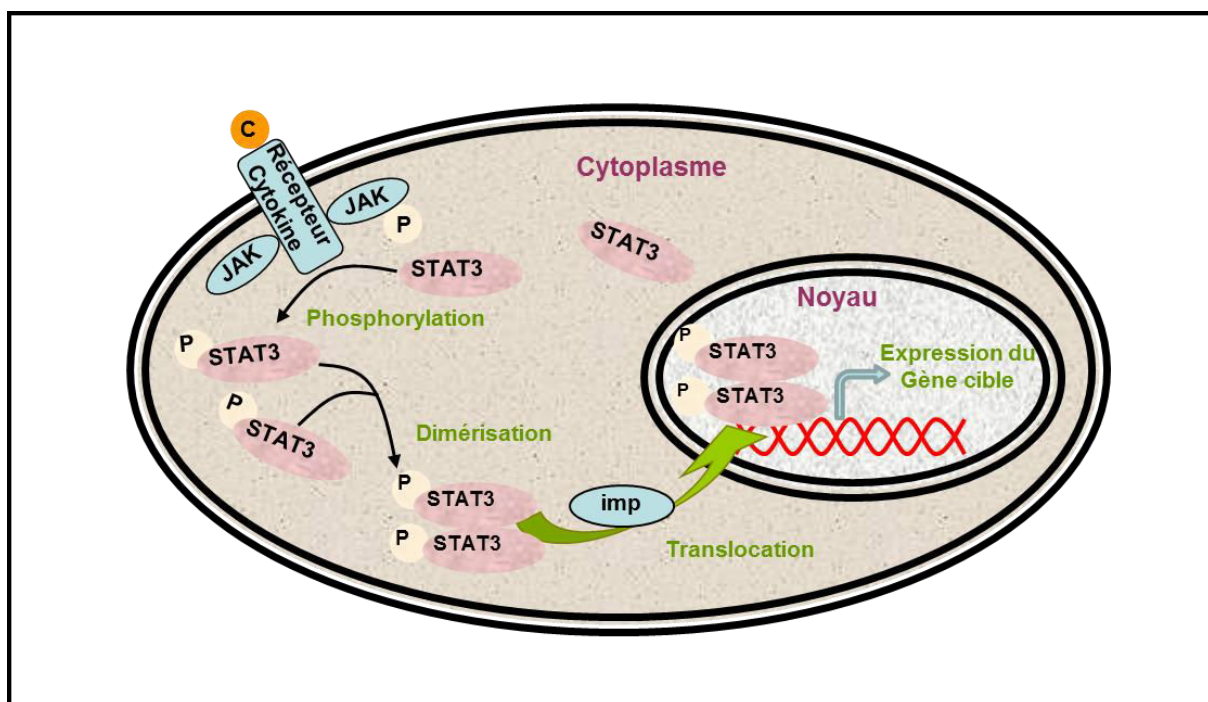


Figure 3 : Modèle d'induction de l'expression d'un gène par STAT3 activée par IL-6.

I.3. Stratégie d'inhibition de STAT3 : choix de l'oligonucléotide leurre

La stratégie leurre mise au point pour inhiber STAT3 consiste à introduire dans une cellule un oligonucléotide, dit « leurre », contenant une séquence nucléotidique reconnue par la protéine. Une fois dans le cytoplasme, cet oligonucléotide va pouvoir se lier spécifiquement à sa cible : STAT3. Le mécanisme d'action a notamment été démontré par le groupe du Dr. R. Fagard, Unité INSERM 978 : la présence dans la cellule d'une grande quantité d'oligonucléotide leurre va entraîner la saturation des sites de liaison à l'ADN du facteur de transcription

conduisant au blocage de la translocation des dimères de STAT3 vers le noyau, à leur accumulation dans le cytoplasme et ainsi à l'inhibition de la transcription, **Figure 4.**⁽¹⁶⁾

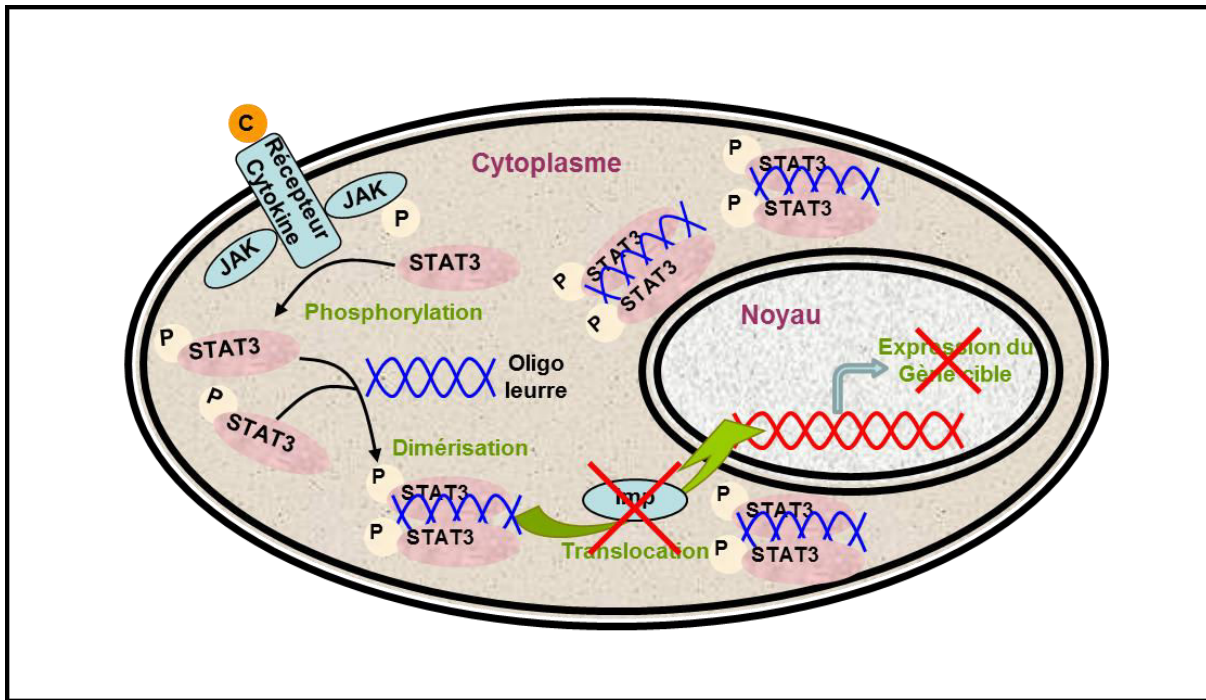


Figure 4 : Modèle d'inhibition de STAT3 par un oligonucléotide leurre.

La séquence consensus reconnue par le DBD n'est pas encore connue avec précision mais la plupart des auteurs semblent s'accorder sur des séquences dites « de type GAS (Gamma Interferon Activating Sequence) » comprenant les motifs centraux 5'-(TTCCN₃AA)-3' ou 5'-(TTCN₄AA)-3'. Comme le montre la **Figure 5**, il existe de nombreuses variations de séquence autour de ces motifs centraux et notre choix s'est porté sur une séquence déjà utilisée par plusieurs équipes.^(16, 18-19) Cette séquence, qui contient le motif central 5'-(TTCCN₃AA)-3', a d'ailleurs été évaluée en essai clinique (phase 0) sur des tumeurs de la tête et du cou.⁽¹⁹⁾

L'oligonucléotide (dODN) utilisé dans cette étude (**Figure 5**, Souissi et al 2012⁽¹⁶⁾) est constitué de 33 bases et peut se replier sur lui-même pour former une structure intramoléculaire en épingle à cheveux (hairpin). Il est protégé des exonucléases par un groupement AmC6 en 5' et marqué en 3' par un fluorophore (6-FAM = 6-carboxyfluorescein).

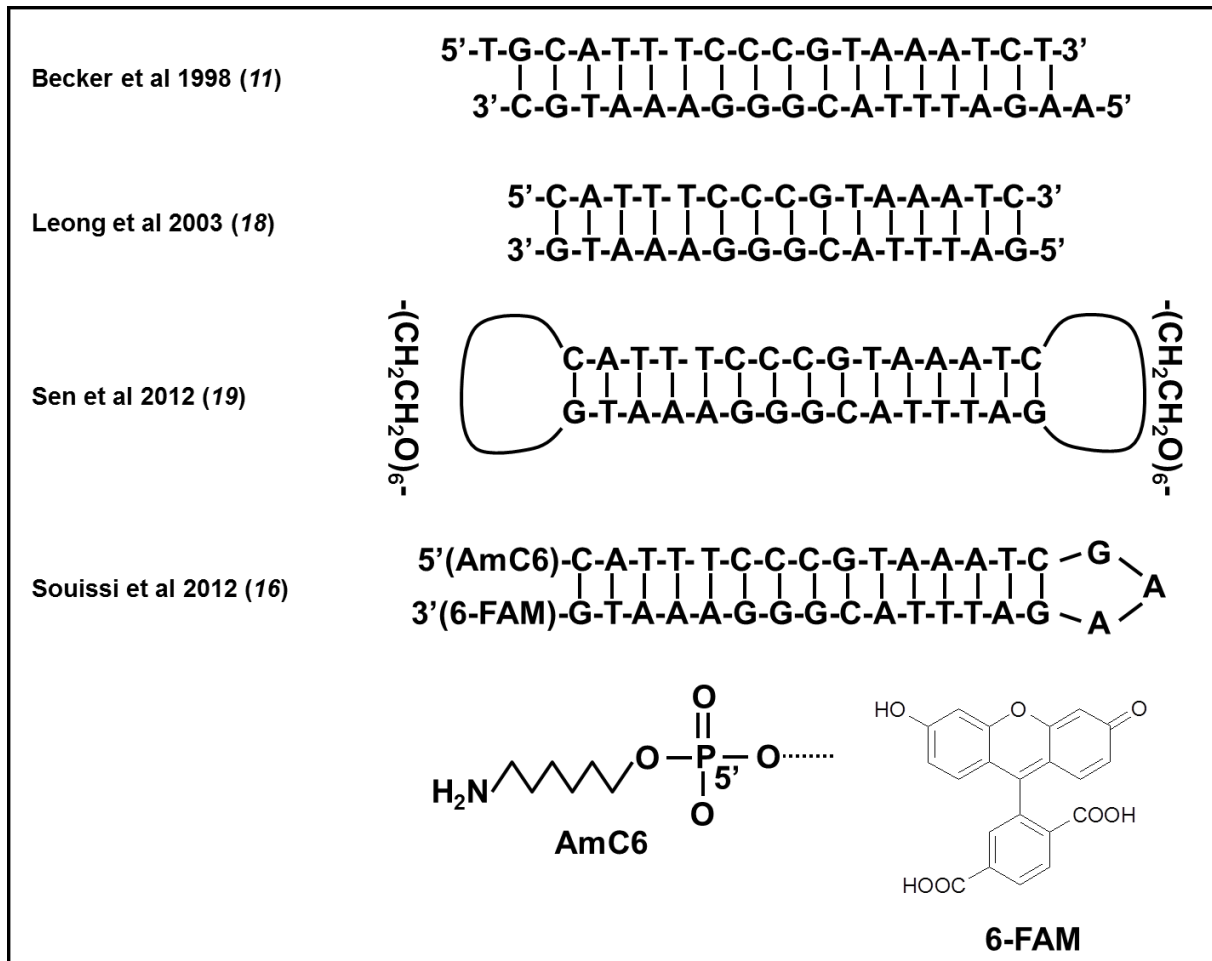


Figure 5 : Quelques oligonucléotides leurres utilisés pour le ciblage de STAT3.

II. CONCEPTION, SYNTHÈSE DU VECTEUR

II.1. Conception et originalité du vecteur

Le développement de l'ADN « médicament » passe nécessairement par la mise au point de vecteurs peu toxiques, efficaces et faciles à synthétiser à une échelle industrielle (Cf. *Chapitre I*). Hormis les vecteurs viraux, la plupart des stratégies permettant le transport d'un acide nucléique sont basées sur l'utilisation d'une molécule cationique qui va pouvoir former un complexe avec le polyanion qu'est l'ADN. Cette approche mettant en jeu des interactions ioniques d'énergie relativement faible va permettre à l'ADN d'être libéré de manière passive dans la cellule. En ce qui concerne les nanoparticules inorganiques, et plus particulièrement les nanoparticules d'oxyde de fer, l'ADN est souvent complexé sur des surfaces préalablement enrobées d'une couche d'un polymère cationique tel que le polyéthylèneimine (PEI), le polyamidoamine (PAMAM) ou encore le chitosan.⁽²⁰⁻²²⁾ De manière à protéger l'ADN dans le milieu extracellulaire et pour améliorer l'efficacité de transfection de ces

vecteurs, de nombreuses équipes ont ajouté à leur système une molécule lipidique.⁽²³⁻²⁴⁾ De tels systèmes se sont révélés très efficaces et la société Oz Biosciences commercialise depuis plusieurs années différentes nanoparticules d'oxyde de fer permettant la transfection *in vitro* de nombreuses lignées cellulaires. Cependant l'ajout sur la particule de molécules telles que les polycations est une source de toxicité supplémentaire, comme cela a été démontré pour le PEI ou la poly-Lysine.⁽²⁵⁻²⁷⁾ Au vu de la littérature existante, nous nous sommes donc donné comme objectif de mettre au point une méthode simple permettant la complexation d'acides nucléiques sur des nanoparticules d'oxyde de fer (maghémite, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) sans utiliser de polymères cationiques. Pour cela, nous avons décidé d'exploiter les propriétés acido-basiques des nanoparticules d'oxydes métalliques synthétisées en milieu aqueux pour la complexation de l'acide nucléique.

A la surface des nanoparticules d'oxydes métalliques, les ions sont sous-coordinés du fait de l'interruption du réseau, et en solution aqueuse, ces ions complètent leur coordinence par protonation au contact de la solution. Ces groupements hydroxyles, résultant de la chimisorption des molécules d'eau, sont amphotères et conduisent à des sites chargés positivement ou négativement suivant le pH de la solution, **Figure 6**.

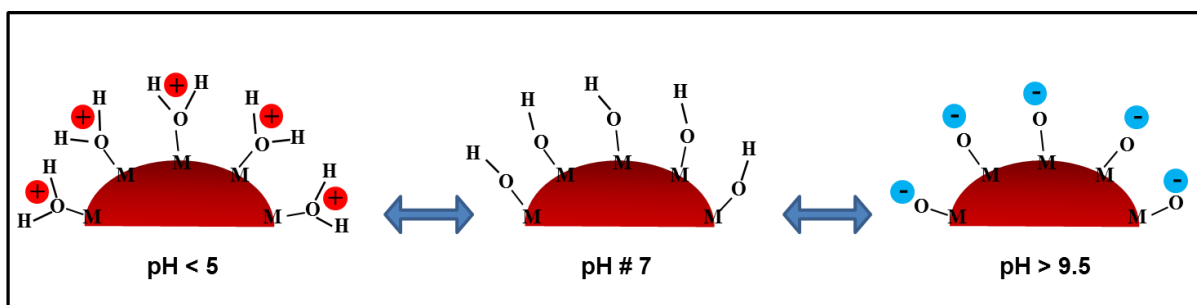


Figure 6 : Charge de surface en fonction du pH.

A pH acide (<5) les groupements hydroxyles liés au métal vont se protoner ($\text{M}-\text{OH}_2^+$) conférant à la particule une charge positive alors qu'à pH basique (>9.5) ils vont se déprotoner ($\text{M}-\text{O}^-$) et ainsi rendre la particule négativement chargée (**Figure 6**).⁽²⁸⁻²⁹⁾

Ainsi en considérant ces propriétés acido-basiques, il devrait être possible de complexer un oligonucléotide chargé négativement directement sur une nanoparticule cationique sur le même principe qu'avec une particule recouverte de PEI. Cette hypothèse est confortée par le fait que de nombreuses molécules comportant des groupements phosphates ou phosphonates ont la capacité de se lier à la surface de particules d'oxyde de fer.⁽³⁰⁻³³⁾

II.2. Synthèse du vecteur

II.2.1. Synthèse des nanoparticules de maghémite

La synthèse des nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) a été effectuée par voie micellaire à partir du di-dodécylsulfate de fer II ($\text{Fe}(\text{DS})_2$) un tensioactif capable de former des micelles directes dans des conditions de concentration et de température données. Il s'agit d'une méthode classiquement utilisée dans notre laboratoire et directement adaptée de celle décrite par Pileni et al ⁽³⁴⁻³⁶⁾. Dans une première étape, le tensioactif est préparé par simple échange d'ions à partir d'une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium (SDS) à laquelle on ajoute une solution aqueuse de chlorure de fer II en léger excès par rapport au SDS. Les ions fer II sont alors substitués aux ions Na^+ et l'on obtient le $\text{Fe}(\text{DS})_2$ dans lequel un cation Fe^{2+} joue le rôle de contre-ion pour deux chaînes de dodécylsulfate, **Figure 7**. Le $\text{Fe}(\text{DS})_2$ est ensuite purifié par recristallisation et extrait par filtration à froid.

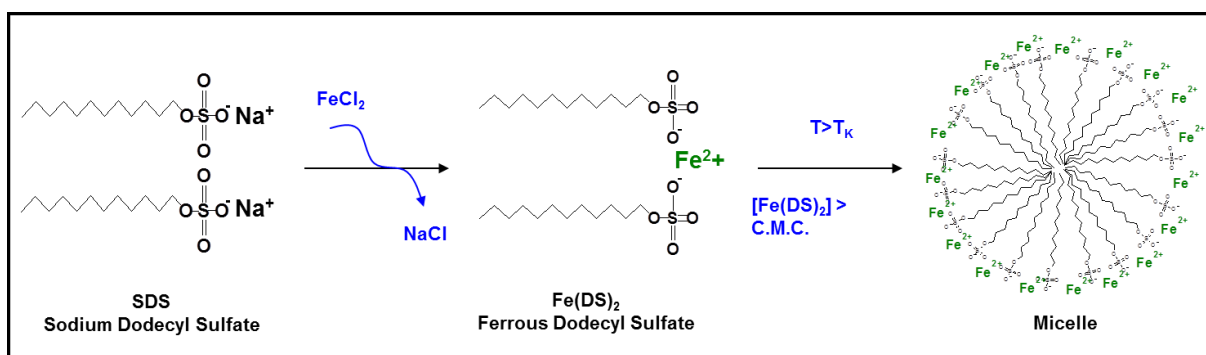


Figure 7 : Formation de micelles de $\text{Fe}(\text{DS})_2$.

Au-dessus d'une certaine température dite « température de Krafft (T_K) » et d'une certaine concentration dite « concentration micellaire critique (C.M.C.) », un tensioactif peut former spontanément des micelles. La taille des micelles formées ainsi que la taille des nanoparticules vont être influencées par la température et la concentration en tensioactif.^(35, 37)

Le $\text{Fe}(\text{DS})_2$ dans l'eau pure a une C.M.C. proche de $1,4 \cdot 10^{-3}$ M et une température de Krafft de 28°C . Aussi, nous nous sommes placés pour nos synthèses, dans de l'eau ultrapure à une température de $28,5^\circ\text{C}$ et une concentration en $\text{Fe}(\text{DS})_2$ égale à $14 \cdot 10^{-3}$ M.

Les nanoparticules de maghémite sont ensuite formées par addition d'une solution aqueuse de diméthylamine (DMA) qui va permettre l'oxydation du Fer II en Fer III et conduire à la formation d'un nanocristal d'oxyde de fer de type $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ assimilable à une sphère d'un diamètre moyen de 10 nm, **Figure 8**.

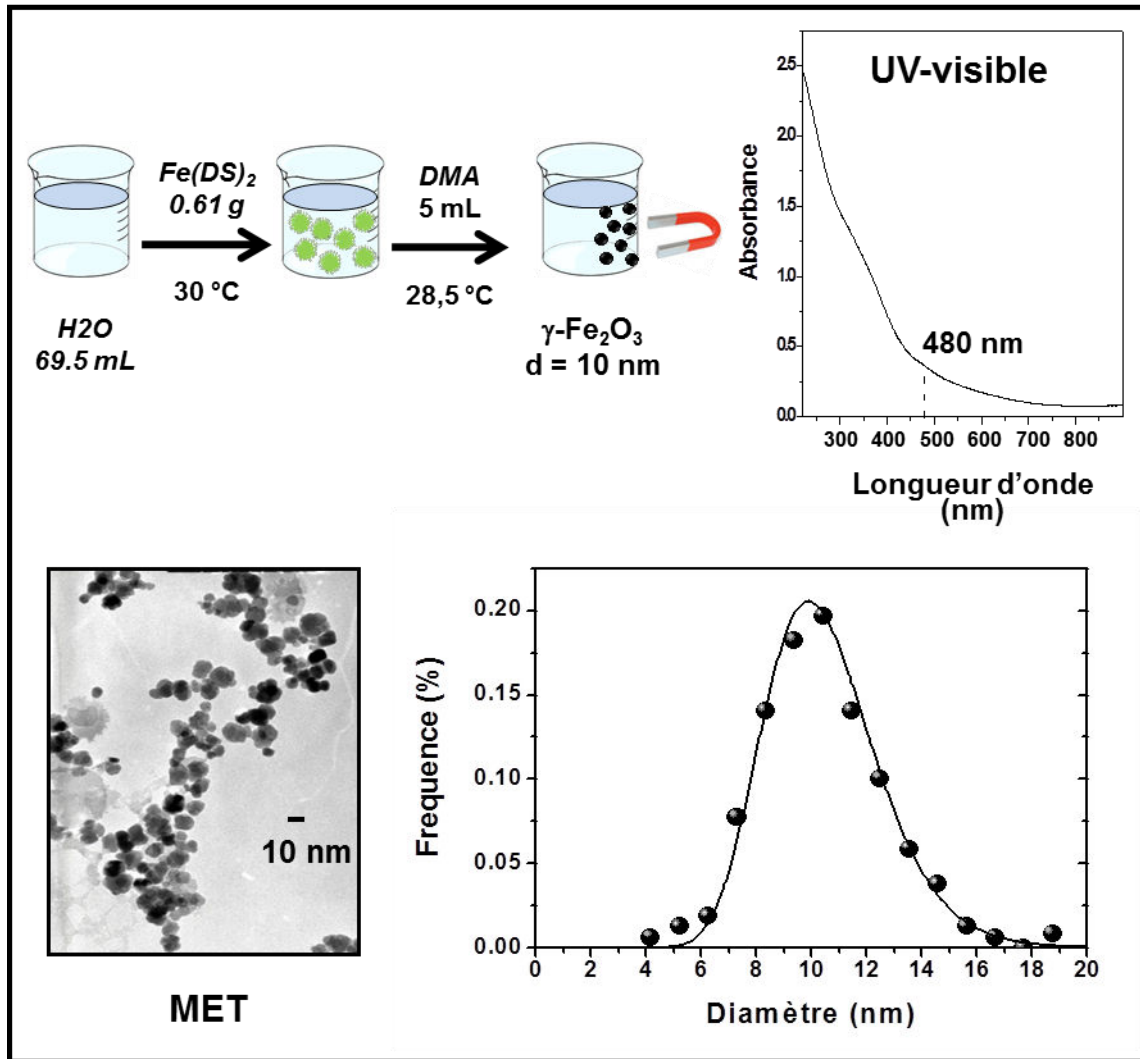


Figure 8 : Schéma de synthèse des nanoparticules de maghémite, spectre UV-visible, cliché MET et distribution en taille simulée par une fonction log normale. (Annexe II, II. Microscopie électronique à transmission (TEM)).

Au bout de deux heures d'agitation à température constante, les nanoparticules sont séparées du mélange réactionnel sur aimant à pH 7 par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. Afin d'éliminer le tensioactif, les particules sont ensuite redispersées dans de l'eau ultrapure puis sédimentées sur aimant à pH 7. Après plusieurs lavages, les particules sont à nouveau dispersées dans de l'eau ultrapure et le pH de la solution est ajusté à 2.5 à l'aide d'acide chlorhydrique. La solution est alors placée 30 minutes au sonicateur puis stockée à 4°C.

La concentration en fer de la solution de nanoparticules est déterminée par spectroscopie UV en appliquant la loi de Beer-Lambert et en utilisant le coefficient d'absorption molaire du fer ($\epsilon = 420 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 480 nm). La concentration en particule est estimée à partir de celle du

fer en assimilant les particules à des sphères de 10 nm de diamètre et en utilisant la masse molaire ($M = 160 \text{ g.mol}^{-1}$) et la masse volumique ($\rho = 4.85 \text{ g.cm}^{-3}$) de la maghémite.

La **Figure 9** montre l'évolution du potentiel de charge et de la taille hydrodynamique de ces nanoparticules en fonction du pH. Pour des valeurs de $\text{pH} < 5$, les nanoparticules présentent une charge de surface positive et les suspensions de nanoparticules de maghémite sont stabilisées par les forces de répulsion électrostatiques inter-particulaires alors que pour des pH compris entre 5 et 9,5 les suspensions ne sont pas stables et l'on observe une agrégation des particules, **Figure 9**. Au-delà du pH 9,5, les nanoparticules sont chargées négativement et présentent à nouveau une bonne stabilité colloïdale.

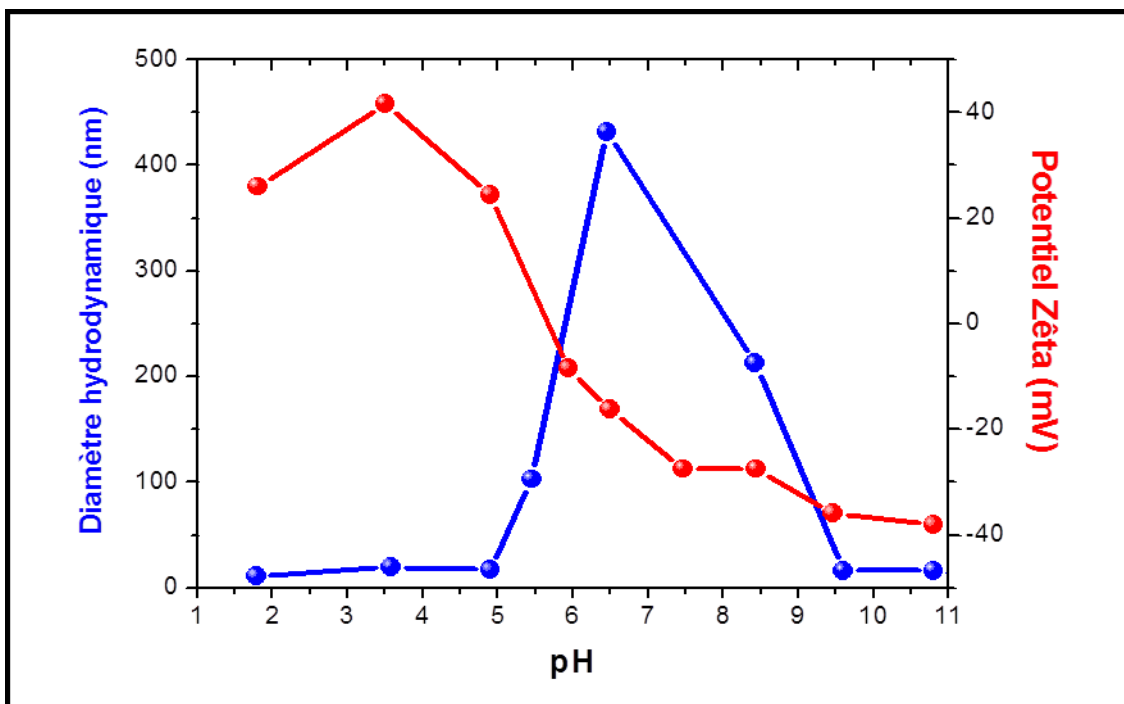


Figure 9 : Stabilité colloïdale en fonction du pH.

II.2.2. Complexation de l'oligonucléotide

Le processus de complexation de l'oligonucléotide (dODN) sur la nanoparticule de maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) est basé sur une approche électrostatique qui utilise les propriétés physico-chimiques des deux constituants. Le dODN étant chargé négativement et à pH acide la surface des nanoparticules étant chargée positivement, un phénomène d'attraction électrostatique est favorisé, comme illustré **Figure 10**.

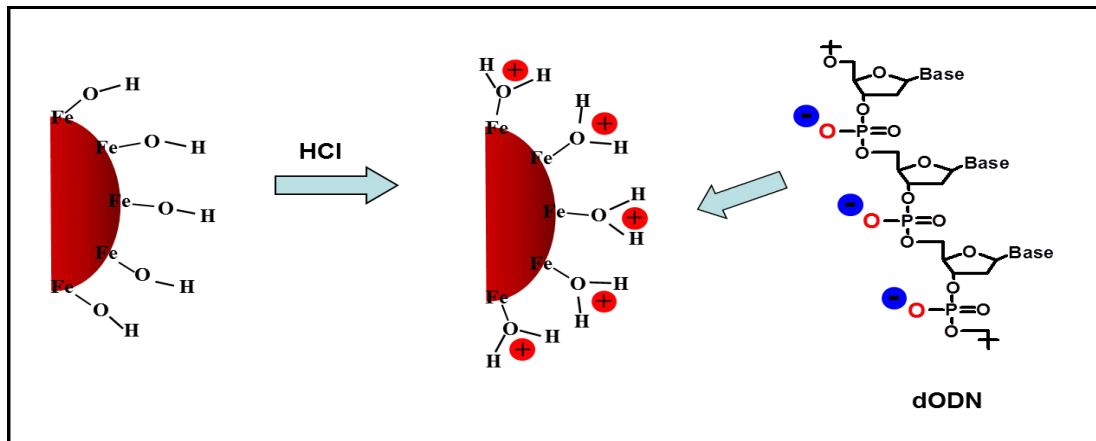


Figure 10 : Processus de complexation.

Il est à noter que la complexation de l'oligonucléotide est réalisée par une méthode proche de celle qui est utilisée au laboratoire pour la fonctionnalisation de nanocristaux de maghémite par des bisphosphonates.⁽³²⁾ Le mode opératoire de cette complexation est résumé *Figure 11*.

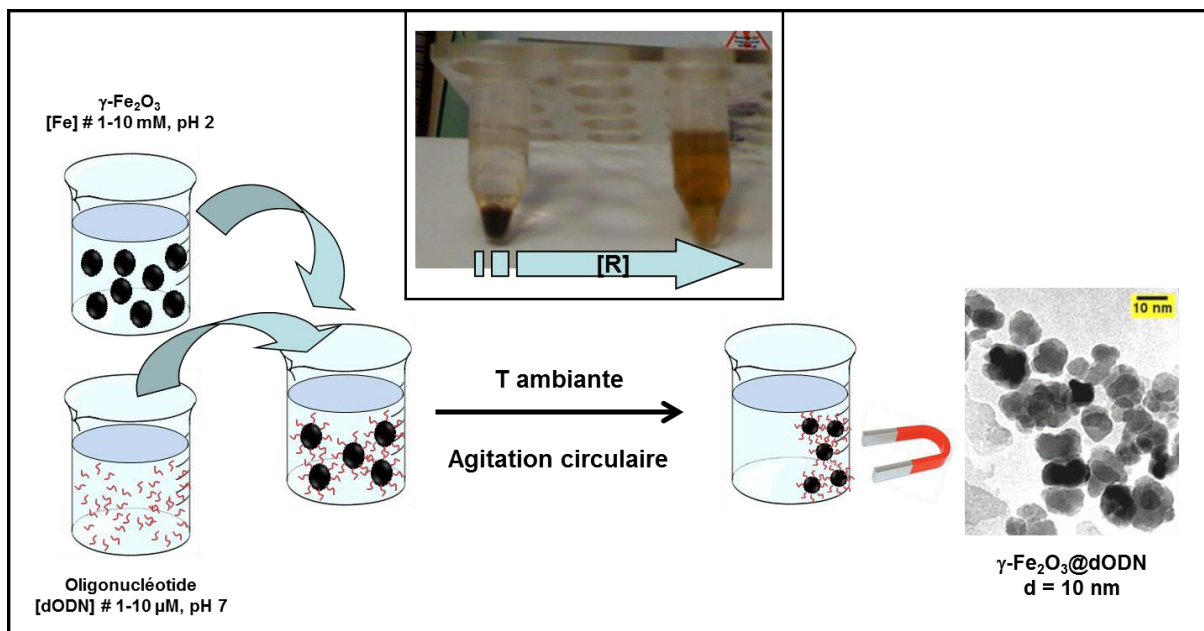


Figure 11 : Complexation de l'oligonucléotide.

Les nanoparticules sont solubilisées dans de l'eau à $\text{pH} = 2$ et mises au sonicateur pendant 30 minutes. Séparément, l'oligonucléotide est dilué dans un volume équivalent d'eau à $\text{pH} = 7$. L'acide nucléique est alors ajouté aux nanoparticules cationiques et la complexation est réalisée à température ambiante sous agitation circulaire pendant 30 minutes. Afin d'estimer la quantité maximale d'oligonucléotide que l'on peut complexer sur une nanoparticule de 10 nm, les complexes sont préparés en variant le rapport entre le nombre de brins d'oligonucléotide et le nombre de nanoparticules (NP) présents en solution lors de la

complexation. Pour cela nous avons défini le ratio R : $R = dODN/NP$. Ce rapport a été varié de 17,5 à 175 ($R = 17,5 ; 35 ; 52,5 ; 70 ; 87,5 ; 175$) soit de 17,5 à 175 brins d'ADN pour une nanoparticule. Dans ces conditions, le pH de la solution après mélange est d'environ 2.5. En fonction de la quantité d'ADN complexée à la particule, on peut observer un phénomène de floculation/sédimentation qui apparaît au bout de 5 minutes. Pour éliminer l'oligonucléotide non-complexé aux nanoparticules, les nanocomplexes sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes et les tubes mis sur aimant. Le surnageant est récupéré pour des dosages ultérieurs et les complexes ($\gamma Fe_2O_3@dODN$) repris dans de l'eau ultrapure dont le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou dans un tampon HEPES 10 mM.

Il est à noter que des essais de complexation à d'autres pH ($3 < pH < 10$) se sont avérés peu concluants confirmant ainsi notre hypothèse de travail qui privilégie une approche électrostatique.

III. DETERMINATION DU NOMBRE D'OLIGONUCLEOTIDES PAR NANOPARTICULE

III.1. Etude des surnageants

Afin d'évaluer le rendement de la complexation et ainsi estimer le nombre d'oligonucléotides greffés par particule nous avons effectué un dosage du surnageant par spectroscopies d'absorption UV et de fluorescence. Pour cela nous avons utilisé les propriétés de l'oligonucléotide, à savoir une absorption dans l'UV à 258 nm ($\epsilon = 329300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et une émission de fluorescence à 515 nm lorsqu'il est soumis à une excitation à 490 nm, *Figure 12*.

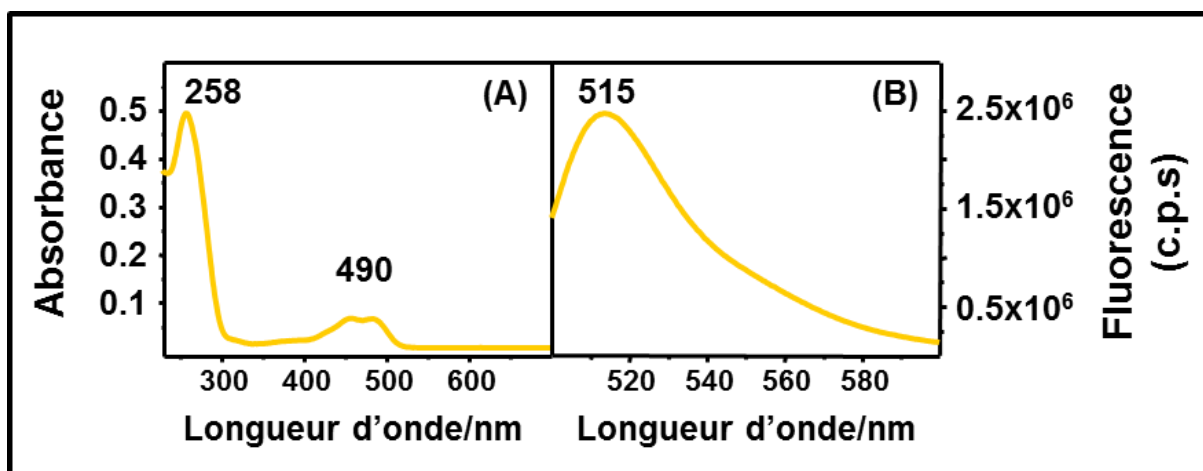


Figure 12 : Spectres (A) UV-Visible et (B) de fluorescence du dODN.

Comme décrit précédemment, lors de la complexation, nous avons fait varier le ratio R de 17,5 à 175 en maintenant la concentration en dODN constante et nous avons récupéré les surnageants pour les analyser. Le dosage a été effectué à pH acide directement après la complexation et les résultats sont présentés *Figure 13*.

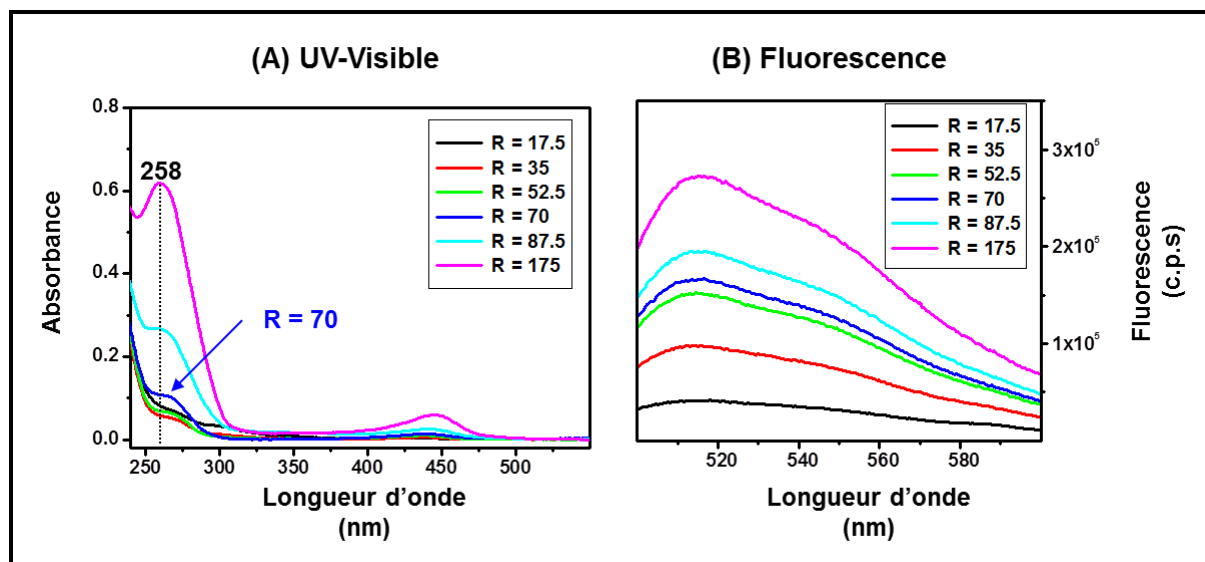


Figure 13 : Dosages (A) UV-Visible et (B) par fluorescence des surnageants.

L'analyse qualitative des surnageants par spectroscopie UV révèle que pour des valeurs de $R \leq 70$, on observe très peu d'oligonucléotide dans le surnageant alors qu'au-delà l'absorption à 258 nm caractéristique de l'oligonucléotide est de plus en plus forte au fur et à mesure que R augmente, *Figure 13(A)*. Ce résultat permet de conclure que l'on peut complexer des quantités croissantes d'oligonucléotide sur la nanoparticule jusqu'à une valeur d'environ 70 dODN et qu'au-delà l'excès d'ADN n'est plus adsorbé. Le nombre de brins de dODN complexé sur les nanoparticules peut être déduit par différence entre la quantité initiale d'oligonucléotide et la quantité déduite par mesure du surnageant.

L'analyse qualitative des surnageants par spectroscopie de fluorescence montre une augmentation de la fluorescence en fonction de R mais l'analyse quantitative se révèle beaucoup moins précise, *Figure 13(B)*. Ceci est lié au fait que la fluorescence du 6-FAM est fortement dépendante du pH. Dans nos conditions expérimentales, il ne nous a pas été possible de quantifier avec précision le rendement de complexation de l'oligonucléotide avec les nanoparticules par cette méthode.

III.2. Etude des complexes

III.2.1. Diamètre Hydrodynamique et Potentiel Zêta

Pour étudier le comportement colloïdal des différents nanocomplexes, des mesures de diamètre hydrodynamique et de potentiel zêta ont été effectuées. Ces données ont été obtenues dans l'eau à l'aide du système Zetasizer Nano ZS (*Annexe II*, III. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)). Les résultats obtenus pour les rapports $R = 17,5$; 70 et 175, présentés sur la *Figure 14*, démontrent une bonne stabilité colloïdale pour ces trois complexes.

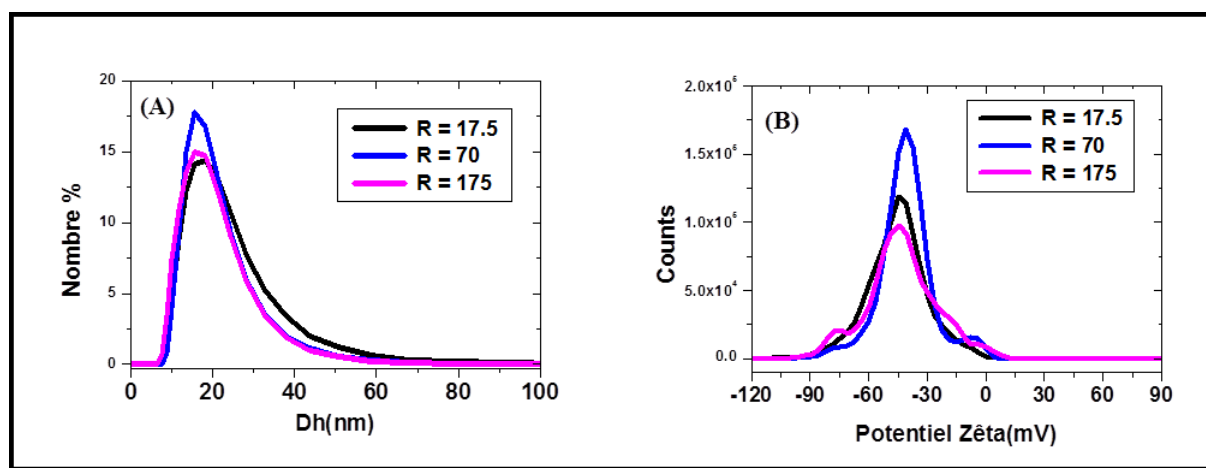


Figure 14 : (A) Diamètre hydrodynamique (D_h) et (B) Potentiel Zêta des nanocomplexes synthétisés à différents ratio R , $[Fe] = 5.10^{-4} M$, $pH=7,4$.

Ainsi le diamètre hydrodynamique (D_h), l'index de polydispersité (PdI) et le potentiel zêta (Z) sont relativement constants quelle que soit la valeur de R , *Tableau 1*.

R	D_h (nm)	PdI	Z(mV)
17.5	21	0.24	-45
70	19	0.17	-41
175	18	0.17	-42

Tableau 1 : Valeurs du diamètre hydrodynamique (D_h), de l'index de polydispersité (PdI) et du potentiel zêta (Z) mesurées dans l'eau ($pH 7$) pour une concentration en fer de $5.10^{-4} M$.

On peut noter :

-une valeur négative du potentiel Zeta pour les différents nanocomplexes indiquant que la complexation du dODN à la surface des nanoparticules est effective. Rappelons que le point de charge nulle pour les nanoparticules est localisé aux alentours de $pH=7$ (Cf. *Figure 9*).

-une légère diminution du diamètre hydrodynamique lorsque la quantité d'ADN augmente. Ce phénomène peut être expliqué par une meilleure stabilité colloïdale lorsque la densité en oligonucléotide augmente à la surface de la nanoparticule. Cependant il n'est pas possible d'après ces mesures d'établir un lien direct entre les valeurs de taille hydrodynamique ou de potentiel zêta et le nombre de brins d'oligonucléotide complexés à la surface d'une nanoparticule.

III.2.2. Détermination de la charge en oligonucléotide

En complément des dosages UV effectués sur les surnageants, nous avons voulu estimer par d'autres méthodes, le nombre maximum d'oligonucléotides greffés par nanoparticule. Ce nombre peut être évalué en caractérisant les nanocomplexes par spectroscopie UV-Visible ainsi que par spectroscopie de fluorescence.

Etude par spectroscopie UV-Visible

La **Figure 15** présente les spectres d'absorptions de l'oligonucléotide et des nanoparticules avant et après complexation ($R = 70$).

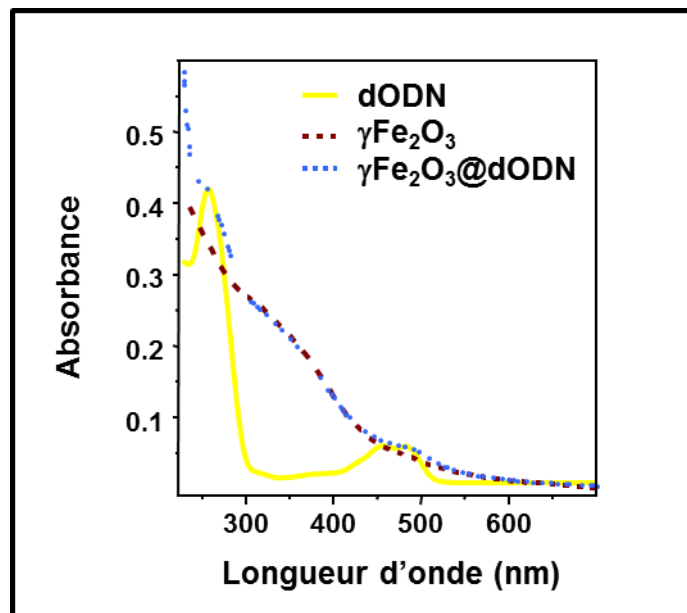


Figure 15 : Spectres UV-Visible, normalisés à 260 et 350 nm, de la maghémite à pH = 2 ainsi que du dODN et d'un nanocomplexe à pH = 7 ($R = 70$).

Les nanoparticules de maghémite après dispersion dans l'eau (pH = 2.5) présentent un spectre d'absorption continu entre 235 et 600 nm avec notamment une absorption forte à 258 nm, longueur d'onde classiquement utilisée pour le dosage des acides nucléiques. Le spectre

d'absorption des nanocomplexes (pH = 7) suit la loi d'additivité des absorbances et une combinaison de l'absorption de la maghémite avec celle de l'oligonucléotide est ainsi observée. Si l'on considère le spectre de l'oligonucléotide seul, on peut remarquer que contrairement à la maghémite, il ne présente aucune absorption à 350 nm, **Figure 15**. Ainsi le rapport entre l'absorbance à 258 nm (A_{258}), représentative à la fois de l'oligonucléotide et de la maghémite, et celle à 350 nm (A_{350}) représentative de la maghémite uniquement devrait rendre compte de l'évolution de la charge en oligonucléotide en fonction du rapport R. Une augmentation de ce ratio sera corrélée à une augmentation du nombre de dODN par nanoparticule.

La **Figure 16(A)** présente les spectres, normalisés à 350 nm, des nanocomplexes obtenus aux différents rapports R. On observe bien une augmentation de l'absorption à 260 nm au fur et à mesure que R augmente. L'évolution du ratio A_{258}/A_{350} en fonction de R est représentée sur la **Figure 16(B)**. Ce ratio croît de façon quasi linéaire quand R augmente et ce jusqu'à environ 70 dODN par nanoparticule. Au-delà de R=70 un phénomène de saturation est observé. Ce résultat est tout à fait comparable à celui obtenu en analysant directement les surnageants (Cf. &III.1.). Ainsi, il est possible de contrôler le nombre d'oligonucléotides complexés à la surface d'une nanoparticule et une saturation de cette surface correspond à une charge de 70 dODN par nanoparticule.

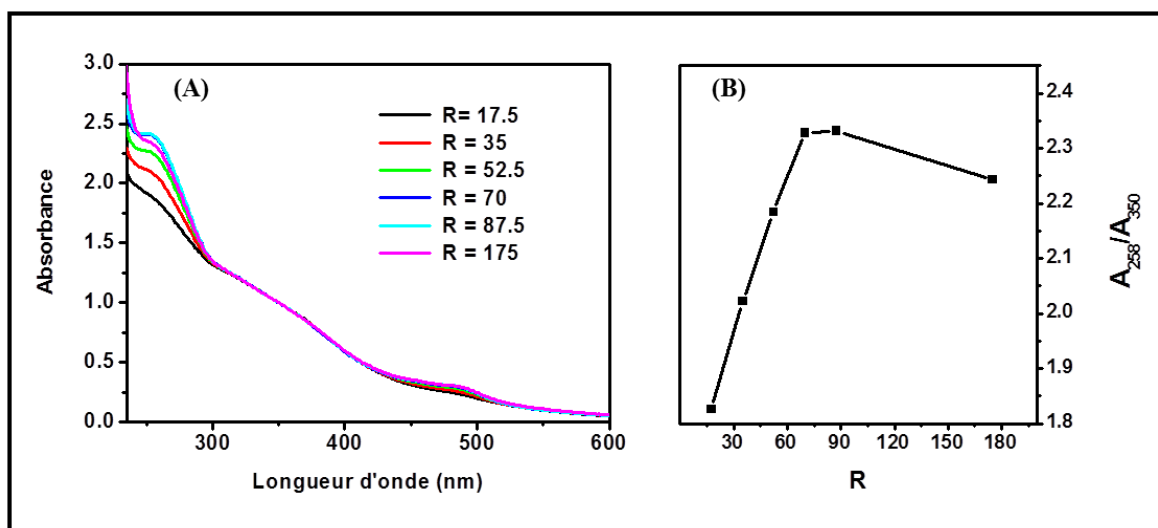


Figure 16 : (A) Spectres UV-Visible des nanocomplexes, normalisés à 350 nm, pour différentes valeurs de R ; (B) évolution du rapport A_{258}/A_{350} en fonction de R.

Etude par spectroscopie de fluorescence

L'émission d'un fluorophore est connue pour être fortement dépendante du milieu environnant. Une diminution de l'intensité de fluorescence par rapport à celle attendue (« Quenching ou extinction ») peut être observée lorsque l'on fait varier certains paramètres physicochimiques du milieu dans lequel baigne le fluorochrome tels que la force ionique, le pH, la nature du solvant ou encore la concentration du fluorophore. De plus les particules métalliques sont connues pour induire une extinction de l'émission du fluorophore plus ou moins importante en fonction de la distance entre celui-ci et la surface de la particule.

Dans notre cas, les particules sont dispersées dans l'eau à pH physiologique. Ainsi, les facteurs influençant le rendement de fluorescence seront liés à la présence de la nanoparticule (**Figure 17, 1**), à l'influence des fluorophores entre eux soit au sein d'une même particule (**Figure 17, 2**) soit entre deux particules suffisamment proches (**Figure 17, 3**) ainsi qu'à la distance entre le fluorophore et la surface de la nanoparticule.

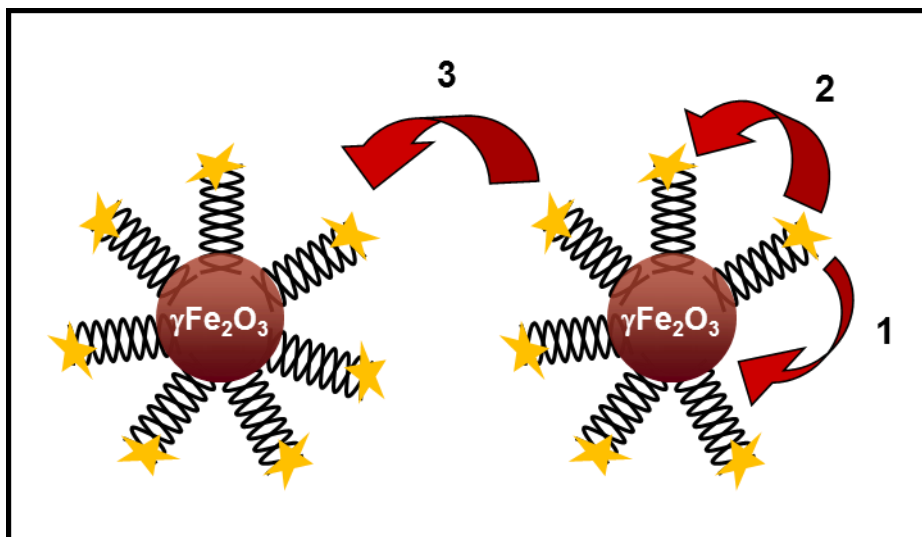


Figure 17 : Différents modes de « Quenching ».

La **Figure 18** présente l'évolution de l'intensité de fluorescence de l'oligonucléotide en solution aqueuse en fonction de sa concentration (**A**) et après complexation à la surface des nanoparticules en fonction de la concentration en nanoparticule (**B**).

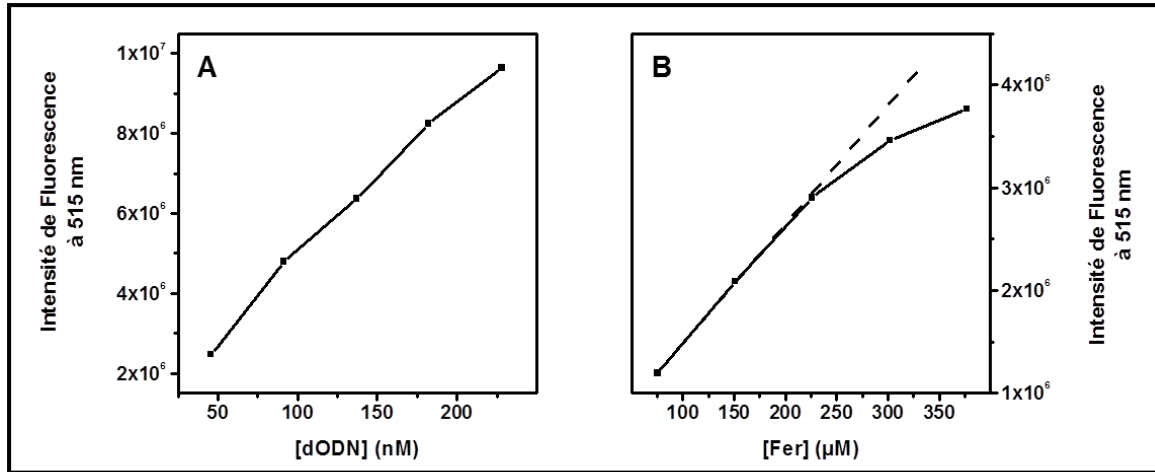


Figure 18 : Evolution de la fluorescence en fonction de la concentration en oligonucléotide seule (A) et en fonction de la concentration en fer pour $R = 17.5$ (B).

Cette étude montre que :

- dans une gamme de concentration allant de 0 à 250 nM, il n'est pas observé de « Quenching » des fluorophores entre eux, **Figure 18(A)**.
- lorsque la concentration en nanoparticule correspond à une concentration en fer supérieure à 250 μM, le « Quenching » interparticulaire apparaît, **Figure 18(B)**.

Afin de s'affranchir du « Quenching » interparticulaire, l'étude des nanocomplexes par spectroscopie de fluorescence a été menée avec un nombre constant de nanoparticules à une concentration en fer de 64 μM. La **Figure 19** présente les spectres d'émission de fluorescence des différents nanocomplexes (A) et l'évolution de l'intensité de fluorescence ($\lambda_{\max} = 515$ nm) en fonction du rapport R (B).

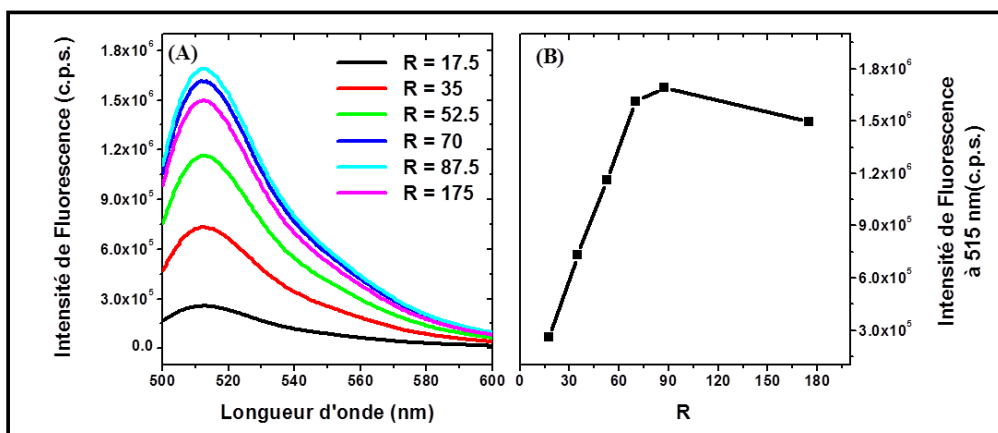


Figure 19 : Fluorescence des complexes pour différentes valeurs de R, $[Fe] = 64 \mu M$.

En accord avec l'étude par UV-Visible, il est observé une augmentation linéaire de l'intensité de fluorescence jusqu'à une valeur de R proche de 70, suivie par un pseudo plateau pour des valeurs de R supérieures. Ainsi lorsque le rapport R augmente, le nombre de dODN par nanoparticule croît jusqu'à une valeur d'environ 70 oligonucléotides par particule.

Connaissant le nombre de dODN par particule, il est alors possible de prévoir, à l'aide de la courbe de calibration de l'oligonucléotide (**Figure 18(A)**), l'intensité de fluorescence attendue pour une telle quantité de fluorophore. L'écart entre la valeur théorique attendue et celle mesurée permet ainsi de calculer le pourcentage d'extinction de fluorescence. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2** et montrent que l'extinction de fluorescence la plus forte, (88%) est obtenue pour le rapport R = 17.5 et qu'ensuite le taux d'extinction diminue pour atteindre un plateau pour les plus hautes densités en oligonucléotide.

R	17.5	35	52.5	70	87.5	175
% « Quenching »	88	78	73	71	70	72

Tableau 2 : Evolution du « Quenching » en fonction de R ([Fe]= 64 μM).

Ce résultat peut être interprété en considérant deux effets antagonistes illustrés **Figure 20** :

- l'augmentation du nombre de dODN par particule au fur et à mesure que le rapport R croît, devrait induire une augmentation du « Quenching » lié à un rapprochement des fluorophores entre eux (**Figure 20**, à gauche).
- inversement si la distance entre le fluorophore et la particule augmente, comme cela peut être le cas lorsque l'on passe d'une faible densité à une forte densité en oligonucléotide, alors une diminution du « Quenching » est attendu (**Figure 20**, à droite).

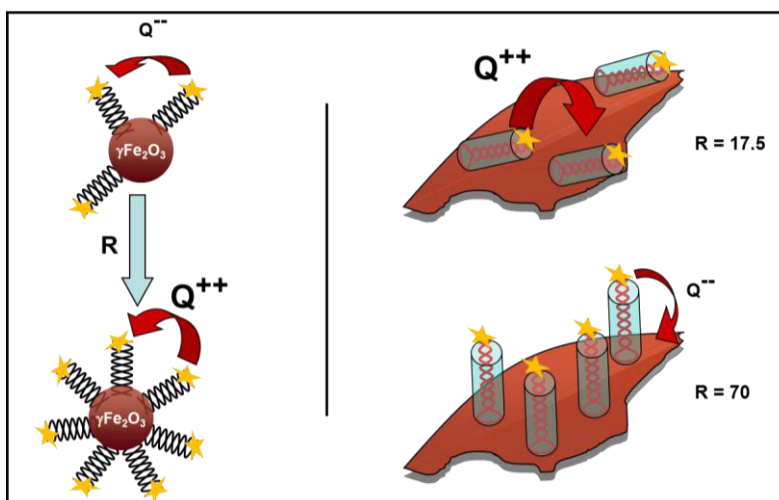


Figure 20 : Représentation schématique de l'évolution de la fluorescence en fonction de la concentration en oligonucléotide

Ainsi, il peut être suggéré que :

- pour de faibles densités en oligonucléotide, le dODN est « étendu » à la surface de la nanoparticule ce qui induit un fort « Quenching » du fluorophore.
- pour de plus fortes densités, il est lié perpendiculairement à la surface de la particule éloignant ainsi le fluorophore de la surface de maghémite ce qui diminue le phénomène d'extinction du fluorochrome.

Des observations similaires ont d'ailleurs été reportées pour des oligonucléotides greffés sur des surfaces d'or. Il a notamment été montré que pour de faibles densités en oligonucléotide, la conformation la plus observée est une conformation dans laquelle le brin d'acide nucléique est étendu sur la surface de la particule ⁽³⁸⁾ alors que lorsque la densité augmente l'oligonucléotide va avoir tendance à se fixer perpendiculairement à la surface de la particule ⁽³⁹⁾. De même, de fortes variations de l'intensité de fluorescence ont été observées pouvant aller d'une extinction complète à une exaltation de la fluorescence selon la distance qui sépare le fluorophore de la surface d'or.⁽⁴⁰⁾ Un travail récent décrit des changements drastiques de la fluorescence lors de l'ouverture d'une structure d'ADN en « hairpin » adsorbée sur une surface d'or.⁽⁴¹⁾ Dans cet article, les auteurs observent une extinction totale de la fluorescence quand l'oligonucléotide est « allongé » dans sa structure « hairpin » parallèlement à la surface. Lorsqu'ils provoquent l'ouverture de la double-hélice, soit en changeant les conditions de salinité soit en ajoutant un compétiteur, ils observent une augmentation significative de l'intensité de fluorescence.

L'ensemble de ces données nous permet de conclure qu'à basse densité l'oligonucléotide est orienté parallèlement à la surface de la nanoparticule, alors que pour des densités plus importantes il est orienté perpendiculairement à la surface. Cependant les données obtenues jusqu'à présent ne permettent pas de déterminer si l'oligonucléotide conserve sa structure en hairpin après condensation à la surface de la particule d'oxyde de fer.

III.3. Evaluation théorique de la charge maximale en oligonucléotide

Afin de valider théoriquement les résultats expérimentaux qui établissent, qu'avec notre protocole de synthèse, il est possible de fixer jusqu'à 70 dODN sur une particule de 10 nm de diamètre, nous avons calculé le taux de couverture maximum en utilisant un modèle simplifié pour caractériser notre système.

Dans ce modèle:

- les nanoparticules sont assimilées à des sphères de rayon moyen $R = 5$ nm qui présentent une surface moyenne S d'environ 314 nm^2 ($S = 4\pi R^2$).

- l'oligonucléotide, est modélisé par un cylindre.

Deux configurations peuvent être envisagées : une structure en double hélice et une structure simple brin. Lorsque l'oligonucléotide est structuré en double-hélice, selon les auteurs et le type de l'hélice, il est reporté un diamètre d'hélice entre 2 et 2,6 nm.⁽⁴²⁻⁴³⁾ La hauteur du cylindre va être fonction du nombre de tour que va former l'hélice. Dans une hélice de type B (Cf. *Chapitre 1*), il faut approximativement 10 paires de bases pour effectuer un tour d'hélice ce qui représente une hauteur (le « pitch ») d'environ 3,4 nm.⁽⁴⁴⁾ L'oligonucléotide utilisé dans cette étude formant une structure en double-hélice composée de 15 paires de base peut donc être représenté par un cylindre ayant un rayon « r » variant de 1 à 1,3 nm et présentant une hauteur « H » d'environ 5,1 nm, *Figure 21, haut*.

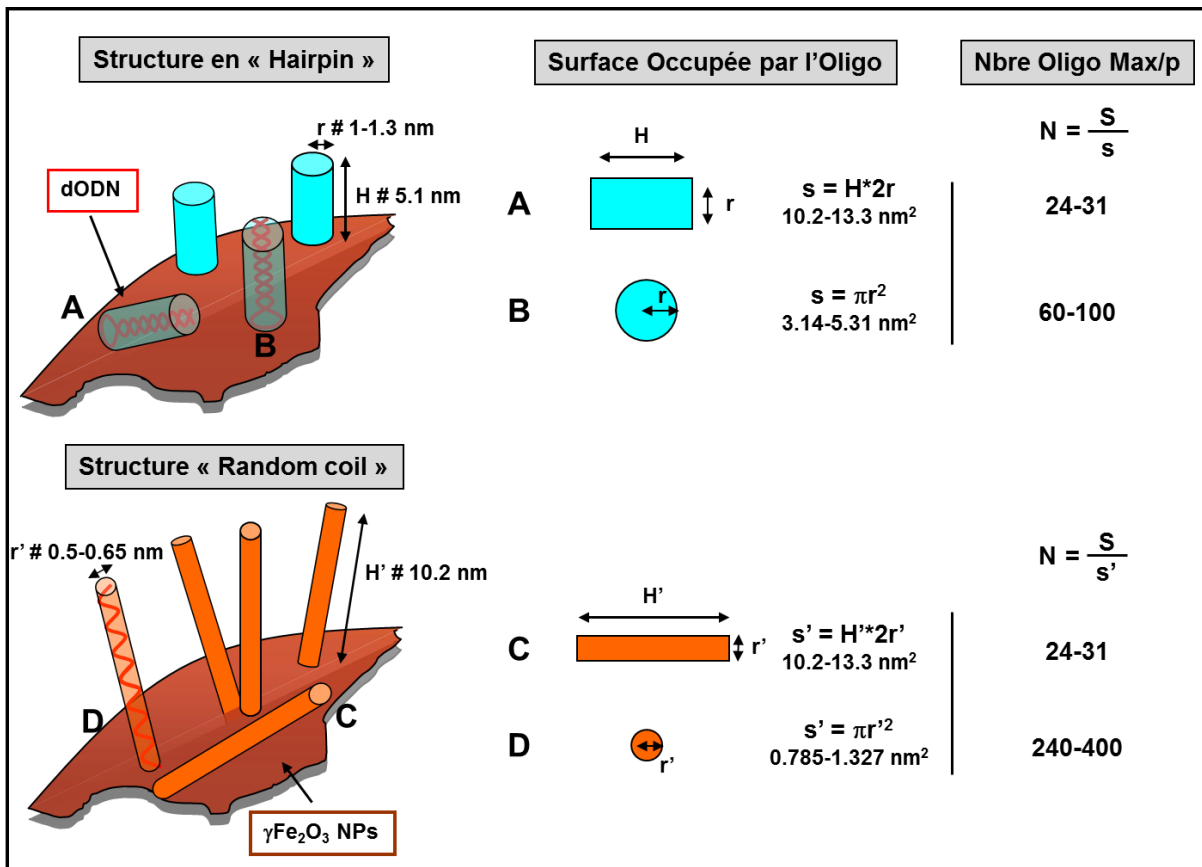


Figure 21 : Surface théorique occupée par l'oligonucléotide (dODN).

Par simplification, nous avons utilisé la même approximation en absence de structure bien définie lorsque l'oligonucléotide est en simple brin (« Random-coil ») et dans ce cas la structure a été assimilée à un cylindre dont le rayon « r' » varie de 0,5 à 0,65 nm et dont la hauteur « H' » est de 10,2 nm, *Figure 21, bas*. Nous avons ensuite considéré que lorsque le cylindre est orienté perpendiculairement à la surface de la nanoparticule, il occupe une aire

équivalente à celle de sa base alors que lorsqu'il est orienté parallèlement à la surface de la nanoparticule il occupe une aire équivalente à un rectangle. Dans ces conditions si « S » est la surface de la nanoparticule et « s » la surface occupée par l'oligonucléotide (« s » ou « s' » en fonction de la structure de l'oligonucléotide) alors « N » le nombre maximum d'oligonucléotides par nanoparticule est donné par la formule suivante : $N = S/s$ (« s » ou « s' » en fonction de la structure de l'oligonucléotide).

Le calcul des rapports entre la surface de la particule (314 nm^2) et la surface de l'oligonucléotide en fonction de sa conformation et de la valeur prise pour le diamètre de l'hélice (2 à 2,6 nm) nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la colonne de droite de la **Figure 21**. Ces calculs montrent qu'il est théoriquement possible de mettre sur une particule de 24 à 31 dODN lorsqu'ils sont allongés sur la surface (**Figure 21, A & C**) de 60 à 100 brins lorsqu'ils sont fixés en double-hélice perpendiculairement à la surface (**Figure 21, B**) et de 240 à 400 brins lorsqu'ils sont fixés en simple hélice perpendiculairement à la surface (**Figure 21, D**). Dans ce modèle de nombreuses approximations sont faites tant sur la morphologie des nanoparticules (sphéricité, polydispersité...), que sur la représentation des oligonucléotides (dynamique de la structure en simple brin, présence du fluorophore...). De plus l'encombrement stérique, la couche d'hydratation ou les répulsions électrostatiques entre les groupements phosphates ne sont pas pris en compte. L'intégration de ces paramètres dans le modèle devrait réduire le nombre maximum d'oligonucléotide que l'on peut complexer à la surface de la nanoparticule. Ainsi en tenant compte des différentes approximations, la détermination expérimentale de 70 dODN comme couverture maximale ne semble pas irréaliste. D'autre part, ce modèle suggère que le dODN conserve sa structure en hairpin.

La densité de surface en oligonucléotide peut être calculée en divisant le nombre d'oligonucléotide par la surface de la nanoparticule. Pour une couverture maximale, soit 70 dODN par nanoparticule, la densité est de 2.10^{13} oligonucléotides par cm^2 , soit 0,22 brins par nm^2 . Ce résultat est similaire à celui obtenu par l'équipe de C. Mirkin sur des particules d'or d'un diamètre identique recouvertes par un oligonucléotide en simple brin via un groupement thiol terminal.⁽⁴⁵⁾ Des densités comparables, 1 à 6.10^{13} molécules par cm^2 en fonction des conditions de synthèse, ont été obtenues par Petrovykh et Whitman avec des oligonucléotides thiolés, immobilisés en simple brin sur des surfaces planes d'or.⁽³⁸⁾ L'empreinte effective de notre oligonucléotide (la surface moyenne disponible pour un oligonucléotide) est de $4,5 \text{ nm}^2$ par dODN pour une couverture de 70 brins par particule. Cette valeur proche de celle trouvée par Mirkin & al ⁽⁴⁵⁾ permet d'estimer à $12,5 \text{ \AA}$ la distance moyenne entre deux brins voisins. Cette distance est plus grande que celle mesurée entre deux phosphates consécutifs sur un

même brin d'ADN (environ 7 Å⁽⁴⁴⁾) ou que la distance de contact minimum entre deux atomes de phosphore ou d'oxygène (environ 3-4 Å) dans une approche van der Waals. En conséquence la valeur maximale obtenue dans nos conditions, 70 dODN pour une particule ayant un diamètre moyen de 10 nm, est tout à fait cohérente avec ce qui a été décrit dans la littérature, confortant ainsi le protocole de dosage par spectroscopie UV.

IV. ETUDE STRUCTURALE DE L'OLIGONUCLEOTIDE A LA SURFACE DE LA NANOPARTICULE

IV.1. Etude par spectroscopie IRTF

Afin d'étudier la structure de l'oligonucléotide lorsqu'il est complexé à la surface de la nanoparticule, des expériences IRTF ont été menées en solution dans H₂O ou D₂O. Nous avons vu dans le chapitre précédent que de nombreuses données structurales pouvaient être obtenues à partir de cette technique⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ et nous l'avons naturellement appliquée à notre système pour des complexes obtenus avec différentes valeurs de R. Les spectres enregistrés dans D₂O sont présentés sur, **Figure 22** : la colonne de gauche montre la région caractéristique des vibrations des bases (1750-1500 cm⁻¹) et la colonne de droite la région caractéristique des vibrations des sucres et des phosphates (1150-800 cm⁻¹).

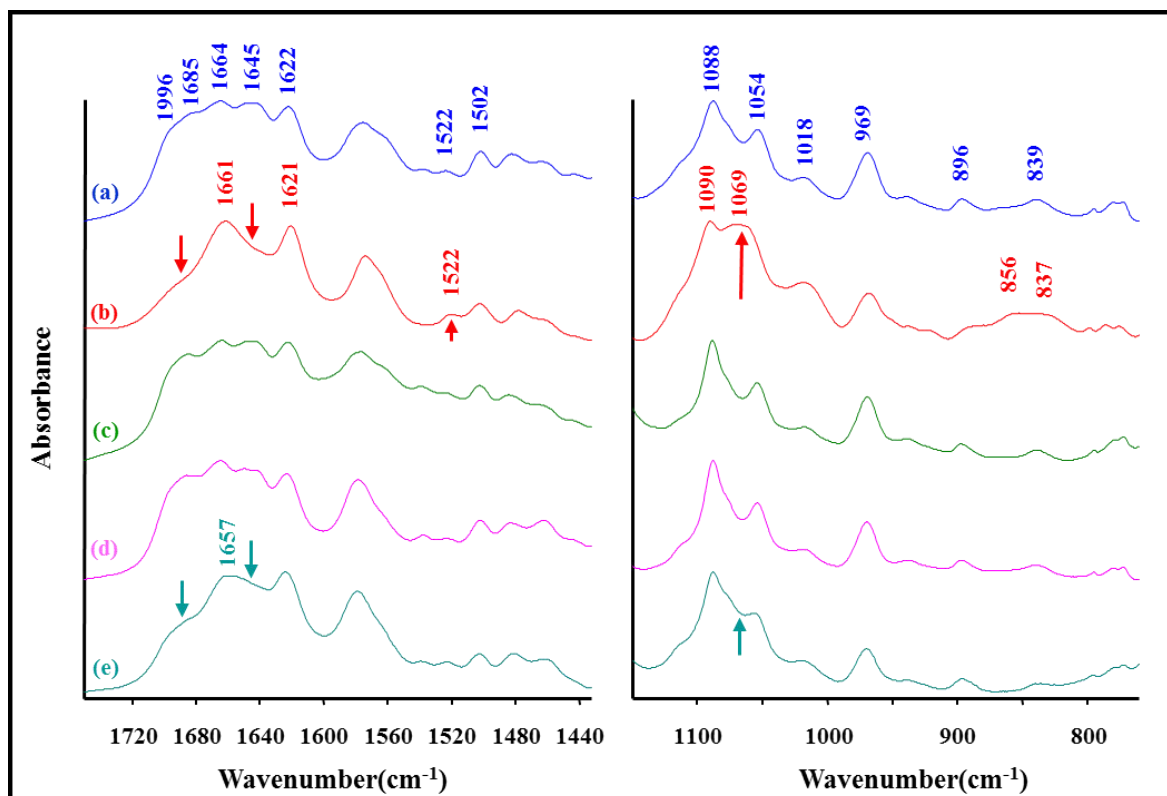


Figure 22 : Spectres infrarouge en solution dans D₂O, de l'oligonucléotide à 25°C (a), 95°C (b) et des complexes pour R = 175 (c), 70 (d) et 17.5 (e).

Le spectre de l'oligonucléotide seul (**Figure 22, a**), enregistré en solution dans D₂O à 25°C, est caractéristique d'un ADN en double hélice comportant des appariements Watson-Crick. La bande d'absorption à 1996 cm⁻¹ est attribuée au C2=O2 des thymines, celle à 1685 cm⁻¹ au C6=O6 des guanines, celle à 1664 cm⁻¹ au C4=O4 des thymines et celle à 1622 cm⁻¹ à des vibrations impliquant le cycle et le groupement ND₂ de l'adénine. La bande d'absorption signalée à 1645 cm⁻¹ est en fait constituée de deux composantes : une première bande à 1648 cm⁻¹ attribuée au C2=O2 des cytosines et une seconde à 1641 cm⁻¹ impliquant le cycle de la thymine. Enfin les bandes situées à 1522 et 1502 cm⁻¹ sont attribuées à des vibrations du cycle de la cytosine ; la bande à 1522 cm⁻¹ perdant de l'intensité lors de l'appariement en double hélice, **Tableau 3** (46-48).

	T	G	T	C	T	A	C	Sucre	Sucre	
	C2=O2	C6=O6	C4=O4	C2=O2	Cycle	Cycle	-	C-O	Type S	
Appariée	1698	1689	1671	1655	1645	1632	1527	1506	1069	842
	1691	1678	1655	1647	1641	1622	1520	1498	1044	820
Libre	1698	1673	1671	1655		1632	1527	1506	1069	
	1691	1660	1655	1647	1632	1622	1520	1498	1044	-

T : thymine ; G : guanine ; C : cytosine ; A : adénine.

Tableau 3 : Assignement des bandes d'absorptions IR des acides nucléiques.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

Lorsque l'on chauffe l'oligonucléotide à 95°C, cela va entraîner une rupture des liaisons hydrogène et l'oligonucléotide va alors perdre sa structure en double hélice pour adopter une conformation aléatoire (« Random Coil »). Ceci est vérifié sur le spectre (b) de la **Figure 22**. Dans la région spectrale allant de 1720 à 1600 cm⁻¹, on ne retrouve que deux bandes d'absorption. La première, très large, vers 1660 cm⁻¹, est due à la somme des vibrations des cytosines guanines et thymines lorsqu'elles ne sont pas engagées dans un appariement. La seconde bande observée à 1621 cm⁻¹ qui implique des vibrations de l'adénine est connue pour voir son intensité augmenter lorsque les liaisons hydrogènes qu'elle avait contractées avec une autre base sont rompues, (**Tableau 3**). On peut aussi remarquer que la bande de la cytosine située à 1522 cm⁻¹ retrouve une intensité relative plus importante suite à la perte des liaisons hydrogène avec la guanine. Lors de la rupture de la structure en double hélice, d'autres modifications sont observées dans la région caractéristique des vibrations des sucres et des phosphates. Notamment la bande d'absorption située à 1054 cm⁻¹ dans la double hélice va disparaître pour laisser la place à une bande large centrée vers 1069 cm⁻¹. Cette bande est

attribuée aux vibrations des liaisons CO des sucres. De plus la bande située à 839 cm^{-1} (**Figure 22, a et Tableau 3**) attribuée à une géométrie de type S des sucres lorsque l'oligonucléotide est en double-hélice de type B s'élargit complètement lorsque la structure est rompue pour être remplacée par une bande comprise entre 830 et 860 cm^{-1} (**Figure 22, b**). Cet élargissement s'explique par la perte de la conformation préférentielle des sucres imposée par la géométrie de la structure en double hélice et reflète la présence de sucres dans diverses conformations.

L'analyse des spectres infrarouge des nanocomplexes révèle que pour des valeurs élevées du rapport R ($R = 70$ et 175) aucun changement entre le spectre de l'oligonucléotide seul ou celui de l'oligonucléotide complexé à la particule n'est observable dans la région spectrale caractéristique des vibrations dans le plan des bases. Cependant pour le complexe obtenu avec un rapport $R = 17.5$ de fortes différences apparaissent dans cette région. On voit ainsi une diminution de l'intensité des bandes à 1685 et 1645 cm^{-1} accompagnée d'une augmentation de l'intensité de la bande de l'adénine à 1622 cm^{-1} et de l'apparition d'une bande large vers 1660 cm^{-1} . L'ensemble de ces modifications pourrait laisser penser que l'oligonucléotide perd sa structure en double hélice. Néanmoins si l'on s'intéresse maintenant à la région caractéristique des vibrations des sucres et des phosphates peu de changements sont observés. La seule différence notable dans cette région est l'apparition d'une bande vers 1060 cm^{-1} entre les deux pics situés à 1088 et 1054 cm^{-1} . Toutefois, si on compare son intensité à celle de la bande à 1069 cm^{-1} qui apparaît lors de la fusion de l'hélice, on peut remarquer qu'elle est beaucoup moins intense et ne reflète pas de la rupture totale de la structure en double hélice.

Dans le domaine spectral allant de 1500 à 1750 cm^{-1} , les vibrations des bases sont non seulement sensibles aux appariements mais aussi aux modifications de l'empilement de l'hélice. Si on considère que pour le ratio $R = 17,5$ l'oligonucléotide est condensé longitudinalement sur la surface de la nanoparticule, on peut émettre l'hypothèse que les variations spectrales observées peuvent être dues à des modifications de l'hélice provoquées par les interactions de la chaîne phosphodiester avec la surface d'oxyde de fer. Lorsque la densité en oligonucléotide augmente à la surface de la particule, la double hélice tend à s'adsorber perpendiculairement à la particule via un nombre réduit de groupements phosphates retrouvant ainsi une structure proche d'une hélice classique de type B.

L'hypothèse d'une modification des paramètres de l'hélice est d'ailleurs confortée par le spectre infrarouge d'un complexe formé avec 26 brins d'oligonucléotides par nanoparticules,

Figure 23. Ce spectre a été enregistré en solution dans H₂O dans la région caractéristique des vibrations symétriques et antisymétriques des PO₂⁻ (1000-1250 cm⁻¹).

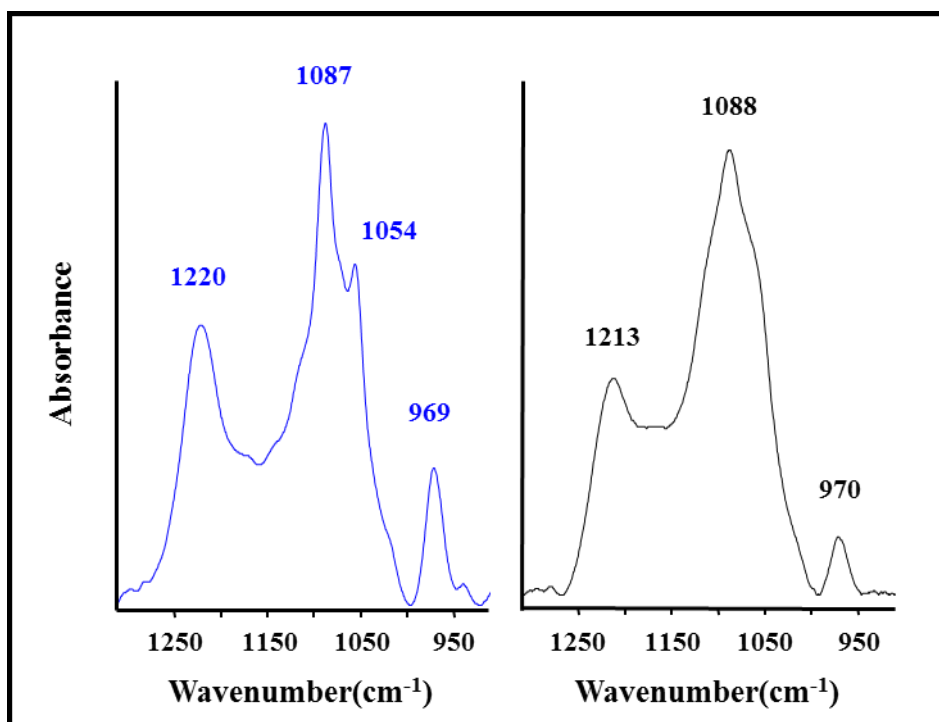


Figure 23 : Spectres infrarouge en solution dans H₂O de l'oligonucléotide (trait bleu) et d'un complexe comportant 26 dODN par particule (trait noir).

Comme on peut le constater sur le spectre de l'oligonucléotide seul, la vibration d'élongation antisymétrique du groupement phosphate est observée à 1220 cm⁻¹ alors que la vibration symétrique est observée à 1087 cm⁻¹. Cette position des bandes est caractéristique d'une double hélice de type B. En effet, une hélice de type A aurait une bande d'absorption située vers 1240 cm⁻¹ et en absence de structure cette bande serait observée aux alentours de 1230 cm⁻¹. Sur le spectre du complexe formé avec 26 brins d'oligonucléotides, la vibration antisymétrique est observée à 1213 cm⁻¹, donc avec un déplacement vers le rouge d'environ 7 cm⁻¹ par rapport à une hélice de type B. Un tel déplacement vers les bas nombres d'onde a déjà été observé dans la forme Z de l'ADN dont les paramètres hélicoïdaux sont très différents de ceux d'une hélice de type B.

Les données infrarouges obtenues pour les différents complexes montrent donc, en résumé, que pour les plus hautes densités en oligonucléotide le spectre présente les caractéristiques d'une structure classique en double hélice de type B alors que pour les plus basses densités la structure semble plus incertaine n'excluant pas la possibilité de l'ouverture partielle de la double hélice.

IV.2. Etude par spectroscopie d'absorption UV

Afin d'explorer les modifications potentielles de la structure lors de la complexation de l'oligonucléotide à la surface de la nanoparticule, des expériences de dénaturation thermique ont été menées pour différentes valeurs de R. Pour cela nous avons fait varier la température des échantillons de 2 à 85°C à une vitesse de 0.16°C min⁻¹ et enregistré l'évolution de l'absorption à 260 nm. La **Figure 24** présente les courbes de dénaturation de l'oligonucléotide seul et des nanocomplexes pour différents rapports R ainsi que les dérivées associées.

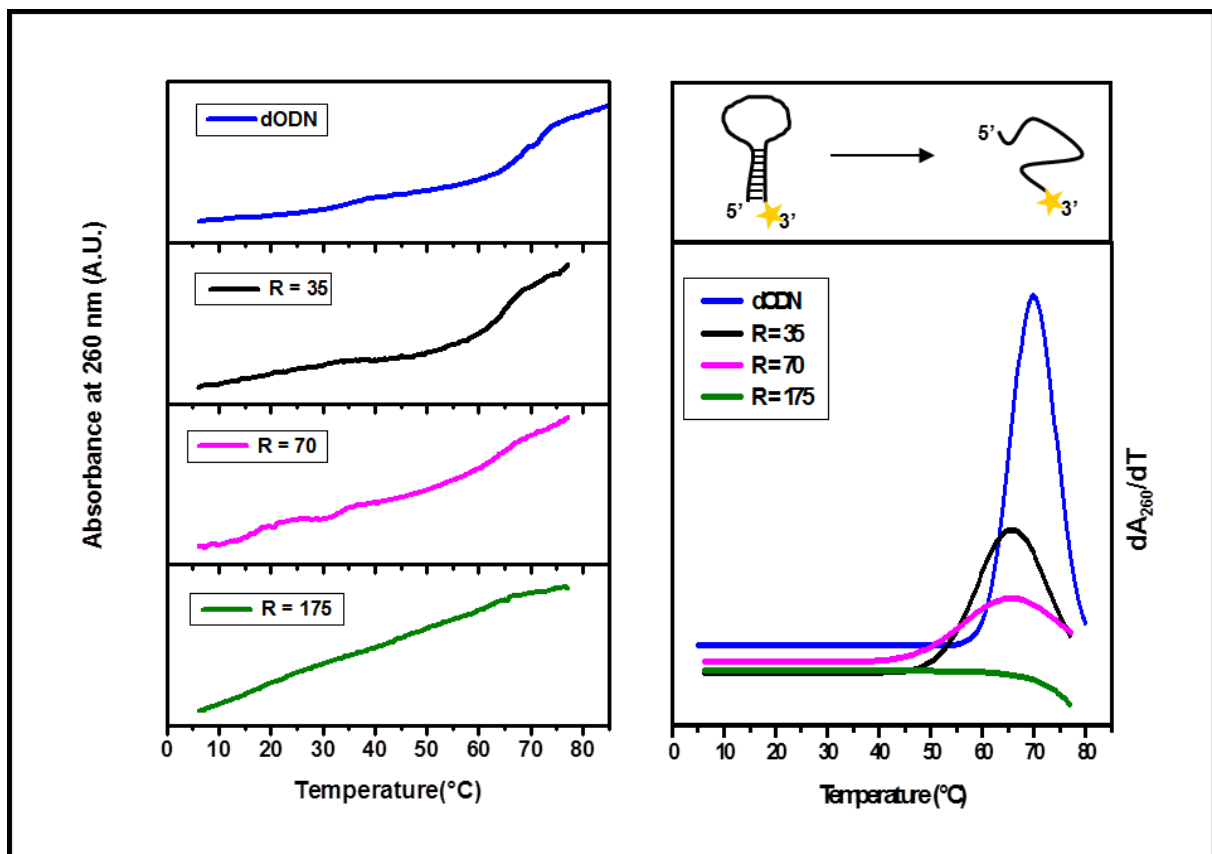


Figure 24 : Courbes UV de dénaturation et dérivées associées de l'oligonucléotide et des complexes pour $R = 35, 70$ et 175 ($[dODN] = 0,6 \mu M$, Tampon Hepes 10 mM, pH = 7,4).

La formation ou la dénaturation d'une double hélice d'ADN est généralement un processus hautement coopératif influencé par les interactions entre les bases adjacentes (stacking et liaisons hydrogènes) ainsi que par les propriétés conformationnelles du squelette sucre-phosphate. On peut considérer la dénaturation de l'ADN comme une transition de phase entre un état en double hélice dans lequel le polymère est relativement rigide et un état en simple brin (« Random-coil ») beaucoup plus flexible. Cette transition est régie par une compétition

entre le coût énergétique nécessaire à la rupture des liaisons entre les bases et le gain d'entropie acquis lors du passage en simple brin.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾

La courbe de dénaturation de l'oligonucléotide « libre », **Figure 24** en bleu, est d'allure classique et s'apparente à une sigmoïde. La température de transition (T_m), maximum de la dérivée première de la courbe de dénaturation par rapport à la température, est évaluée à 68°C. Lorsque l'oligonucléotide est adsorbé à la surface de la nanoparticule, l'allure de la courbe évolue progressivement passant d'une sigmoïde à une droite quand la densité en oligonucléotide est maximale. Ainsi, pour les rapports $R = 35$ et 70 , une forte diminution de la coopérativité est observée (pente de la sigmoïde plus faible et élargissement de la courbe de la dérivée première) et la température de transition diminue légèrement ($\Delta T_m \# 2-3^\circ\text{C}$). Pour une valeur de R égale à 175 , la dénaturation de la structure perd toute coopérativité et il devient impossible de déterminer une valeur de T_m .

Ces résultats semblent montrer que quand R est inférieur à 70 l'oligonucléotide reste associé en double hélice et que lorsque la surface est saturée, une gêne stérique limite l'ouverture de l'hélice. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'encombrement stérique, en réduisant les degrés de liberté de l'oligonucléotide en simple brin, va induire une diminution du gain entropique et de ce fait entraîner une perte de la coopérativité de la transition. Un tel comportement a déjà été reporté et modélisé par Pettitt & al pour des oligonucléotides liés à des surfaces de silice.⁽⁵²⁻⁵³⁾ Si l'on prend en compte l'ensemble des données présentées précédemment et notamment les résultats obtenus en infrarouge, l'hypothèse de l'oligonucléotide conservant sa structure en double hélice semble la plus appropriée.

V. EVALUATION BIOLOGIQUE DU VECTEUR

V.1. Stabilité des complexes dans le sérum

La stabilité des nanoparticules dans le sérum de veau fœtal (SVF 10 et 50%) est un critère important pour leur utilisation en milieu biologique. Dans un tel milieu, les protéines vont interagir avec les nanocomplexes et on peut s'attendre à une augmentation de l'intensité du fluorochrome lié à son relargage de la surface des nanoparticules du fait de sa substitution par les protéines du sérum. La stabilité des nanocomplexes en milieu biologique a ainsi été étudiée par spectroscopie de fluorescence. Les mesures effectuées pour différentes valeurs de R ainsi que pour différentes concentrations en sérum sont présentées **Figure 25**.

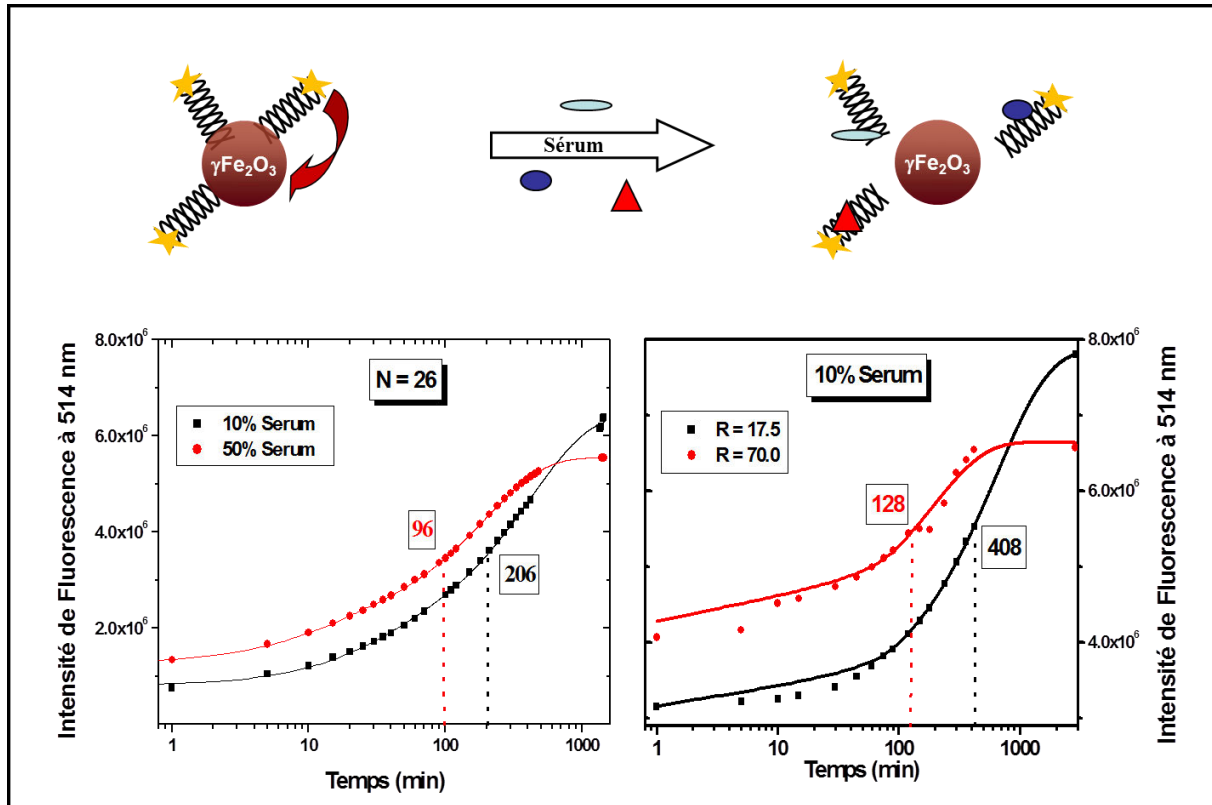


Figure 25 : Stabilité des complexes en présence de sérum de veau fœtal (SVF).

L'intensité de fluorescence des solutions contenant les différents nanocomplexes augmente en fonction du temps. Le temps de demi-vie est défini comme le temps au bout duquel 50% de l'oligonucléotide s'est décroché de la particule. En prenant comme hypothèse qu'après 48 heures d'incubation dans le sérum, la totalité de l'oligonucléotide s'est dissociée de la surface de la nanoparticule, nous avons déduit des courbes de relargage un temps de demi-vie des nanocomplexes. Ce temps est estimé graphiquement à partir du point où l'intensité de fluorescence a atteint 50% de son augmentation. La **Figure 25** présente les résultats obtenus pour des nanoparticules complexées avec 26 brins d'oligonucléotides (en présence de 10 et 50% de sérum) ainsi que pour des nanocomplexes formés avec les rapports $R=17,5$ et 70 (soit respectivement 16 et 66 dODN/nano pour cette expérience).

Les nanoparticules complexées avec 26 brins d'oligonucléotides (**Figure 25A**) par nanoparticule et dispersées dans le sérum (10 et 50%) présentent une augmentation de l'intensité de fluorescence au cours du temps traduisant d'une part un relargage du fluorophore de la surface des nanoparticules et d'autre part que plus la teneur en sérum est

élevée et plus le temps de demi-vie du complexe diminue. Ainsi pour un ferrofluide dispersé dans du sérum à 10 %, la demi-vie du complexe est d'environ 3h30 alors que si on augmente la teneur en sérum à 50% la demi-vie du complexe est réduite à environ 1h30. Les cultures cellulaires étant généralement conduites dans un milieu de culture contenant 10% de sérum nous nous sommes placés pour la suite de l'étude dans ces conditions expérimentales.

Les courbes de relargage pour les nanocomplexes synthétisés pour un rapport R=17,5 et 70, **Figure 25B**, ont une allure comparable à celle observée pour le complexe formé avec 26 oligonucléotides par particule. En revanche, des différences notables sont observées pour les temps de demi-vie de ces trois complexes. Le temps de demi-vie pour le complexe R = 17.5 est estimé à environ 6-7 heures alors que celui du rapport 70 est d'environ 2h. Cette étude montre ainsi que plus la densité en oligonucléotide est élevée et plus les temps de demi-vie diminuent, décrivant ainsi une baisse de la stabilité du complexe quand le nombre d'oligonucléotide augmente à la surface de la nanoparticule. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux décrivant la conformation de l'oligonucléotide en fonction de la densité en dODN. Pour de faibles densités en acide nucléique, la conformation dite « parallèle » de l'oligonucléotide fait que le nombre de phosphates en interactions avec les nanoparticules de maghémite est potentiellement plus important que dans le cas de la configuration dite « perpendiculaire ». Vraisemblablement cela joue un rôle important dans la force de la liaison qui lie l'oligonucléotide à la surface de la particule et explique que la demi-vie des complexes est inversement proportionnelle à la densité en oligonucléotide.

V.2. Quantification de l'internalisation des particules dans des cellules SW480

L'internalisation des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @dODN par des cellules SW480 issues de carcinomes du colon a été évaluée par cytométrie en flux, par l'intermédiaire du fluorophore lié à l'oligonucléotide, ainsi que par des mesures liées aux propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer en utilisant un lecteur magnétique, le MIAtek (Magnisense, France). Ce lecteur mesure la dérivée 3^{ème} de l'aimantation et l'intensité du signal recueilli est proportionnelle à la quantité de matériau magnétique contenue dans l'échantillon, **Figure 26**.

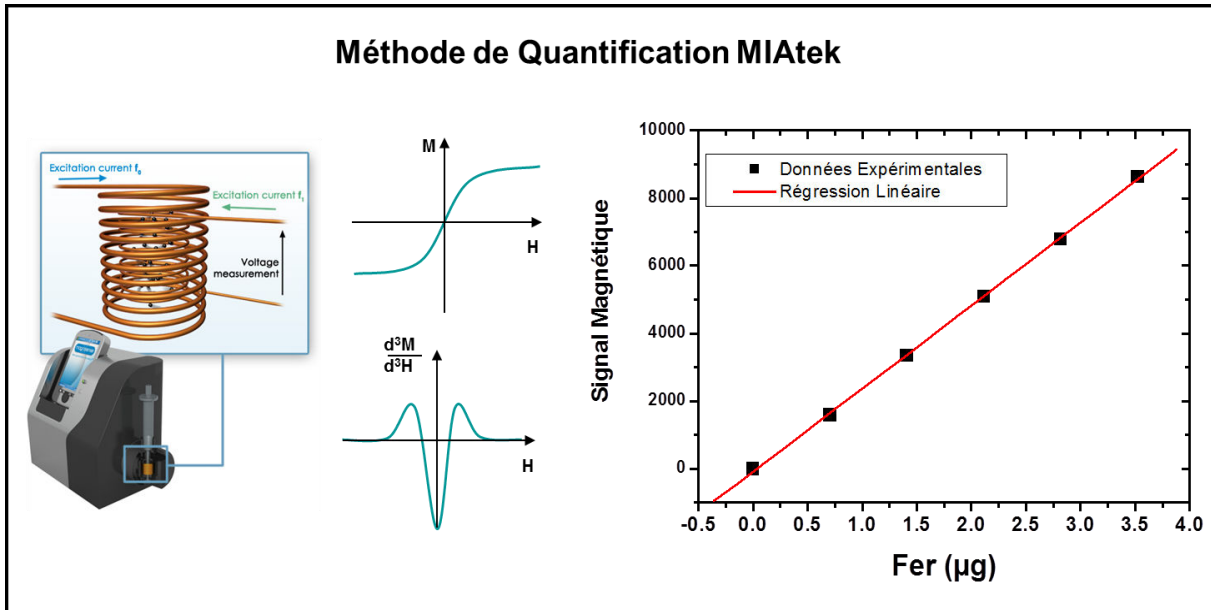


Figure 26 : Description de la méthode de quantification des nanoparticules à l'aide du MIAtek.

Dans un premier temps, une droite de calibration est tracée en utilisant des solutions de particules de concentration connue. Dans une seconde étape, le signal magnétique des cellules incubées avec les nanocomplexes est alors mesuré et la quantité de nanoparticules internalisées est déduite de la droite de calibration.

Ces mesures ont été effectuées en parallèles avec les deux techniques. Pour cela, les cellules ont été incubées avec des concentrations variables de nanocomplexes synthétisés avec différentes valeurs de R, sur des périodes allant de 30 minutes à 48 heures, en présence ou non d'un champ magnétique. Après incubation, le milieu de culture est éliminé, plusieurs lavages effectués et les cellules sont récupérées pour analyse.

V.2.1. Effet d'un champ magnétique et de la concentration en particule

Une propriété magnétique importante des nanoparticules de maghémite utilisées dans cette étude est qu'elles vont être attirées par un gradient de champ magnétique. Une méthode simple pour augmenter le taux d'internalisation de particules magnétiques dans des cellules est donc de cultiver celles-ci sur une plaque aimantée. Il s'agit du procédé de MagnétofectionTM décrit au premier chapitre de ce manuscrit.

Dans une première étape, nous avons vérifié que la présence d'un champ magnétique pouvait influencer l'internalisation des complexes. Les cellules (125000 cellules par puits) ont été incubées pendant 16 heures en présence ou non d'une plaque aimantée avec des quantités croissantes du nanocomplexe comportant 26 dODN par nanoparticule. Après plusieurs lavages, les cellules sont récupérées et l'échantillon est scindé en deux : une partie est analysée par cytométrie en flux et la seconde partie conservée pour une analyse de la réponse magnétique. Les résultats de l'internalisation quantifiée par cytométrie et MIAtek sont présentés **Figure 27**.

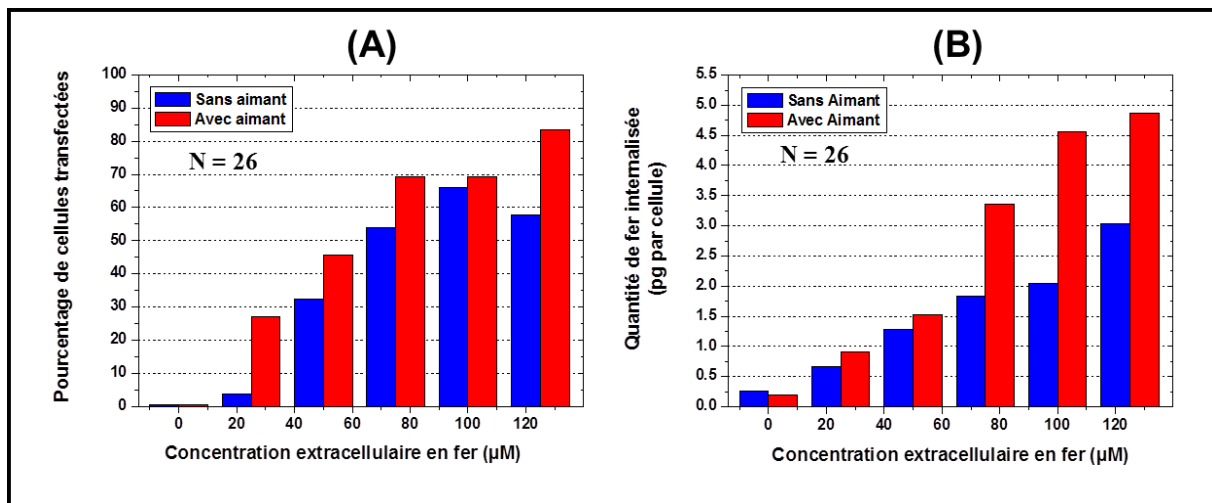


Figure 27 : Etude par cytométrie en flux (A) et MIAtek (B) de l'évolution de l'internalisation des nanoparticules en fonction de la concentration en particule en présence ou en l'absence d'un champ magnétique (Cytométrie en flux).

L'étude par cytométrie montre que le pourcentage de cellules fluorescentes croît avec la concentration extracellulaire en nanoparticules lors de l'incubation et la présence d'un champ magnétique permet d'obtenir une plus grande efficacité de transfection. Ainsi le meilleur taux d'internalisation du dODN (83%) est obtenu pour une concentration extracellulaire en fer de 125 µM en présence du champ magnétique, **Figure 27(A)**. La quantification du nombre de nanoparticules effectuée à l'aide du MIAtek est une mesure globale qui reflète la quantité totale de maghémite présente dans toutes les cellules récupérées. Les résultats présentés **Figure 27(B)** ont été obtenus en divisant la masse totale de fer par le nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Il s'agit d'une valeur moyenne que nous avons choisi d'exprimer en pg par cellule. Le nombre de cellules contenues dans l'échantillon de mesure a été déterminé soit par cytométrie soit par comptage manuel sur lame Malassez.

Les résultats obtenus par dosage MIAtek sont sensiblement différents de ceux obtenus en cytométrie. On observe en effet une plus grande linéarité de l'internalisation des particules et

ce en présence ou non d'un champ magnétique. De plus l'efficacité du champ magnétique vis-à-vis de la transfection semble surtout remarquable pour les plus fortes concentrations en fer (**Figure 27(B)**, 75, 100 et 125 μM) alors que les données de cytométrie montrent que l'apport du champ magnétique n'est réellement intéressant que pour la plus basse et la plus haute concentration (**Figure 27(A)**, 25 et 125 μM). Les différences entre les deux méthodes qui semblent incohérentes en première approche peuvent cependant être expliquées par la nature des phénomènes mesurés ainsi que par la sensibilité de chaque technique. Le MIAtek, contrairement à la cytométrie, rend compte d'une mesure globale moyennée sur toutes les cellules mais est incapable de prendre en compte la spécificité de chaque cellule et ainsi l'hétérogénéité de l'internalisation. Les données obtenues par cytométrie en flux étant basées sur la mesure de la fluorescence émise par chaque cellule sont par conséquent beaucoup plus représentatives de la spécificité cellulaire mais aussi plus tributaires des conditions d'internalisations (variations locales du champ magnétique ou de la concentration extracellulaire en particules), des variations du milieu intracellulaire pouvant induire un « Quenching » de la fluorescence (pH, concentration en particules) ou tout simplement de la dégradation du fluorophore. Ainsi les différences observées entre les deux techniques à 25 μM en l'absence de champ magnétique, peuvent s'expliquer par le fait que peu de cellules ont internalisé les particules ou seulement en petites quantités et de ce fait la fluorescence de chaque cellule est faible alors que la mesure du signal magnétique moyennée sur 125000 cellules donne un résultat positif. Aux plus hautes concentrations en fer, une trop grande accumulation (agrégation ?) des nanoparticules dans certains compartiments cellulaires peut entraîner un « Quenching » de la fluorescence qui, s'il est trop important, va fausser les résultats de cytométrie. Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus avec les deux techniques montrent que le taux d'internalisation augmente avec la concentration extracellulaire en fer et que la présence d'un champ magnétique permet d'accroître significativement le nombre de particules par cellule. On a ainsi pu observer que pour une concentration extracellulaire en fer égale à 125 μM , plus de 80% des cellules ont été transfectées par l'oligonucléotide et que la quantité de fer internalisé est de 4.9 +/- 0.7 pg par cellule soit environ 3.10^6 particules. Ce résultat est d'ailleurs assez proche de celui obtenu par l'équipe de Claire Wilhem et Florence Gazeau au moyen d'autres techniques de mesure (magnétophorèse et résonance ferromagnétique) en utilisant des particules de maghémite recouvertes d'acide dimercaptosuccinique (DMSA) internalisées par des macrophages murins (RAW 264.7).⁽⁵⁴⁾

La visualisation directe de l'internalisation des nanocomplexes, obtenue par microscopie, est présentée **Figure 28** pour une concentration extracellulaire en fer de 50 μM (soit 68 nM en dODN).

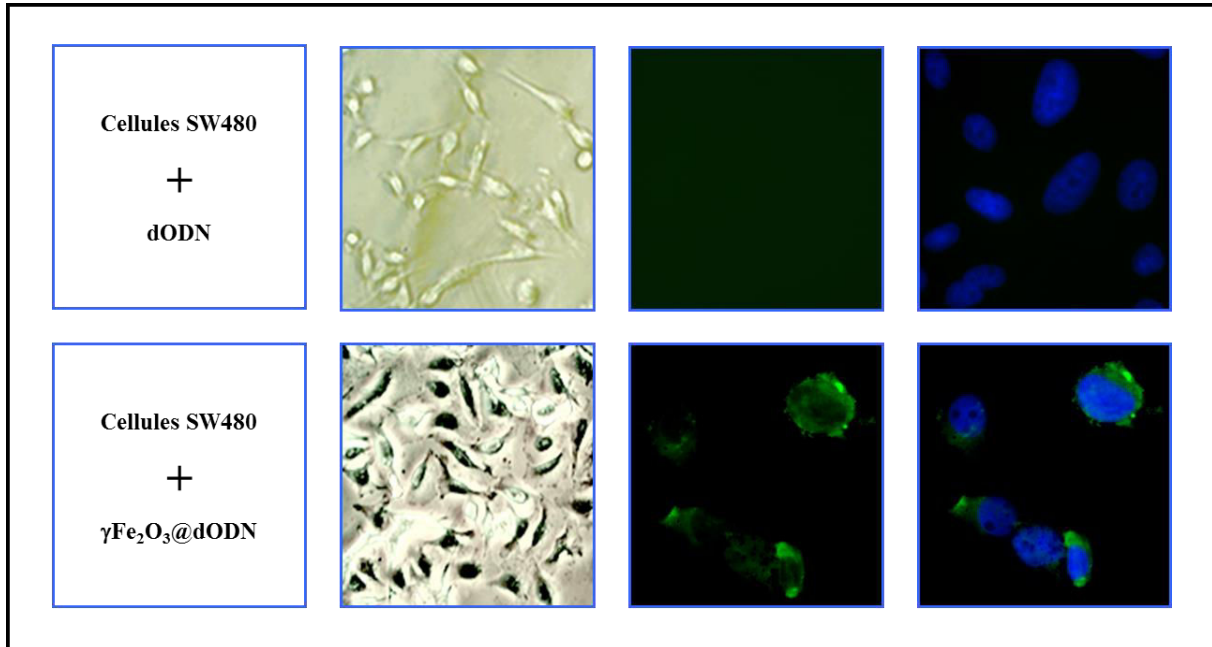


Figure 28 : Visualisation de l'internalisation d'un nanocomplexe par microscopie optique.

La coloration de Perls (*Annexe III, I. Coloration de Perls*), provoque une précipitation des ions Fer III sous forme de granules bleu-vert et permet de visualiser l'internalisation des nanoparticules de maghémite en microscopie à champ clair. L'oligonucléotide peut être observé directement en microscopie de fluorescence par l'intermédiaire du groupement 6-carboxyfluorescéine qui émet une fluorescence dans le vert. Afin de localiser la présence de l'oligonucléotide, relativement aux différents compartiments cellulaires, le noyau a été coloré en bleu par du DAPI (*Annexe III, II. Coloration au DAPI*). En absence de nanoparticules, aucune fluorescence verte n'est détectable au sein des cellules, **Figure 28**, confirmant ainsi la nécessité d'utiliser un vecteur pour que la transfection de l'oligonucléotide dans les cellules soit effective. Au contraire, lorsque le dODN est complexé aux nanocristaux de maghémite, sa présence est bien visible dans le compartiment cytoplasmique des cellules.

V.2.2. Effet du temps d'incubation

Après avoir vérifié que les nanocomplexes pouvaient être internalisés par des cellules SW480 et afin d'optimiser le processus, une étude de l'influence du temps d'incubation en présence du champ magnétique a été réalisé. Les cellules ont été incubées (250000 cellules par puits)

avec les complexes R = 17.5 et 70 à une concentration extracellulaire en fer égale à 250 μM , soit $[\text{dODN}] = 0.23 \mu\text{M}$ (R = 17.5) et $0.92 \mu\text{M}$ (R = 70). Après des temps d'incubation allant de 30 minutes à 24 heures ($t = 30, 60, 120, 240$ et 1440 minutes), l'internalisation des complexes a été suivie en parallèle par cytométrie en flux et mesures MIAtek. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 29**.

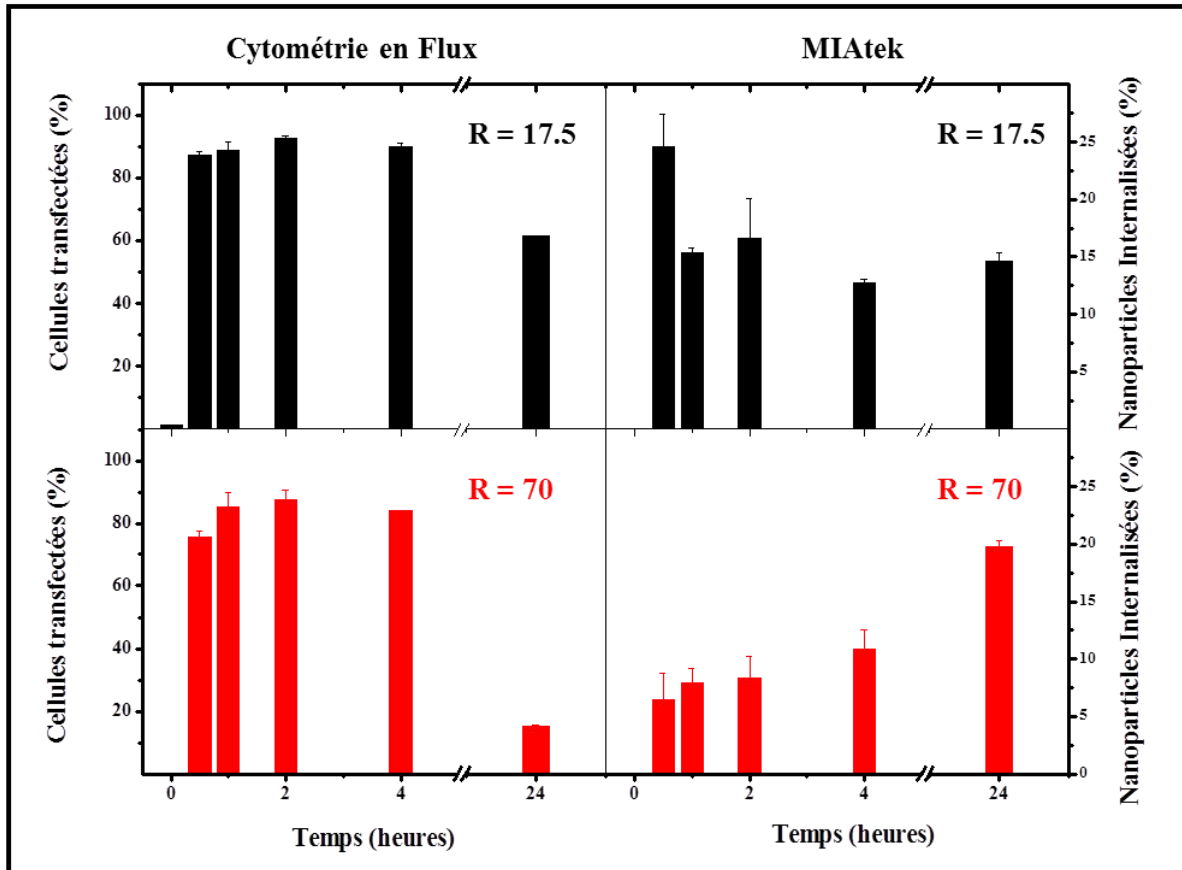


Figure 29 : Evolution du pourcentage de transfection et de particules internalisées en fonction du temps d'incubation sur un aimant.

Les données de cytométrie en flux montrent des résultats comparables quel que soit le rapport R utilisé. A la concentration en fer de 250 μM , l'internalisation des particules est relativement rapide puisqu'au bout de 2 heures 93 % des cellules ont intégré l'oligonucléotide pour le rapport R = 17.5 et 85% pour R = 70. On peut remarquer que pour les deux complexes, plus de 75 % des cellules sont transfectées au bout de 30 minutes alors qu'étonnamment après 24 heures d'incubation, le taux de transfection chute, à 60% pour le nanocomplexe R=17,5 et 15 % pour le complexe R = 70.

Les résultats MIAtek, **Figure 29**, sont exprimés en pourcentage de particules internalisées. Ce pourcentage est obtenu comme précédemment à partir d'une droite de calibration effectuée

sur des solutions de nanoparticules de concentration connue. Les mesures magnétiques permettent d'observer des taux d'internalisation qui diffèrent en fonction de la densité d'oligonucléotide greffée à la surface de la nanoparticule. Pour une faible densité ($R = 17.5$) le pourcentage de particules internalisées est situé aux environs de 15% et varie assez peu en fonction du temps d'incubation sur l'aimant. Au contraire, pour une plus forte densité ($R = 70$) on observe une augmentation linéaire du taux d'internalisation. En effet, après 30 minutes seulement 6% des particules sont internalisées, alors qu'après 24 heures le taux d'internalisation atteint les 20%.

En tenant compte de ces différents résultats, il peut être suggéré que la diminution du taux de transfection observé par cytométrie après 24h est liée soit au fait que le fluorophore se dégrade au bout de quelques heures, soit à une extinction de fluorescence liée à l'accumulation des nanoparticules. Cette dernière hypothèse est confortée par le fait que pour un nombre quasi-identique de nanoparticules internalisées (15% $R=17,5$ et 20% $R=70$), le nombre de fluorophore est 4 fois plus important pour le nanocomplexe $R=70$ engendrant ainsi un phénomène de quenching plus important.

Les différences de comportement observées par mesure magnétique vis-à-vis de la cinétique d'internalisation des nanocomplexes en fonction du rapport R sont très certainement liées aux différences de densité et de conformation de l'oligonucléotide à la surface de la nanoparticule. Bien que l'étude de la stabilité colloïdale des complexes n'ait pas révélée de grandes variations du diamètre hydrodynamique ou du potentiel Zeta en fonction de la valeur de R , l'augmentation du nombre d'oligonucléotide à la surface de la particule doit nécessairement conduire à une augmentation de la charge négative de la particule, tout au moins localement, décuplant ainsi les interactions répulsives avec les glycoprotéines membranaires et de ce fait ralentissant la traversée de la membrane plasmique. De plus l'accroissement de la densité en créant un effet brosse doit probablement modifier l'approche de la particule au niveau de la membrane cellulaire.

La combinaison des données recueillies lors de l'étude du relargage de l'oligonucléotide dans le sérum (demi-vie de 2 ou 6 heures en fonction de R) et de celles obtenues par l'étude de l'internalisation des nanocomplexes, nous ont conduits à adopter pour la suite de l'étude un temps d'incubation sur aimant de 2 heures.

V.3. Activité biologique des vecteurs

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, la protéine STAT3 est un facteur de transcription activé constitutivement dans de nombreuses cellules cancéreuses. Suite à la phosphorylation d'une de ces tyrosines dans le cytoplasme, la protéine forme un dimère qui est pris en charge par des importines et va sous cette forme pouvoir traverser la membrane nucléaire. Une fois parvenue dans le noyau, le facteur de transcription se lie à sa cible sur l'ADN génomique et participe à la transcription de gènes impliqués dans des phénomènes cancéreux tels que la régulation de l'apoptose. Lors de travaux antérieurs, il a été montré que l'oligonucléotide leurre utilisé dans cette étude pouvait inhiber la translocation nucléaire en se liant aux dimères de STAT3 à l'intérieur du compartiment cytoplasmique. Lorsqu'une quantité suffisante de STAT3 est bloquée dans le cytoplasme une dérégulation de l'apoptose se produit conduisant à une augmentation de la mort cellulaire.⁽¹⁶⁾

V.3.1. Inhibition de la translocation nucléaire de STAT3

Afin d'étudier l'interaction des nanocomplexes avec leur cible cellulaire (STAT3), des expériences d'immunofluorescence ont été menées pour visualiser par microscopie la localisation de STAT3 au sein de cellules SW480. Pour ces expériences, nous avons utilisé un oligonucléotide de contrôle que nous appellerons Mut-dODN dont la séquence est la suivante : 5'-d(CAT TTG CCA CAA TCG AAG ATT GTG GCA AAT G)-3'. Tout comme le dODN, il est protégé des exonucléases par un groupement AmC6 en 5' et marqué en 3' par un fluorophore (6-FAM = 6-carboxyfluorescéine). La spécificité de séquence de cet oligonucléotide fait qu'il n'est pas reconnu par STAT3 contrairement au dODN.

Les cellules ont été incubées pendant 48 heures avec des nanocomplexes formés à un rapport R = 17.5 ou 70 avec l'un ou l'autre des oligonucléotides. Le champ magnétique a été appliqué uniquement pendant les deux premières heures de l'incubation. Afin de pouvoir comparer l'efficacité des nanocomplexes en fonction de la conformation de l'oligonucléotide à la surface de la nanoparticule, les cellules ont été incubées avec une concentration extracellulaire constante en oligonucléotide égale à 4,6 μ M soit une concentration en fer de 1,25 mM pour le rapport R = 70 et de 5 mM pour le rapport R = 17.5. Le marquage de la protéine STAT3 s'effectue par une technique de double marquage. Les cellules sont tout d'abord incubées pendant une heure en présence d'un anticorps primaire anti-STAT3, puis pendant 90 minutes avec un anticorps secondaire qui se lie à l'anticorps primaire et qui est marqué par un fluorophore (Alexa Fluor 546, rouge). Comme précédemment les noyaux sont visualisés par une coloration au DAPI (bleu). La **Figure 30** présente l'ensemble des résultats.

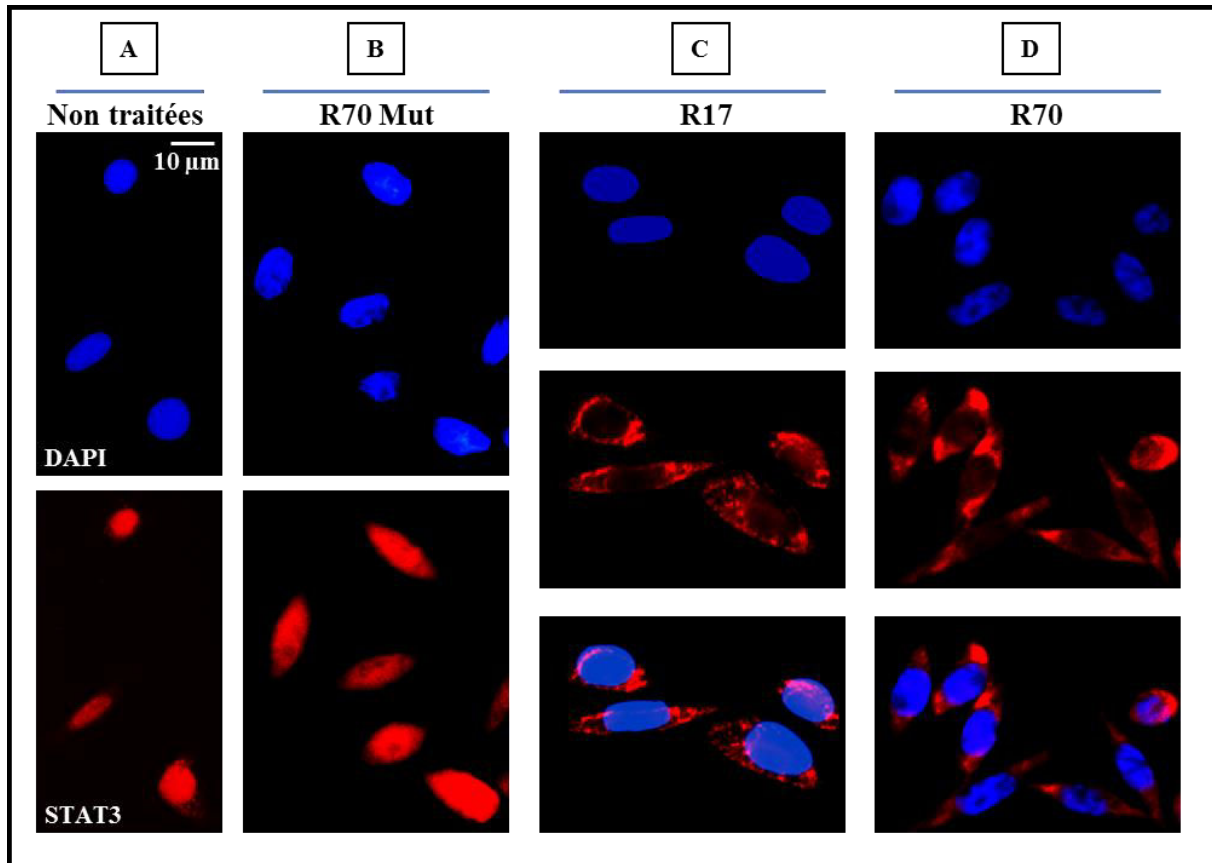


Figure 30 : Visualisation de l'inhibition de la translocation nucléaire de STAT3 par microscopie à fluorescence.

En absence de dODN, **Figure 30(A)**, ainsi que lorsque les cellules ont été incubés avec des nanocomplexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@Mut-dODN}$ à un rapport $R = 70$, **Figure 30(B)**, ou $R = 17,5$, STAT3 apparaît localisée principalement dans le noyau ainsi que dans la zone péri nucléaire. En revanche, lorsque les cellules sont incubées en présence de dODN associé aux nanoparticules à un rapport $R = 17,5$ ou 70 , la localisation de la protéine devient principalement cytoplasmique, **Figure 30(C) et (D)**.

Ces expériences d'immunofluorescence confirment tout d'abord la capacité de nos nanocomplexes à transporter un oligonucléotide au sein de cellules SW480. De plus, les modifications cellulaires observées indiquent qu'après complexation avec la surface des nanoparticules, l'oligonucléotide conserve son intégrité puisqu'il garde sa capacité à se lier à sa cible, et enfin qu'il est libéré dans le cytoplasme en quantité suffisamment importante pour pouvoir bloquer la translocation nucléaire de STAT3.

V.3.2. Induction de l'apoptose

L'imagerie par fluorescence n'ayant qu'une valeur qualitative, nous avons cherché à obtenir des données plus quantitatives quant à l'efficacité des nanocomplexes. Pour ce faire, nous avons mesuré les variations de la mortalité cellulaire induites lors de l'introduction du dODN dans les cellules. Nous avons rappelé précédemment que la séquestration de STAT3 dans le cytoplasme en inhibant la transcription de certains gènes permet aux cellules cancéreuses d'entrer en apoptose.⁽¹⁶⁾ Une augmentation de la mortalité sera donc un signe de l'efficacité des nanocomplexes à délivrer le dODN. Pour ces tests de mortalité, les cellules ont subi le même traitement que préalablement lors des expériences d'immunofluorescence en utilisant également l'oligonucléotide Mut-dODN comme contrôle. La mortalité a été évaluée après 48 heures d'incubation soit par comptage manuel au microscope à l'aide d'une lame Malassez en marquant les cellules avec du bleu Trypan, **Figure 31**, soit par cytométrie en flux en marquant les cellules par de l'iodure de propidium et de l'Annexin V (**Annexe z**).

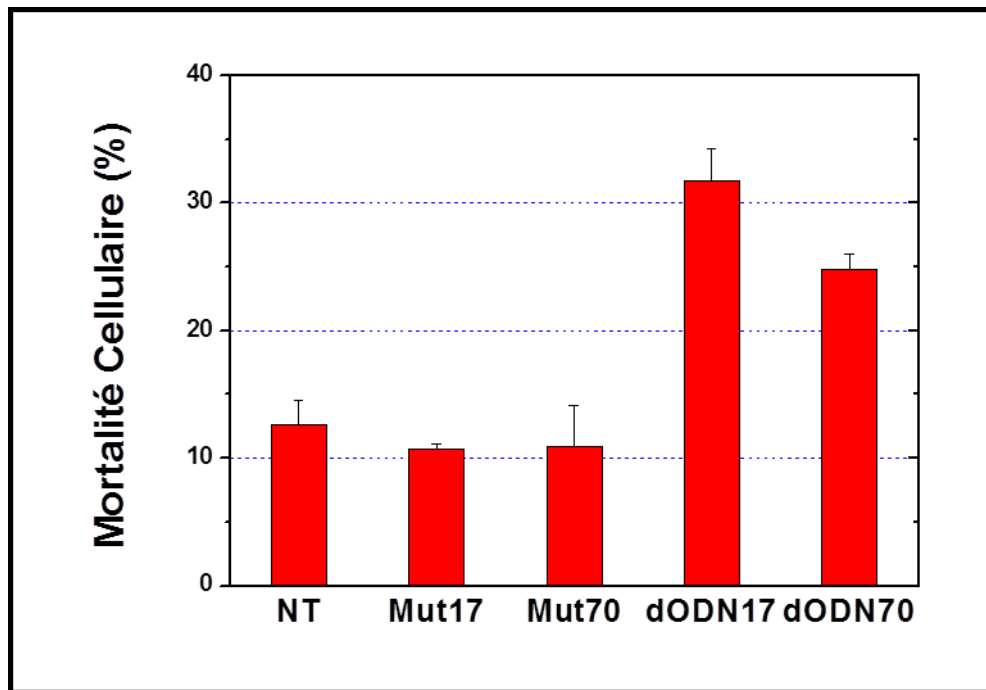


Figure 31 : Mortalité cellulaire quantifiée par coloration au bleu trypan.

Le taux de mortalité observé avec le ratio de 17,5 dODN par particule de maghémite est de l'ordre de 30%. La mort des cellules peut être attribuée à la spécificité du nanocomplexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@$ dODN puisque la mortalité induite par le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@$ Mut-dODN reste inférieure à 20% quelle que soit la méthode de mesure employée. Cependant, lorsque la densité en oligonucléotide à la surface de la nanoparticule augmente, l'induction de la

mortalité semble moins efficace puisqu'on constate une diminution d'environ 5 à 10 % de cellules mortes pour le rapport $R = 70$, **Figure 31**. Outre les incertitudes expérimentales, les différences de mortalité peuvent être expliquées par les caractéristiques des nanocomplexes. L'état d'agrégation des particules, la stabilité du complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @oligonucléotide, le temps d'internalisation sont autant de facteurs qui vont influencer la libération de l'oligonucléotide et ainsi son efficacité au sein de la cellule. Le résultat obtenu pour le rapport $R = 17.5$ est cependant relativement satisfaisant puisque tout à fait similaire à celui obtenu avec d'autres vecteurs.⁽¹⁶⁾ L'amélioration du processus d'inhibition de STAT3 par des nanocomplexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @oligonucléotide pourrait passer par une optimisation de la séquence nucléotidique, de la charge en oligonucléotide, de la concentration en particule, du temps d'incubation sur aimant...

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de complexer en une seule étape un oligonucléotide à la surface d'une nanoparticule de maghémite en utilisant un procédé d'assemblage basé sur les attractions électrostatiques exercées entre le polyanion qu'est l'acide nucléique et la surface cationique de la nanoparticule d'oxyde de fer. Cette méthode permet de contrôler la charge en ADN portée par la nanoparticule et nous avons établi qu'il est possible de transporter jusqu'à 70 brins d'oligonucléotide sur une particule de maghémite de 10 nm de diamètre. L'analyse spectroscopique, nous a permis de démontrer que la structure en hairpin de l'oligonucléotide est conservée lors de la complexation à la maghémite et que selon la densité en acide nucléique l'axe de la double hélice est orienté parallèlement ou perpendiculairement à la surface de la nanoparticule.

La conformation de l'oligonucléotide à la surface de la particule semble avoir une importance en milieu biologique. En effet, l'étude de la stabilité des complexes dans le sérum a montré que plus la densité en oligonucléotide est élevée moins le complexe est stable. De plus, le suivi, par cytométrie en flux et mesure magnétique, de la transfection de cellules SW480 a montré que l'internalisation des nanocomplexes a bien lieu quelle que soit l'orientation de l'oligonucléotide, mais que la cinétique de transport est dépendante de la densité. Enfin l'imagerie par fluorescence et les tests de mortalité ont permis de vérifier que le dODN, une fois véhiculé dans les cellules par les nanoparticules de maghémite, pouvait inhiber efficacement la protéine STAT3 et ainsi induire la mort de cellules cancéreuses.

Ce travail a donné lieu à 2 publications :
Geinguenaud & al, Nanomedicine. 2012 ; 8 : 1106-1115.
Geinguenaud & al, J. Phys. Chem. B. 2014 ; 118 : 1535-1544.

Références bibliographiques

1. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **2000**; 19: 2468-2473.
2. Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heirich PC, Horn F. Acute-phase response factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell Biol.* **1993**; 13: 276-288.
3. Akira A. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* **2000**; 19: 2607-2611.
4. Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, Li F, Nachiyappan A, Dai X, Swamy SN, Ahn KS, Kumar AP, Tan BKH, Hui KM, Sethi G. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**; 1835: 46-60.
5. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3 and Stat4: Members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**; 91: 4806-4810.
6. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **2000**; 19: 2474-2488.
7. Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **2006**; 15: 1445-1451.
8. Wang X, Crowe PJ, Goldstein D, Yang JL. STAT3 inhibition, a novel approach to enhancing targeted therapy in human cancers (Review). *Int. J. Oncol.* **2012**; 41: 1181-1191.
9. Shodeinde AL, Barton BE. Potential use of STAT3 inhibitors in targeted prostate cancer therapy: future prospects. *OncoTargets Ther.* **2012**; 5: 119-125.
10. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling apoptosis and decreases surviving expression in primary effusion lymphoma. *Blood* **2003**; 101: 1535-1542.
11. Becker S, Groner B, Müller CW. Three-dimensional structure of the STAT3 β homodimer bound to DNA. *Nature* **1998**; 394: 145-151.
12. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **1998**; 93: 827-839.
13. Kaptein A, Paillard V, Saunders M. Dominant negative Stat3 mutant inhibits interleukin-6 induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271: 5961-5964.
14. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **1994**; 264: 1415-1421.
15. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**; 93: 6231-6235.
16. Souissi I, Ah-Koon L, Schischmanoff PO, Lesage D, Le Coquil S, Roger C, Dusanter-Fourt I, Varin-Blank N, Cao A, Metelev V, Baran-Marszak F, Fagard R. A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- κ B. *BMC Cell Biol.* **2011**; 12: 14.
17. Liu L, McBride KM, Reich NC. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**; 102: 8150-8155.
18. Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF, Grandis JR. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**; 100: 4138-4143.

19. Sen M, Thomas SM, Kim S, Yeh JI, Ferris RL, Johnson JT, Duvvuri U, Lee J, Sahu N, Joyce S, Freilino ML, Shi H, Li C, Ly D, Rapireddy S, Etter JP, Li P-K, Wang L, Chiosea S, Seethala RR, Gooding WE, Chen X, Kaminski N, Pandit K, Johnson DE, Grandis JR. First-in-Human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov.* **2012**; 2: 694-705.
20. Mc Bain SC, Yiu HPP, El Haj A, Dobson J. Polyethyleneimine functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection. *J. Mater. Chem.* **2007**; 17: 2561-2565.
21. Pan B, Cui D, Sheng Y, Ozkan C, Gao F, He R, Li Q, Xu P, Huang T. Dendrimer-Modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res.* **2007**; 67: 8156-8163.
22. Bhattarai SR, Kim SY, Jang KY, Lee KC, Yi HK, Lee DY, Kim HY, Hwang PH. Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell lines. *J. Virol. Methods* **2008**; 147: 213-218.
23. Sapet C, Laurent N, Le Gourrierec L, Augier S, Zelphati O. MagnétofectionTM *in vitro* et *in vivo*: une voie vers la thérapie génique. *Ann. Biol. Clin.* **2010**; 68: 133-142.
24. Jiang S, Eltoukhy AA, Love KT, Langer R, Anderson DG. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery. *Nano Lett.* **2013**; 13: 1059-1064.
25. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage Poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.* **2005**; 11: 990-995.
26. Hunter AC, Moghimi SM. Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**; 1797: 1203-1209.
27. Grandinetti G, Ingle NP, Reineke TM. Interaction of Poly(ethylenimine)-DNA polyplexes with mitochondria; implications for a mechanism of cytotoxicity. *Mol. Pharm.* **2011**; 8: 1709-1719.
28. Mornet S. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales. *Thèse* **2002**; Chap II: 73-91.
29. Lucas IT, Durand-Vidal S, Dubois E, Chevalet J, Turq P. Surface charge density of maghemite nanoparticles: role of electrostatics in the proton exchange. *J. Phys. Chem. C* **2007**; 111: 18568-18576.
30. Portet D, Denizot B, Rump E, Lejeune JJ, Jallet P. Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**; 238: 37-42.
31. Robinson DB, Persson HHJ, Zeng H, Li G, Pourmand N, Sun S, Wang SX. DNA-functionalized MFe₂O₄ (M = Fe, Co or Mn) nanoparticles and their hybridization to DNA-functionalized surfaces. *Langmuir* **2005**; 21: 3096-3103.
32. Lalatonne Y, Paris C, Serfaty JM, Weinmann P, Lecouvey M, Motte L. Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chem. Commun. (Camb)* **2008**; 22: 2553-2555.
33. Mäkie P, Persson P, Österlund L. Adsorption of trimethyl phosphate and triethyl phosphate on dry and water pre-covered hematite, maghemite, and goethite nanoparticles. *J. Colloid Interface. Sci.* **2013**; 392: 349-358.
34. Moumen N, Pileni M-P. Control of the size of cobalt ferrite magnetic fluid. *J. Phys. Chem.* **1996**; 100: 1867-1873.
35. Ngo AT, Pileni M-P. Assemblies of ferrite nanocrystals : partial orientation of the easy magnetic axes. *J. Phys. Chem. B* **2001**; 105: 53-58.
36. Ingerter D, Pileni M-P. Nanocrystals used as masks for nanolithography. *J. Phys. Chem. B* **2003**; 107: 9617-9619.

37. Feltin N, Pileni M-P. New techniques to make ferrite nanosized particles. *J. Phys. IV France* **1997**; 7: C1-609-610.
38. Petrovykh DY, Kimura-Suda H, Whitman LJ, Tarlov MJ. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**; 125: 5219-5226.
39. Pei H, Zuo X, Pan D, Shi J, Huang Q, Fan C. Scaffolded biosensors with designed DNA nanostructures. *NPG Asia Materials* **2013**, DOI:10.1038/am.2013.22.
40. Kang J, Wang J, Jasinski JB, Achilefu S. Fluorescence manipulation by gold nanoparticles: from complete quenching to extensive enhancement. *J. Nanobiotech.* **2011**; 9: 16.
41. Schreiner SM, Hatch AL, Shudy DF, Howard DR, Howell C, Zhao J, Koelsch P, Zharnikov M, Petrovykh DY, Opdahl A. Impact of DNA-surface interactions on the stability of DNA hybrids. *Anal. Chem.* **2011**; 83: 4288-4295.
42. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**; 171: 737-738.
43. Mandelkern M, Elias JG, Eden D, Crothers DM. The dimensions of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **1981**; 152: 153-161.
44. Saenger W. Principles of nucleic acid structure. Springer-Verlag, New-York. **1984**.
45. Hill HD, Millstone JE, Banholzer MJ, Mirkin CA. The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano.* **2009**; 3: 418-424.
46. Tsuboi M. Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids. In: Brama EGJ, editor. Applied spectroscopy reviews. New York: Dekker; **1969**. p. 45-90.
47. Liquier J, Taillandier E. Infrared spectroscopy of nucleic acids. In: Mantsch HH, Chapam D, editors. Infrared spectroscopy of biomolecules. New York: Wiley-Liss; **1996**. p. 131-158.
48. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys. Chem.* **2003**; 104: 477-488.
49. Mergny J-L, Lacroix L. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* **2003**; 13: 515-537.
50. Zeng Y, Montrichok A, Zocchi G. Bubble nucleation and cooperativity in DNA melting. *J. Mol. Biol.* **2004**; 339: 67-75.
51. Becaud J, Pompizi I, Leumann CJ. Propagation of melting cooperativity along the phosphodiester backbone of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**; 125: 15338-15342.
52. Qamhieh K, Wong K-Y, Lynch GC, Pettitt BM, The melting mechanism of DNA tethered to a surface. *Int J. Numer. Anal. Model.* **2009**; 6: 474-488.
53. Vainrub A, Pettitt BM. Coulomb blockage of hybridization in two-dimensional DNA arrays. *Phys. Rev. E.* **2002**; 66: 041905.
54. Wilhelm C, Gazeau F, Bacri J-C. Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur. Biophys. J.* **2002**; 31: 118-125.

Chapitre 4

Fonctionnalisation de Nanoparticules par un Oligonucléotide Phosphorothioate et un Peptide Cationique

I. INTRODUCTION

II. COMPORTEMENT DE L'OLIGONUCLEOTIDE A PH ACIDE

III. COMPLEXATION DE LI28 SUR DES PARTICULES DE MAGHEMITE

**IV. COMPLEXATION DE LI28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIES
PAR ETAPES**

**V. INTERCALATION D'UNE COUCHE DE POLY-L-ARGININE : STRATEGIE
D'ASSEMBLAGE COUCHE PAR COUCHE**

**VI. COMPLEXATION DE LI28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIE
EN UNE SEULE ETAPE**

Dans ce chapitre, deux objectifs sont visés : tout d'abord, l'exemplification de la complexation par voie électrostatique d'un oligonucléotide à la surface de nanoparticules de maghémite, en utilisant cette fois un oligonucléotide phosphorothioate présentant des propriétés chimiques différentes et également, élargir ce principe de complexation électrostatique, en associant sur une même nano-plateforme un oligonucléotide et un peptide cationique constitué de 15 arginines. Pour ce dernier point, deux approches sont explorées : l'assemblage dit couche par couche et la fonctionnalisation en une étape.

I. INTRODUCTION

I.1. Contexte

La littérature montre que pour augmenter la résistance des acides nucléiques vis-à-vis de la dégradation par les nucléases, une stratégie est de substituer un atome d'oxygène par un atome de soufre au niveau du squelette phosphodiester (cf. chapitre 1). Par ailleurs, si le nano-vecteur est fonctionnalisé en surface par une molécule ciblant un récepteur spécifique surexprimé à la surface des cellules cibles, alors un ciblage dit actif est obtenu. Ainsi il a été décrit qu'une certaine catégorie de peptides, les « Cell-Penetrating Peptides », favorise l'internalisation cellulaire de macromolécules ou de nanoparticules.⁽¹⁻²⁾ Ces peptides sont constitués, la plupart du temps, de séquences riches en acides aminés cationiques (lysine, arginine) et il a été montré que pour un oligopeptide contenant uniquement des résidus arginine, l'efficacité maximale est obtenue lorsque la séquence comporte 15 acides aminés.⁽¹⁾ Dans ce cadre, il nous est donc paru intéressant de vérifier d'une part, si le protocole de fonctionnalisation par voie électrostatique, décrit dans le Chapitre 3, pouvait s'appliquer à un oligonucléotide phosphorothioate et d'autre part, si via ce concept, il était possible d'ajouter une nouvelle fonctionnalité sur la nano-plateforme ainsi élaborée, c'est-à-dire le ciblage actif via la complexation d'un peptide cationique.

I.2. Description de l'oligonucléotide

Dans cette étude, menée en collaboration avec l'équipe du Professeur A. Carpentier (Hôpital Avicenne & Georges Pompidou), nous avons utilisé un oligonucléotide « CpG » développé dans le cadre d'un essai clinique pour des patients atteints d'un glioblastome.⁽³⁾ Cet oligonucléotide, que l'on dénommera Li28 dans la suite du manuscrit est composé de 26 nucléotides et sa structure primaire est décrite **Figure 1**.

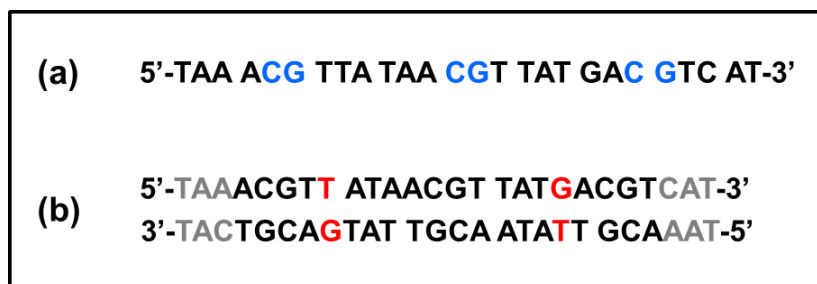


Figure 1 : (a) Structure primaire et (b) structure secondaire probable de Li28.

Li28 comporte trois motifs CpG, **Figure 1a** en bleu, et sa séquence nucléotidique permet de prévoir une structure secondaire en double hélice, **Figure 1b**, comportant des extrémités pendantes, **Figure 1b** en gris, et deux mésappariements GT, **Figure 1b** en rouge. L'oligonucléotide a été synthétisé avec un squelette entièrement phosphorothioate, par la société Avecia (Milford, Royaume Uni) et fourni en solution aqueuse à une concentration de 10 g.L⁻¹. Li28 a une masse molaire de 8920 g.mol⁻¹ (considérant un sodium par groupement phosphorothioate) et présente un coefficient d'absorption molaire (ϵ) de 271300 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (<http://www.ribotask.com/calculator.asp?PageID=40>).

II. COMPORTEMENT DE L'OLIGONUCLEOTIDE A PH ACIDE

La dépurination des acides nucléiques, hydrolyse de la liaison glycosidique entre les bases puriques et le sucre, est un évènement relativement fréquent dans des conditions physiologiques qui conduit à la formation d'un site abasique. Il a été montré, pour des oligonucléotides à squelette phosphodiester, qu'une accélération du processus induisant une coupure de la chaîne phosphodiester au niveau du site abasique, est observée lorsqu'on travaille à pH acide (pH = 5) et à une température élevée (90°C) pendant 6 heures.⁽⁴⁾ Les phosphorothioates, tels que Li28, sont connus pour être plus résistants vis-à-vis de la dégradation enzymatique que leurs homologues phosphodiester. Cependant leur hydrolyse acide a également été rapportée.⁽⁵⁻⁶⁾ Au vu de ces connaissances et sachant que notre protocole de complexation d'un oligonucléotide sur une particule de maghémite nécessite le passage par une phase acide (pH # 2,5, cf. **Chapitre 3**), nous avons dans un premier temps vérifié l'impact de ce traitement sur la fonctionnalité du Li28.

II.1. Influence du pH acide sur la structure de l'oligonucléotide Li28

Lorsqu'un oligonucléotide est soumis à des variations du pH, un certain nombre de modifications chimiques réversibles engendrées par la protonation/déprotonation au niveau de sites spécifiques sont observées.⁽⁷⁻⁸⁾ Ces modifications sont illustrées **Figure 2**.

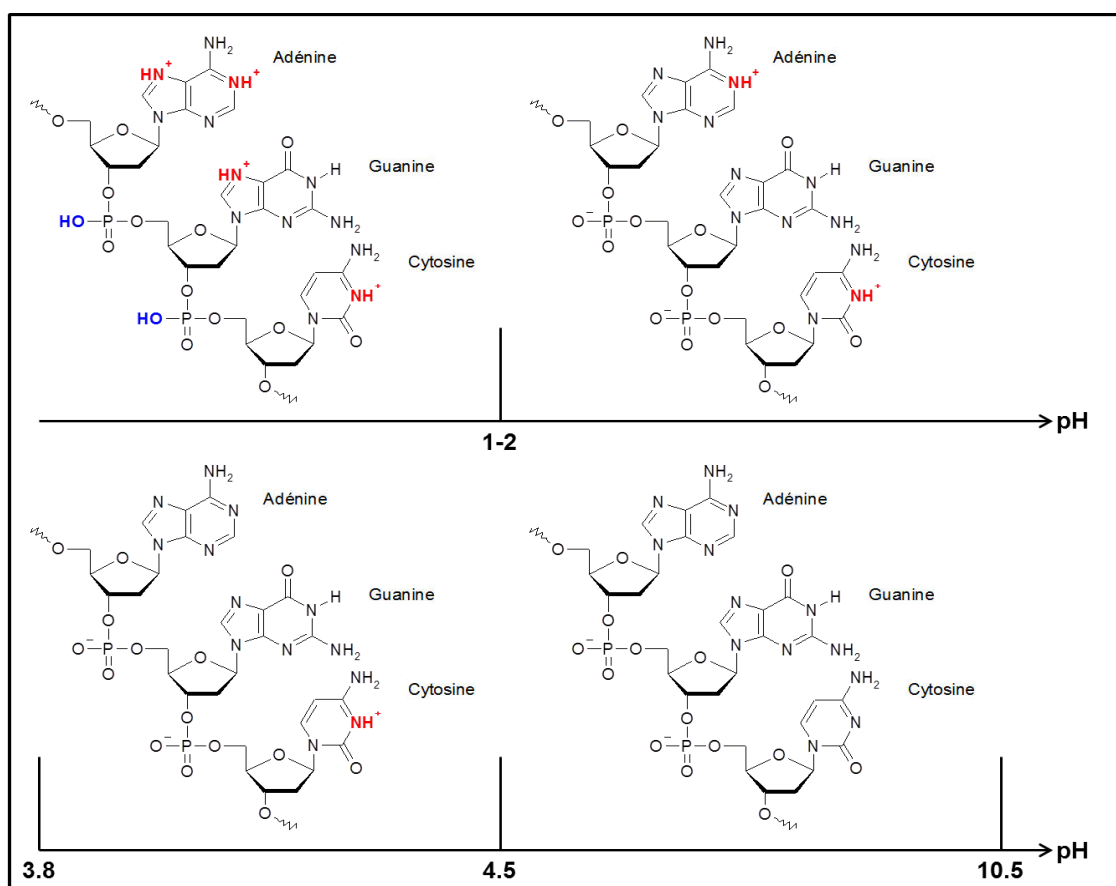


Figure 2 : Sites de protonation d'un acide nucléique en fonction du pH.

En ce qui concerne les bases azotées, les échanges de protons sont liés au caractère plutôt acide (N1 des adénines, N3 des cytosines, N7 des adénines et des guanines) ou au contraire plutôt basique (N1 des guanines, N3 des thymines) de certains atomes d'azote des hétérocycles. Pour un oligonucléotide phosphodiester, le pKa du N1 de l'adénine est estimé à 3.8 et celui du N3 des cytosines à 4.5. Le groupement phosphodiester quand à lui reste ionisé dans une large gamme de pH puisque l'on estime son pKa entre 1 et 2.⁽⁷⁾ Les valeurs de pKa présentées ici sont des valeurs approximatives qui peuvent être influencées par des modifications chimiques. On sait ainsi que la substitution d'un oxygène par un soufre dans un phosphorothioate va diminuer le pKa de ce groupement en augmentant la délocalisation de charge.⁽⁹⁾ Malgré quelques incertitudes sur les valeurs exactes des pKa, il est cependant raisonnable de penser que, dans nos conditions de complexation (pH # 2.5), adénines et cytosines seront sous une forme protonée similaire à celle que l'on peut voir en haut à droite de la **Figure 2**. La protonation de ces deux bases aura pour conséquence de diminuer le nombre de liaisons hydrogènes possibles avec la base complémentaire (**Figure 3**) et ainsi favoriser la dénaturation d'une structure en double hélice et ce d'autant plus rapidement dans des conditions de faible force ionique.

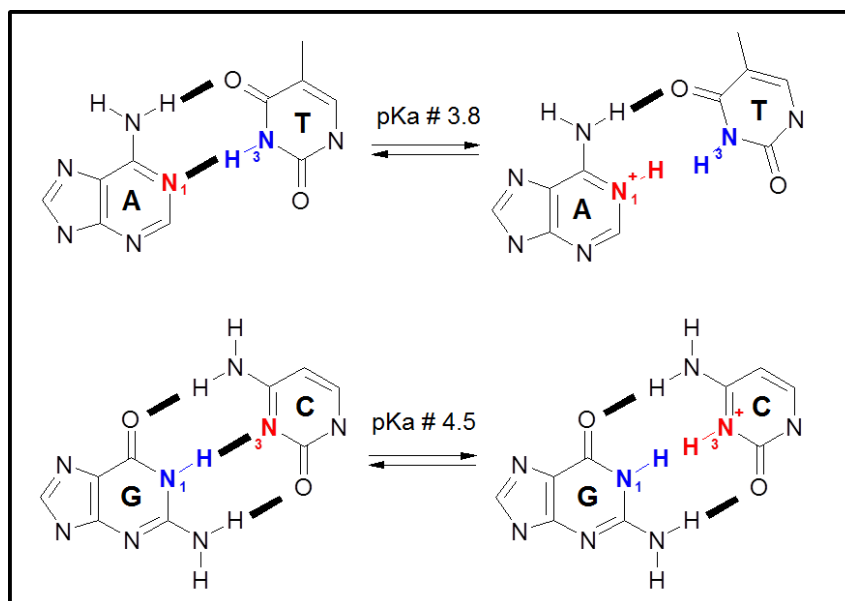


Figure 3 : Modification de l'appariement en fonction du pH.

II.2. Etude de la dégradation de Li28 à pH acide

II.2.1. Etude par spectroscopie UV

Nous avons vu précédemment que la spectroscopie d'absorption UV est une technique appropriée pour étudier les acides nucléiques et en particulier pour suivre des modifications structurales. Dans cette étude, l'oligonucléotide a été mis en solution dans l'eau à pH = 2,5 à une concentration de 3 μM puis placé dans une cuve en quartz pour un suivi de l'absorbance à 260 nm pendant 24 heures à température ambiante. L'évolution de l'absorbance au cours de cette période est présentée *Figure 4*.

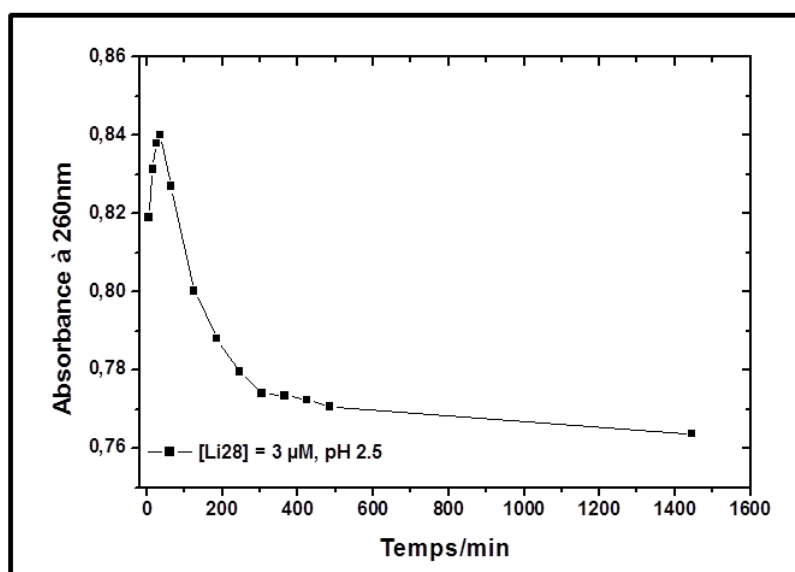


Figure 4 : Evolution de l'absorbance de Li28 à pH acide (pH = 2.5 ; [Li28] = 3 μM).

L'évolution de l'absorbance en fonction du temps peut être décomposée en trois phases :

- une légère augmentation pendant les 30 premières minutes
- ensuite une phase de décroissance jusqu'à $t = 5h$
- et enfin une stabilisation du phénomène.

Au bout de 24 heures, le pH de la solution a été remonté à 7,5 par ajout de 100 μL d'une solution d'hydroxyde de soude, soit une variation de volume de l'ordre de 10%. Le spectre UV de cette solution a été enregistré à $t = 120$ minutes. En parallèle, la même quantité de Li28 a été mise en solution à une concentration de 3 μM dans de l'eau à pH 7.5 (Ech 1). Les spectres des différentes solutions sont présentés **Figure 5**.

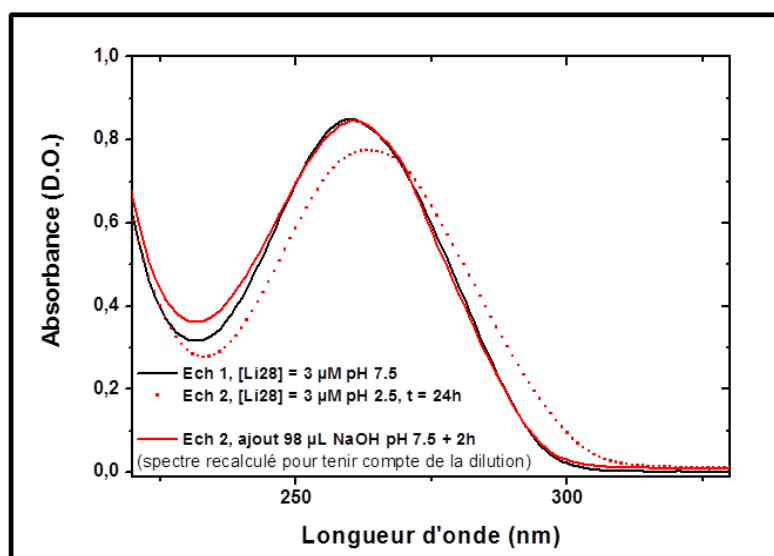


Figure 5 : Variations de l'absorbance à pH 2.5 et 7.5.

On peut remarquer que lorsque l'on remonte le pH de la solution acide à 7,5, (Ech 2, spectre rouge, trait plein), le spectre UV est quasiment identique, après correction de la dilution, à celui obtenu en plaçant directement l'échantillon à pH = 7,5, (Ech 1, spectre noir). On observe aussi que le spectre à pH acide présente un décalage du maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes.

Ces résultats doivent être interprétés en tenant compte de différents phénomènes : les variations de l'absorbance peuvent être dues à un changement de structure, une dénaturation de la double hélice, une dégradation de l'oligonucléotide ou encore une modification du coefficient d'absorption molaire suite à la protonation des bases azotées. La combinaison éventuelle de ces différents effets doit être également prise en compte. ^(7, 8, 10, 11)

La bande d'absorption dans l'UV des acides nucléiques est liée à la présence des hétérocycles constitutifs des bases purines et pyrimidiques (transitions électroniques entre les orbitales moléculaires π - π^*). De ce fait, le spectre UV reflète l'état électronique de ces hétérocycles et sera donc sensible aux variations de nombreux paramètres extérieurs liés aux conditions expérimentales ou à la structure de l'oligonucléotide. Ainsi, la structuration de l'acide nucléique en une double hélice, induisant un empilement des bases azotées, conduit à une modification de l'absorption. Toutes choses étant égales par ailleurs (solvant, concentration, force ionique, pH...), il a été montré que l'absorption d'un nucléotide isolé est supérieure à celle du même nucléotide engagé dans un oligonucléotide en simple brin qui est elle-même supérieure à celle du nucléotide engagé dans une double hélice, **Figure 6.**⁽⁷⁾

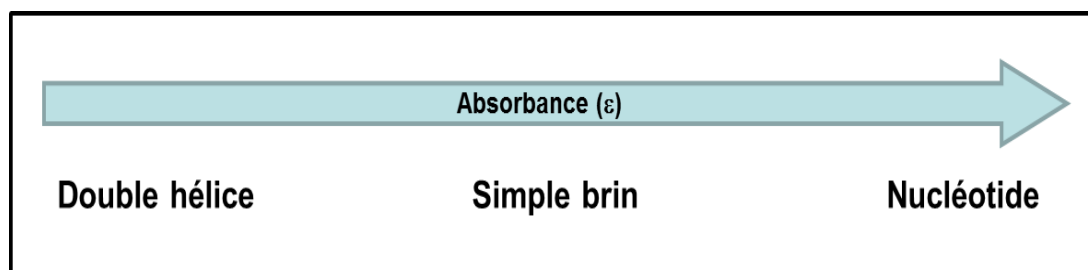


Figure 6 : Evolution de l'absorption en fonction de la structuration.

Outre la structure de l'acide nucléique, un autre facteur influençant son absorption en UV est le pH de la solution dans laquelle il est placé. Ces deux facteurs sont d'ailleurs étroitement liés. En effet, les modifications chimiques engendrées par la protonation/déprotonation de certains sites vont modifier la structure de l'oligonucléotide ainsi que la configuration électronique des hétérocycles avec comme résultats des variations de l'intensité d'absorption.

En tenant compte de ces différents paramètres, les résultats présentés **Figures 4&5** suggèrent que lorsque l'oligonucléotide est solubilisé en milieu acide, il se produit tout d'abord, 30 minutes dans nos conditions expérimentales, une ouverture de la structure en double hélice ce qui se traduit par une augmentation de l'absorbance (Cf. **Figure 6**). Au cours du temps, ($t \geq 30$ min), la protonation graduelle de tous les sites se traduit par une diminution de l'absorbance sur une période d'environ 4 à 5 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Zimmer sur un ADN⁽¹⁰⁾ et indiquent que Li28 ne semble pas dégradé en milieu acide. Ceci est conforté par le fait que le spectre UV obtenu après 24 heures en milieu acide et réajustement du pH à 7,5, est identique à celui de l'oligonucléotide lorsqu'il n'a subi aucun traitement.

Les résultats de cette étude permettent donc de démontrer que dans nos conditions expérimentales, aucune dégradation irréversible de la structure de Li28 n'est détectable par spectroscopie d'absorption UV. En effet, dans le cas contraire, on observerait une augmentation de l'absorbance liée à la coupure de l'ADN (libération de nucléotides libres), ou, dans le pire des cas, une diminution de l'absorbance lié à la destruction des hétérocycles. Cependant, afin de valider ce résultat par une autre méthode, l'étude de Li28 à pH acide a été menée par spectroscopie infrarouge.

II.2.2. Etude par spectroscopie IRTF

Comme dans le paragraphe précédent, Li28 a été analysé à pH 2,5 et 7,5 afin de déterminer si nos conditions expérimentales pouvaient entraîner des modifications irréversibles de sa structure primaire. Les spectres infrarouges enregistrés dans D₂O à une concentration en Li28 proche de 10 mM sont présentés **Figure 7** dans les zones caractéristiques de l'appariement des bases (1500-1750 cm⁻¹) et de la conformation du squelette (1000-1150 cm⁻¹).

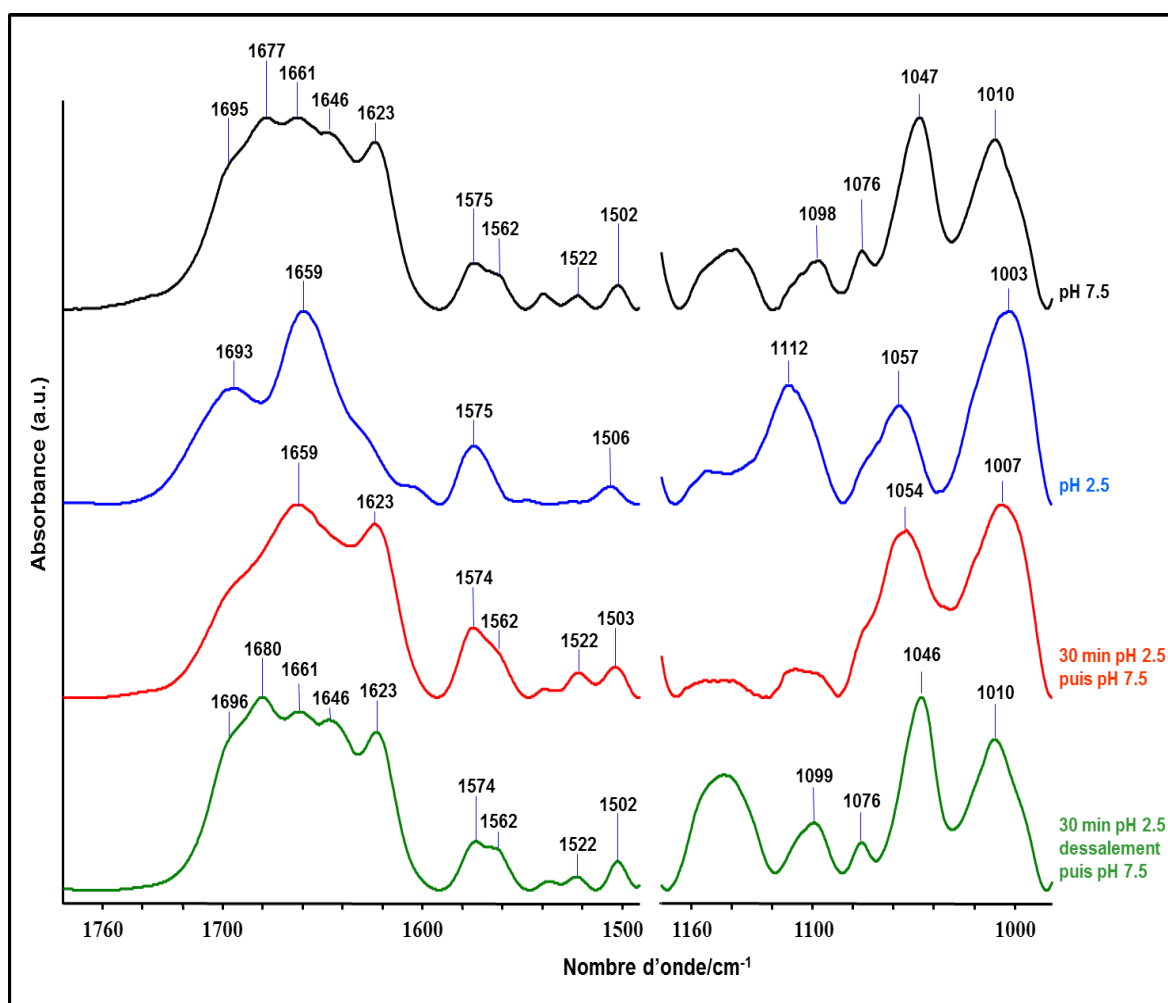


Figure 7 : Evolution du spectre infrarouge de Li28 en fonction du pH.

Le spectre de Li28 à pH 7,5 (haut, noir) est, pour ce qui est de la région caractéristique des vibrations des bases, très proche de celui attendu pour un oligonucléotide à squelette phosphodiester engagé dans une double hélice via des appariements de type Watson-Crick. On retrouve ainsi les bandes impliquant à 1695 cm^{-1} le C2=O2 des thymines, à 1677 cm^{-1} le C6=O6 des guanines, à 1661 cm^{-1} le C4=O4 des thymines, à 1646 cm^{-1} le cycle des thymines ainsi que le C2=O2 des cytosines et à 1623 cm^{-1} le cycle de l'adénine.⁽¹²⁾ Ce résultat n'est pas étonnant car hormis de sensibles variations du stacking, liées à la modification chimique influant notamment sur l'hydratation de la molécule, peu de bouleversements sont attendus dans les fréquences de vibrations reflétant l'appariement des bases.⁽¹³⁻¹⁴⁾ En revanche, et de manière attendue, des changements drastiques apparaissent dans la région caractéristique des vibrations du phosphate ($1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$), avec notamment des bandes d'absorption situées vers 1150 , 1098 et 1076 cm^{-1} (Cf. **Chapitre 3, Figure 22**). Ces modifications sont engendrées par différents phénomènes tels que : les différences de symétrie entre les groupements O-P-O et O-P-S, les modifications de la distribution de charge, la nature de la liaison entre les différents atomes (ordre, longueur). Ainsi, en raison de la différence de masse entre le soufre et l'oxygène, on s'attend à un déplacement de la fréquence de vibration de la liaison P-S vers les bas nombres d'onde ; celle-ci serait située vers 650 cm^{-1} selon certains auteurs.^(13, 15) Bien que l'on puisse supposer que les bandes d'absorption situées à 1047 et 1010 cm^{-1} soient dues à des vibrations des C-O du sucre (comme dans les phosphodiesters), le manque de données infrarouges dans la littérature concernant les phosphorothioates rend malheureusement très délicate leur attribution.^(12, 13, 15)

Après incubation de Li28 à pH 2,5 pendant plusieurs heures, une nuit, des modifications importantes du spectre IR sont observées, **Figure 7** spectre bleu. Dans la région spectrale allant de 1600 à 1700 cm^{-1} , seulement deux bandes larges, multi composantes, sont présentes vers 1693 et 1659 cm^{-1} . Ce résultat est compatible avec la littérature existante puisque d'après M. Tsuboi, à pH acide le spectre IR d'un oligonucléotide présente un déplacement général des bandes de l'adénine, de la guanine et de la cytosine vers les grands nombres d'onde.⁽¹⁶⁾ Ainsi, à pH 2,5 une forte bande de vibration du cycle de la cytosine est attendue à 1658 cm^{-1} de même qu'un déplacement de la bande du cycle de l'adénine de 1623 vers 1668 cm^{-1} . Le spectre de Li28 dans la région des vibrations des bases reflète donc bien, dans l'ensemble, les modifications attendues à ce pH faisant suite à la dénaturation de la double hélice et à la protonation des bases. De plus, dans la région spectrale allant de 1000 à 1150 cm^{-1} , on peut observer à pH 2,5 la disparition de la bande à 1047 cm^{-1} concomitamment à l'apparition d'une bande à 1057 cm^{-1} . Cette bande à 1057 cm^{-1} , insensible à l'hydratation, a déjà été observée à

pH = 7 dans un oligonucléotide en simple brin ⁽¹³⁾ et son déplacement vers les bas nombres d'onde pourrait donc être un marqueur infrarouge de la structuration en double hélice d'un phosphorothioate.

Pour déceler une éventuelle dégradation de Li28 dans nos conditions de complexation, l'oligonucléotide a été incubé à pH 2,5 pendant 30 minutes. Après ce délai, le pH de la solution a été remonté à 7,5 par ajout de NaOH et dans une deuxième étape, l'échantillon a été dessalé par ultracentrifugation sur membrane afin d'enlever l'excès de sel (NaCl) formé suite à la réaction de neutralisation. Les spectres de Li28, à pH 7.5, avant (rouge) et après dessalement (vert) sont présentés **Figure 7**. On remarque que lorsque l'on remonte le pH de la solution à 7,5 (spectre rouge), on ne retrouve pas le spectre initial de Li28 (noir). Le spectre obtenu est plutôt représentatif d'un oligonucléotide dénaturé comme le confirme la bande à 1054 cm^{-1} . Outre le fait qu'une dégradation de Li28 puisse être envisagée, une explication possible de ce phénomène peut-être apportée en considérant le mode opératoire de préparation de l'échantillon pour l'analyse infrarouge. En effet, pour des raisons pratiques, 250 μL d'une solution contenant environ 1 à 2 μmole de NaCl et 15 nmole de Li28 sont dans un premier temps évaporés sous air sec (P et T ambiante). Lors de cette phase d'évaporation, le sel et l'oligonucléotide présent dans l'échantillon sont progressivement concentrés au-delà du seuil de solubilité et cristallisent. Lorsque l'échantillon est sec, il est « repris » dans 1.5 μL de D_2O et le spectre est enregistré rapidement pour éviter l'évaporation. Il est possible que dans de telles conditions, l'oligonucléotide ne se réhydrate pas complètement ou que des interactions salines non spécifiques interviennent, bloquant ainsi la reformation de la structure en double hélice. Cette théorie est d'ailleurs confortée par le fait que lorsque l'échantillon a été dessalé, les spectres de Li28 avant et après passage à pH acide sont très similaires, **Figure 7** spectres noirs et verts respectivement, même si l'on observe une légère différence dans la zone spectrale caractéristique du C6=O6 des guanines (1677 et 1680 cm^{-1}). Cette petite différence peut-être d'ailleurs elle aussi expliquée, en tenant compte de la disparité des ions sodium présents dans l'échantillon au moment du spectre. En effet, l'ion Na^+ en diminuant les répulsions entre les charges négatives portées par les groupements phosphorothioates, va contribuer à la stabilité de la structure en double hélice en permettant un plus grand stacking.

En conclusion, cette étude par spectroscopie infrarouge ne révèlent pas de modifications significatives de la structure de Li28 après traitement en milieu acide, en accord avec l'étude par spectroscopie UV. Ainsi la dégradation de l'oligonucléotide, suite à son incubation à pH 2,5 pendant 30 minutes ne semble pas se produire. Afin de conforter, ou non, ses résultats, une étude par électrophorèse sur gel d'agarose a été également effectuée.

II.2.3. Etude par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet de séparer des acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. La séparation s'effectue sous l'effet d'un champ électrique, par migration de l'acide nucléique chargé négativement à travers le gel. Selon l'intensité du champ électrique appliqué, les molécules migreront plus ou moins loin en fonction de leur taille et de leur charge. On voit ainsi, que lorsqu'un acide nucléique est dégradé, il migre plus rapidement que si sa structure primaire est intacte. De même, un oligonucléotide se migrera plus rapidement à travers le gel s'il est en simple brin que s'il est apparié en une double hélice.

Dans notre étude, la visualisation de l'acide nucléique au sein du gel est réalisée en utilisant le bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN dont la présence peut être détectée grâce à son émission de fluorescence sous éclairage UV. Cette molécule aromatique, chargée positivement, est relativement hydrophobe. Lorsqu'elle est mise en solution avec un acide nucléique, elle va venir s'intercaler entre les bases, probablement en augmentant l'écartement entre les plateaux formés par les bases et en chassant des molécules d'eau, ce qui va induire une exaltation de fluorescence d'un facteur 20.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Il a aussi été montré que l'affinité du BET était beaucoup plus importante pour une structure en double hélice que pour un simple brin.⁽²⁰⁾ Ainsi de par la spécificité d'interaction du BET vis-à-vis de l'ADN double brin, cette technique s'avère être une méthode complémentaire et discriminante pour étudier la dégradation des acides nucléiques. Dans le cas d'une dégradation de l'acide nucléique, on s'attend donc à une diminution de l'intensité de fluorescence du BET.⁽²¹⁾

Comme lors des études par spectroscopies, Li28 a été soumis pendant des périodes plus ou moins longues à différentes conditions de préparation (pH, salinité...) afin d'étudier les conséquences éventuelles sur ses propriétés de migration au sein d'un gel d'agarose 1% et de les corrélérer à une possible dégradation de l'oligonucléotide. Cinq conditions différentes de préparation de Li28 ont été testées et les expériences ont été menées avec 1 µg de Li28 dans chaque puits avec une tension appliquée de 80 V dans un tampon d'élution TBE (Tris-Borate-EDTA). Le premier puits, S1, contenait du Li28 n'ayant subi aucun traitement particulier, la référence, le second puits, S2, du Li28 dans une solution de NaCl 100 mM. Pour les 3^{ème} et 4^{ème} puits, Li28 a été incubé dans une solution HCl 0.1 M pendant 1 minute, S3, ou 3h30, S4, puis neutralisé par une solution NaOH 0.1M. Finalement, pour le dernier puits, S5, Li28 a été incubé pendant 30 minutes à pH 2,5 puis le pH a été remonté à 7,5 et la solution dessalée par ultrafiltration sur membrane (même échantillon que celui passé en infrarouge, spectre vert **Figure 7**). Les résultats de cette étude sont présentés **Figure 8**.

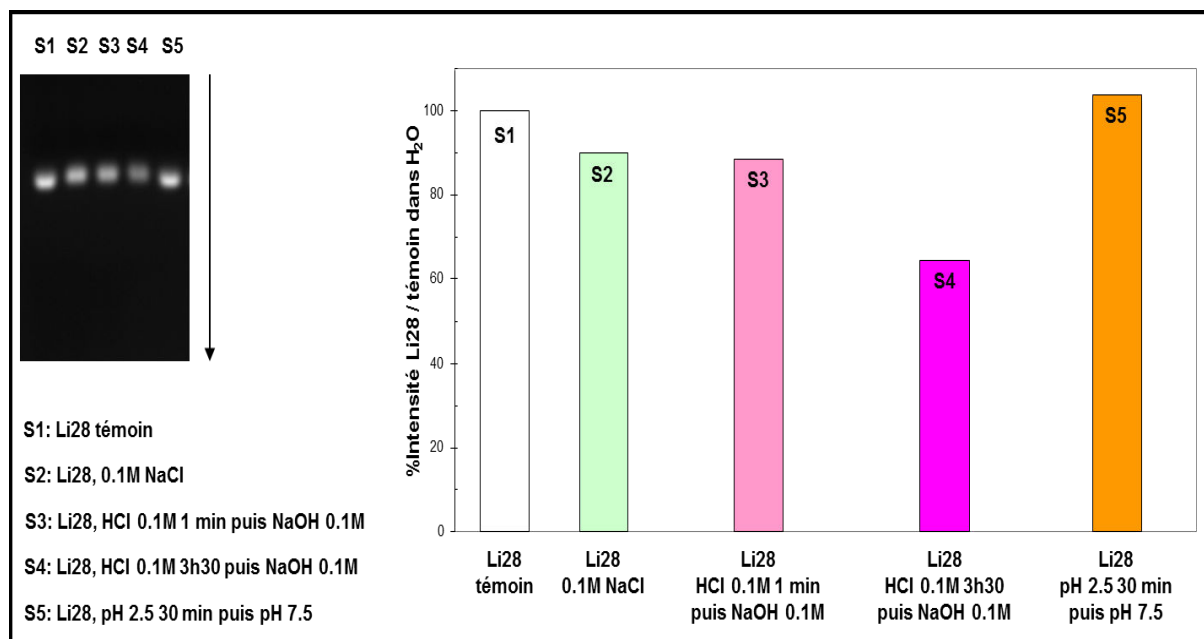


Figure 8 : Evolution de la fluorescence du complexe Li28/BET en fonction du pH.

Comme on peut le voir **Figure 8**, cette technique est relativement sensible aux conditions expérimentales, puisque l'on observe une différence d'intensité de fluorescence de l'ordre de 10% lorsque Li28 est dilué dans de l'eau pure, S1, ou une solution saline NaCl 0.1 M, S2. Quand Li28 est mis en solution à un pH de l'ordre de 1 pendant une minute puis que la solution est neutralisée par de la soude, S3, on s'aperçoit que la fluorescence du complexe ne varie pratiquement pas, si on la compare à une solution témoin de Li28 de même salinité, S2. De même, lorsque Li28 est placé dans nos conditions expérimentales de complexation sur les particules de maghémite, S5, la fluorescence du complexe Li28/BET reste proche de celle du témoin, S1. En revanche, lorsque l'oligonucléotide est soumis à un pH de l'ordre de 1 pendant un temps plus long, ici 3h30, on observe clairement une diminution de la fluorescence de l'ordre de 25 %.

Les expériences d'électrophorèse, montrent que dans nos conditions expérimentales, 30 minutes à pH 2,5, aucune détérioration de la structure primaire de l'oligonucléotide n'est observée. En revanche, ces expériences montrent également que lorsque Li28 est placé dans des conditions plus drastiques, pH = 1 pendant 3h30, une détérioration importante de l'oligonucléotide se produit.

L'ensemble des résultats obtenus par spectroscopie et par électrophorèse ont conforté notre choix d'utiliser la stratégie décrite au Chapitre 3 pour la complexation d'un oligonucléotide phosphodiester à la surface des nanoparticules de maghémite, afin de la transposer à la complexation du Li28.

III. COMPLEXATION DE LI28 SUR DES PARTICULES DE MAGHEMITE

Le processus de fonctionnalisation de Li28 sur des nanoparticules de maghémite est basé sur l'approche électrostatique développée au Chapitre 3 en tirant profit des charges opposées portées par les groupements phosphorothioates et les nanoparticules à pH 2,5. Il est à noter que des tentatives de complexation de Li28 à pH 4 et à pH 10 ont démontré de faibles rendements de complexation (# 15%).

III.1. Fonctionnalisation

La synthèse des nanoparticules de maghémite et la fonctionnalisation de la surface des particules par Li28 sont réalisées selon les mêmes modes opératoires que ceux décrits au Chapitre 3. Les particules synthétisées par voie micellaire présentent un diamètre moyen de 10 nm. Pour réaliser la fonctionnalisation de surface, les nanoparticules sont tout d'abord solubilisées dans 500 μ L d'eau à pH = 2 à une concentration en fer de 11 mM et soumises à sonication pendant 30 minutes. Afin d'estimer la quantité maximale d'oligonucléotide que l'on peut complexer sur une nanoparticule de 10 nm, 7 complexes ont été préparés avec un nombre constant de nanoparticules (NP) et des quantités croissantes de Li28, caractérisés par le ratio $R = \text{Li28/NP}$. Nous avons fait varier ce ratio de façon à avoir en solution de 8,75 à 175 brins d'ADN par nanoparticule soit $R = 8,75 ; 17,5 ; 35 ; 52,5 ; 70 ; 87,5$ et 175. Différentes quantités d'oligonucléotide ont donc été diluées chacune dans 500 μ L d'eau à pH = 7. L'acide nucléique est ensuite ajouté aux nanoparticules cationiques et la complexation est réalisée à température ambiante sous agitation circulaire pendant 30 minutes. Dans ces conditions, le pH de la solution après mélange est d'environ 2,5 et la concentration en fer égale à 5,5 mM pour des concentrations en Li28 variant de 2,5 à 50 μ M, **Figure 9**. Un phénomène de floculation/sédimentation, apparaît au bout de 5 minutes pour les ratios $R < 70$ (**Figure 9**).

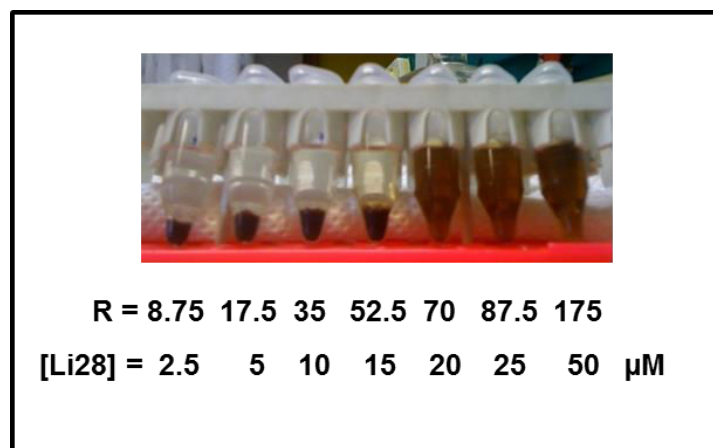


Figure 9 : Complexation de Li28.

Après 30 minutes de complexation, les nanocomplexes sont centrifugés pendant 30 minutes et les tubes mis sur aimant afin de récupérer le surnageant et ainsi éliminer l'oligonucléotide n'ayant pas réagi. Finalement les complexes ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28}$) sont dilués dans 1 mL d'eau ultrapure, soit une concentration en fer proche de 5,5 mM, et le pH est ajusté à 7,5 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium.

III.2. Caractérisation des complexes et des surnageants

III.2.1. Caractérisation des surnageants

Comme nous l'avons vu au Chapitre 3, le dosage UV des surnageants permet d'évaluer le rendement de complexation et d'estimer le nombre d'oligonucléotides greffés par nanoparticule. Le dosage UV-Visible des différents surnageants a été effectué à pH acide directement après la complexation et les spectres sont présentés *Figure 10*.

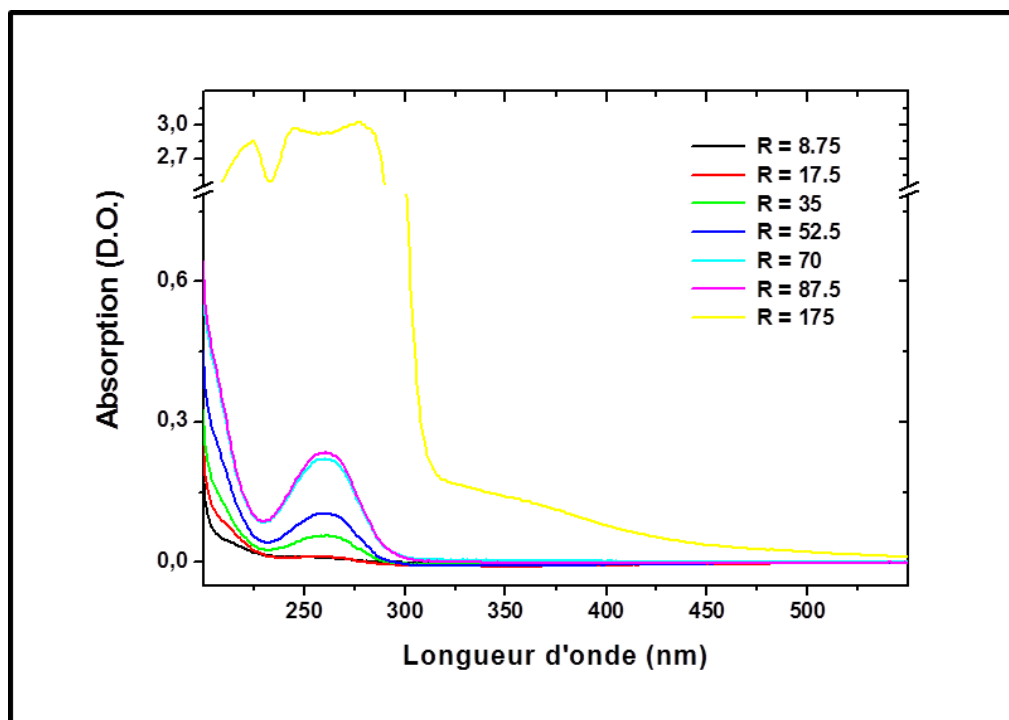


Figure 10 : Dosage UV des surnageants.

La quantité de Li28 présente dans le surnageant augmente avec les valeurs de R. Cependant jusqu'à R = 87,5 la quantité de Li28 n'ayant pas été complexé reste faible et l'on obtient des rendements de complexation supérieur à 95%. Pour R = 175, il ne nous a pas été possible de calculer un rendement en raison de la présence de particules dans le surnageant (forte absorption à 350 nm spectre jaune). Les rendements de complexation ainsi qu'une estimation du nombre moyen de Li28 par nanoparticule sont présentés *Tableau 1*.

	R						
	8.75	17.5	35	52.5	70	87.5	175
Rendement %	98.3	98.9	98	98.1	95.9	96.7	-
Li28/particule	8.6	17.3	34.3	51.2	67.1	84.6	-

Tableau 1 : Rendement de complexation et nombre moyen de Li28 par particule.

III.2.2. Caractérisation des complexes

Spectres UV-Visibles des complexes

Les spectres UV-Visibles des nanocomplexes obtenus aux différents rapports R sont présentés **Figure 11(A)** après normalisation à 350 nm.

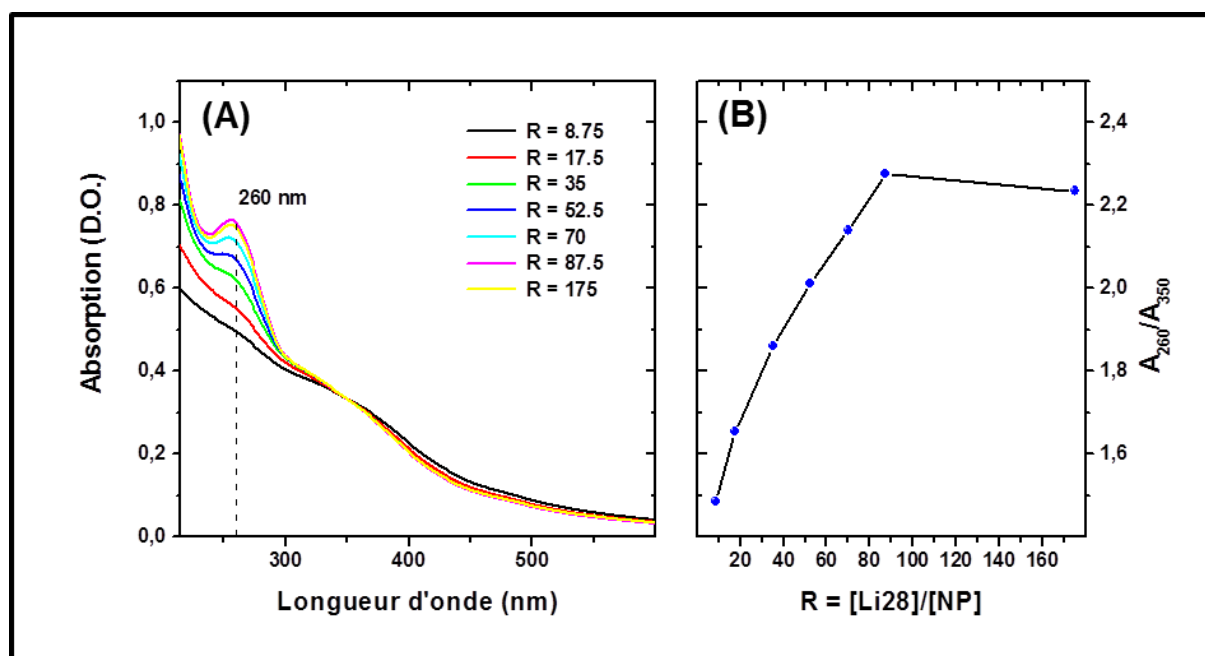


Figure 11 : (A) Spectres UV-Visible, normalisés à 350 nm, des nanocomplexes pour différentes valeurs de R ; (B) évolution du rapport A_{260}/A_{350} en fonction de R.

Comme lors de la complexation du dODN phosphodiester (Cf. **Chapitre 3**), on observe une augmentation de l'absorption à 260 nm au fur et à mesure que R augmente. L'évolution du ratio A_{260}/A_{350} en fonction de R est représentée **Figure 11(B)**. On peut remarquer que ce ratio, qui rend compte du nombre d'oligonucléotide par particule, croît de façon quasi linéaire quand R augmente et ce jusqu'à environ 87 Li28 par nanoparticule. Au-delà de cette valeur, un phénomène de saturation est observé. Ce résultat confirme les rendements de complexation obtenus en analysant directement les surnageants et démontre qu'aussi bien avec un

oligonucléotide phosphodiester qu'avec un squelette phosphorothioate, il est possible de contrôler le nombre d'oligonucléotides complexés à la surface d'une nanoparticule d'oxyde de fer.

Diamètre hydrodynamique et potentiel Zêta

Des mesures de diamètre hydrodynamique, par diffusion dynamique de la lumière, et de potentiel zêta ont été effectuées sur les différents complexes à l'aide du système « Zetasizer Nano ZS » (*Annexe II*, III. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)). Les résultats obtenus dans l'eau à pH 7,5 pour une concentration en fer de $5.10^{-4}M$ sont présentées **Tableau 2**.

	R						
	8.75	17.5	35	52.5	70	87.5	175
D_h(nm)	135	89	59	55	53	55	56
Z(mV)	-42	-43	-45	-54	-54	-57	-48

Tableau 2 : Valeurs du diamètre hydrodynamique (D_h , Z-Average) et du potentiel zêta (Z) mesurées dans l'eau (pH 7,5) des différents complexes à une concentration en fer de $5.10^{-4}M$.

Rappelons, qu'en l'absence de fonctionnalisation, les nanoparticules de maghémite sont très peu chargées à pH 7.5 et de ce fait ont une stabilité colloïdale très faible qui conduit à une agrégation et une sédimentation rapide de l'échantillon.

Si l'on s'intéresse à l'évolution du diamètre hydrodynamique des complexes formés avec Li28, on s'aperçoit que celui-ci décroît rapidement de R = 8,75 à 35 puis semble se stabiliser aux alentours de 55 nm pour les dernières valeurs de R, **Tableau 2**. Concernant le potentiel zêta, les valeurs obtenues sont, dans l'ensemble, elles aussi cohérentes puisque l'on observe une augmentation, en valeur absolue, du potentiel jusqu'à R = 87,5, **Tableau 2**. Ainsi la valeur fortement négative (< -40 mV) mesurée pour tous les complexes est une indication de la fonctionnalisation des nanoparticules par Li28.

L'ensemble de ces résultats va donc dans le sens d'un renforcement de la stabilité colloïdale des nanocomplexes $\gamma Fe_2O_3@Li28$ au fur à mesure que R croît. Ceci est dû à l'augmentation de la densité de Li28 à la surface des nanoparticules, comme l'ont montré les mesures de diamètre hydrodynamique et de potentiel zêta ainsi que les spectres UV des différents complexes et des surnageants.

III.3. « Décrochage » de Li28 et étude de la dégradation

En complément de l'étude sur la dégradation de Li28 à pH acide, nous avons voulu vérifier si l'oligonucléotide pouvait se dégrader dans les conditions « complètes » de complexation, i.e. en présence des nanoparticules d'oxyde de fer. Pour cela, nous avons préparé un complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@Li28}$ avec le rapport $R = 70$ en utilisant les conditions de complexation décrites précédemment (§ III.1.). Nous avons ensuite mis au point un protocole permettant le relargage de l'oligonucléotide dans des conditions minimisant sa dégradation. Pour ce faire, le complexe a été dilué dans une solution saline, 150 mM NaCl pH 7,1, et incubé sous agitation circulaire à température ambiante pendant 3 jours. La solution a alors été centrifugée pendant 3 heures et le surnageant séparé du complexe à l'aide d'un aimant. En procédant de la sorte, nous avons estimé qu'environ 60% de Li28 s'était décroché des nanoparticules. L'oligonucléotide a finalement été dessalé par ultracentrifugation sur membrane pour être étudié par spectroscopie infrarouge et par électrophorèse afin de déterminer une hypothétique dégradation liée aux conditions de complexation.

Les spectres infrarouges de Li28 avant complexation et après relargage sont présentés *Figure 12* dans la région spectrale caractéristique de l'appariement des bases.

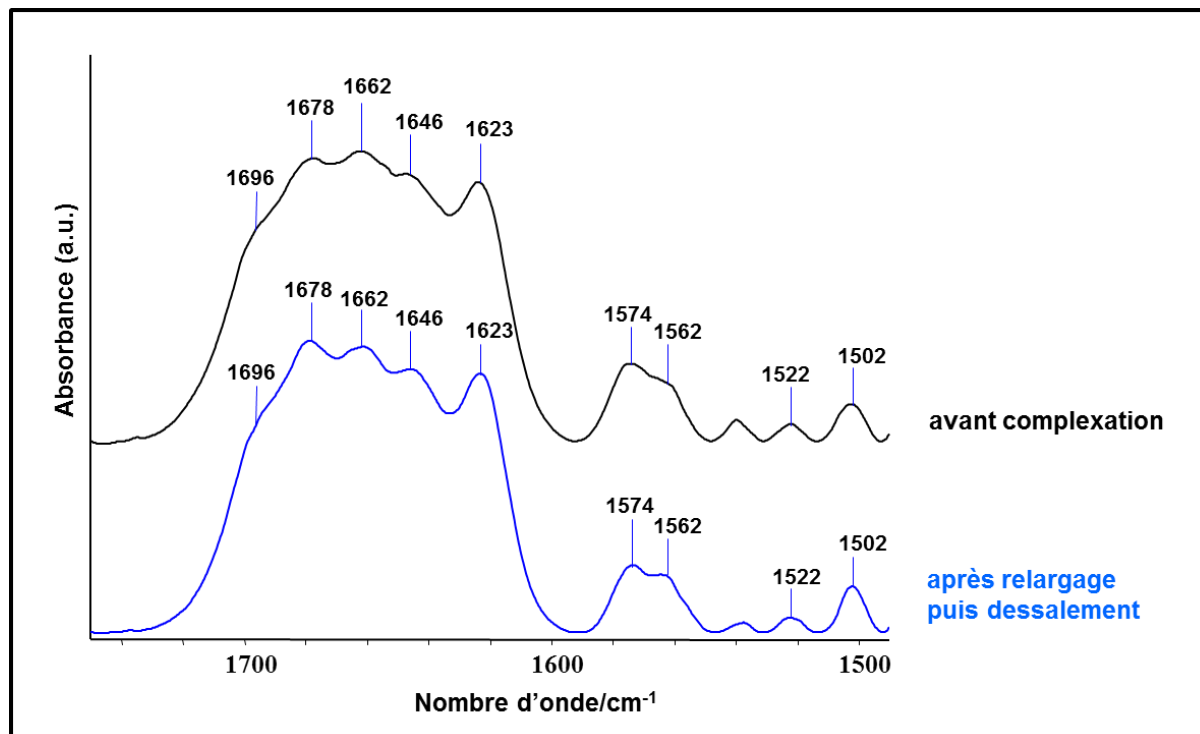


Figure 12: Spectres infrarouges de Li28 avant (noir) et après (bleu) complexation (pH 7,5).

Le spectre de l'oligonucléotide après son relargage de la surface de la nanoparticule (spectre bleu) est quasiment identique à celui de Li28 avant la complexation (spectre noir). Même si il est difficile par spectroscopie infrarouge de déceler des coupures de la chaîne phosphorothioate à la seule étude de cette région spectrale, nous pouvons constater que les bandes caractéristiques de l'appariement de Li28 restent inchangées après le relargage ce qui suggère que les bases n'ont pas été dégradées lors de la complexation. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons fait migrer l'oligonucléotide, récupérer après relargage, sur un gel d'agarose dans les mêmes conditions que précédemment (§ II.2.3.). Le premier puits contenait une solution de Li28 n'ayant subi aucun traitement, S1, pour les 2^{ème} et 3^{ème} puits Li28 a été incubé dans les conditions de complexation en absence, S2, ou en présence, S3, de nanoparticules de maghémite puis le pH a été remonté à 7,5 et la solution dessalée par ultracentrifugation sur membrane. Les résultats de cette étude sont présentés **Figure 13**.

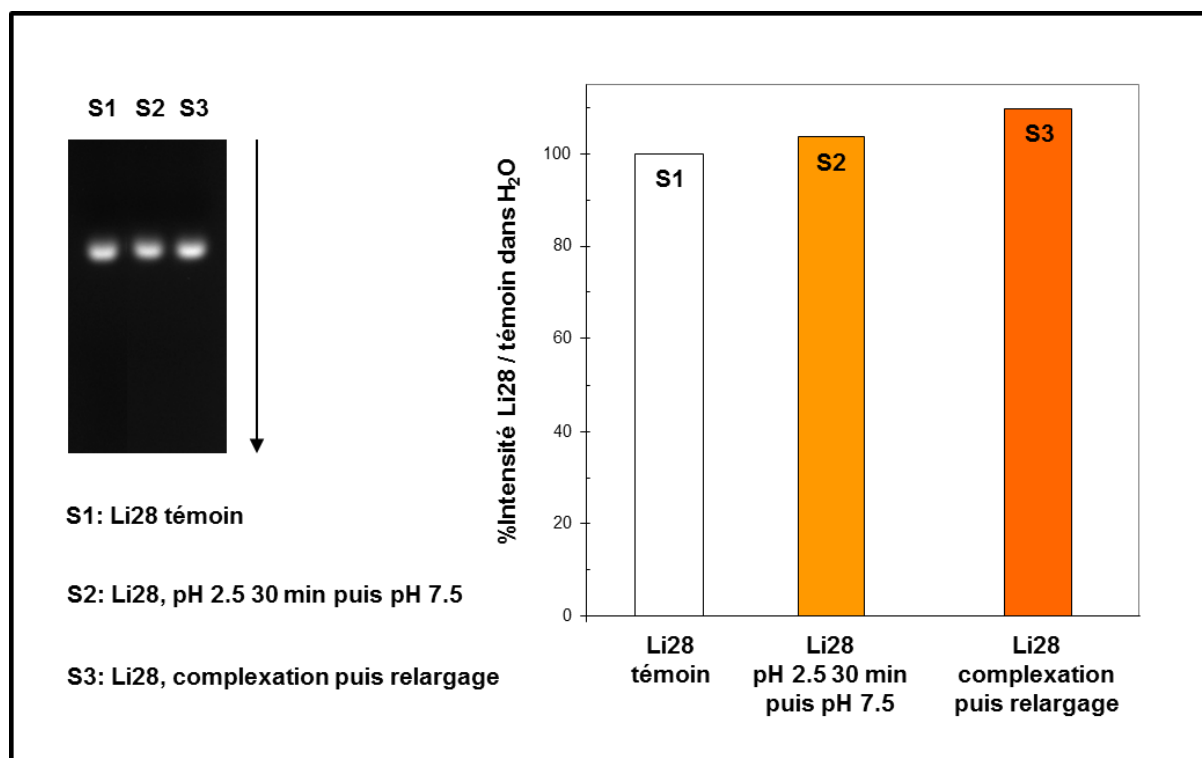


Figure 13 : Etude par électrophorèse sur gel d'agarose 1% de la dégradation de Li28 en conditions de complexation.

Lorsque l'on compare les intensités de fluorescence entre les trois puits, S1 à S3, on ne constate que de légères différences n'allant pas dans le sens d'une dégradation de l'oligonucléotide. Les résultats obtenus par électrophorèse confirment donc que dans les conditions de complexation utilisées, aucune dégradation importante de la structure primaire de Li28 n'est observée, y compris en présence de nanoparticules de maghémite.

Compte tenu des résultats encourageants obtenus lors la complexation de Li28 à la surface de nanoparticules de maghémite, nous avons ensuite abordé la deuxième étape de ce projet, en essayant d'utiliser cette plateforme anionique pour la complexation d'un peptide cationique.

IV. COMPLEXATION DE LI28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIE PAR ETAPES

IV.1. Le peptide Arg₁₅

Le peptide Arg₁₅ que nous avons utilisé pour la suite de ce projet est schématisé *Figure 14*.

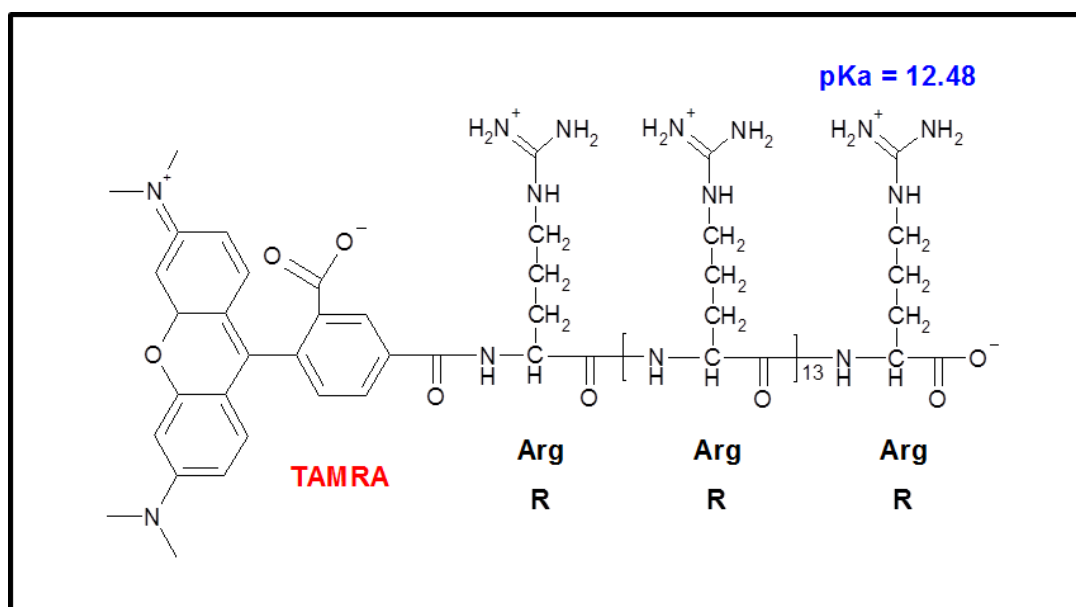


Figure 14: Structure primaire du peptide Arg₁₅ à pH 7.

Ce peptide est porteur d'un groupement fluorophore (TAMRA : 5(6)-carboxytetramethylrhodamine) à l'une de ses extrémités et les groupements guanidinium de sa chaîne latérale vont lui conférer une charge nette positive, dans une large gamme de pH, en raison de leur pK de l'ordre de 12,5. Compte tenu de l'ensemble des groupements ionisables de la molécule, on peut estimer qu'à pH = 7, le peptide sera porteur d'une charge nette, positive, proche de 14. En considérant que le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28}$, de par la présence de nombreux groupements phosphorothioates, a un potentiel zêta fortement négatif à pH = 7, *Tableau 2*, nous avons, dans un premier temps, envisagé une méthode de fonctionnalisation relativement simple basée sur les attractions électrostatiques qui doivent s'exercées entre le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28}$ et le peptide Arg₁₅.

IV.2. Fonctionnalisation de la surface par une stratégie dite par étape

Le schéma de fonctionnalisation est présenté *Figure 15*.

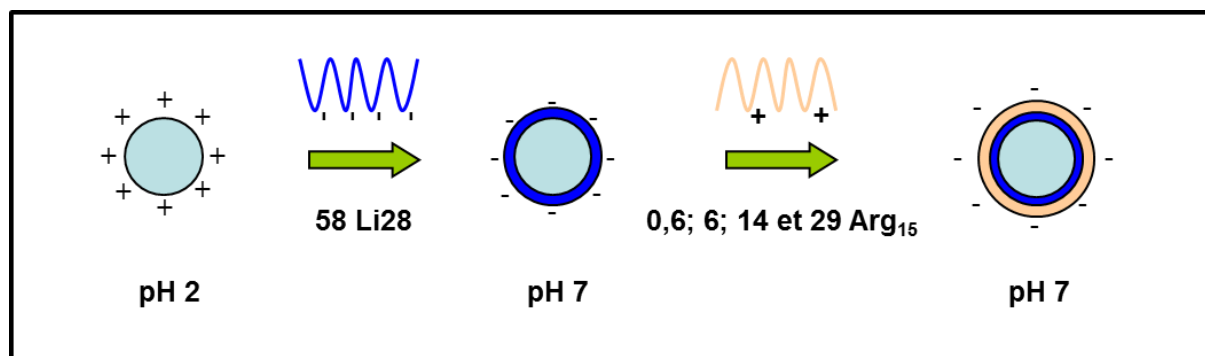


Figure 15: Schéma de fonctionnalisation du complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28$ par Arg₁₅.

Dans une première étape, le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28$ avec environ 58 brins de Li28 par nanoparticule est synthétisé en utilisant les conditions décrites précédemment (§ III.1.). Les nanoparticules sont ensuite mises en solution à pH = 7 dans 500 μL d'eau à une concentration en fer de 2.7 mM et un volume équivalent d'une solution contenant le peptide Arg₁₅ est ajouté. La fonctionnalisation a été réalisée avec des concentrations différentes en peptide de manière à avoir en solution 0,6 ; 6 ; 14 ou 29 brins d'Arg₁₅ par nanoparticule pour une concentration finale en fer égale à 1,3 mM. Les mélanges sont laissés sous agitation pendant 16 heures, puis centrifugés pendant 60 minutes et le surnageant est séparé des nanocomplexes à l'aide d'un aimant. Afin de disposer d'une référence pour les différentes caractérisations, une solution de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28$, à une concentration en fer égale à 1,3 mM, a subi les mêmes étapes d'agitation, centrifugation et séparation. Les spectres de fluorescence et d'absorption dans l'UV-Visible des complexes et des surnageants ont ensuite été enregistrés afin de caractériser la réaction.

IV.3. Caractérisation des complexes et des surnageants

IV.3.1. Spectres UV-Visibles des surnageants

Les spectres UV-Visibles des surnageants sont présentés *Figure 16*.

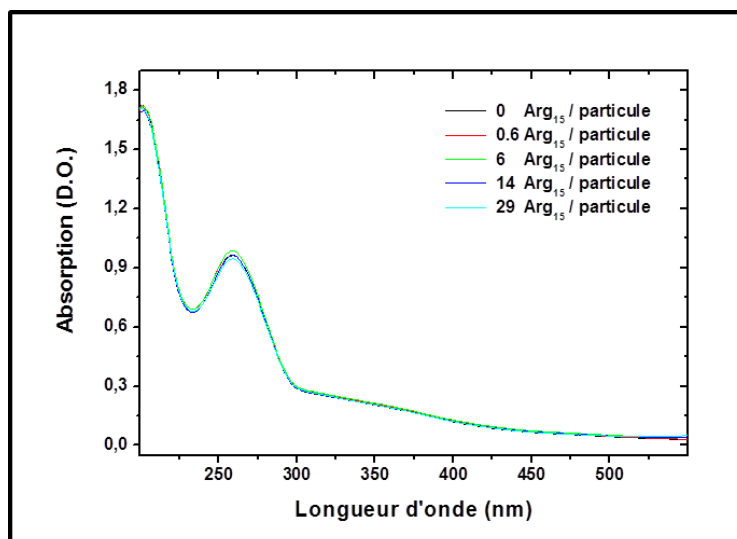


Figure 16 : Spectres UV-Visibles des surnageants.

Lorsque l'on compare les spectres UV des surnageants après fonctionnalisation par le peptide, **Figure 16**, à ceux de la simple complexation par Li28, **Figure 10**, on s'aperçoit qu'une quantité importante d'oligonucléotide se décroche lors de la deuxième étape de fonctionnalisation par Arg₁₅ (forte absorption à 260 nm). Nous avons alors essayé d'estimer la quantité de Li28 qui s'est décrochée des nanoparticules en utilisant la valeur de l'absorption à 260 nm. Compte tenu de la présence, en quantité non négligeable, de particules dans le surnageant (forte absorption à 350 nm), nous avons dû pour cela soustraire l'absorption liée à la maghémite de la valeur de l'absorption totale ($A_{\text{Li28}(260)} = A_{(260)} - A_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(260)}$). La part de l'absorption due à la maghémite à 260 nm a été obtenue d'après le rapport $A_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(260)} = A_{(350)}/0,59$ à partir d'un spectre de nanoparticules « nues » à pH acide. Cette estimation, grossière, obtenue en retranchant l'absorption de la maghémite, nous a permis d'évaluer la perte en Li28 à environ 60%.

IV.3.2. Spectres de fluorescence des complexes et des surnageants

Pour tenter d'estimer la quantité de peptide Arg₁₅ fixé au complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28$ nous avons tiré parti de la présence du fluorochrome TAMRA associé au peptide. Ce dernier, lorsqu'il est excité à 540 nm présente un maximum d'émission situé aux alentours de 575 nm. La **Figure 17** montre les spectres d'émission de fluorescence et la droite de calibration associée, lorsqu'on utilise les mêmes concentrations en Arg₁₅ que celles employées pour l'expérience de complexation du peptide sur le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28$ (§ IV.1.). En conséquence on peut lire directement sur la courbe de droite l'intensité de fluorescence attendue, au maximum, pour chacun des complexes.

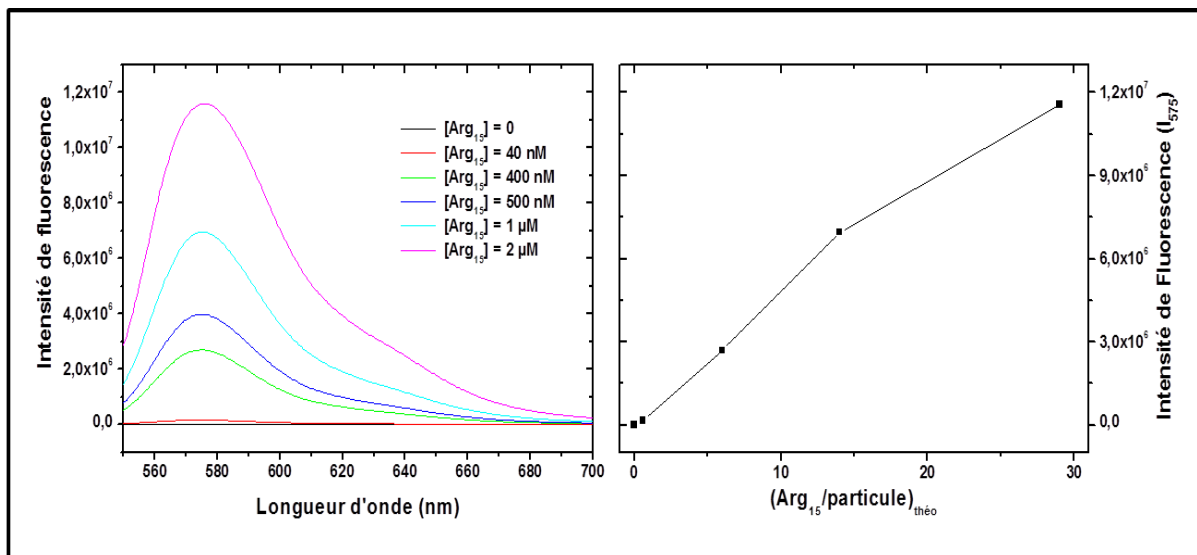


Figure 17 : Spectres d'émission de fluorescence et droite de calibration du peptide Arg₁₅.

Les spectres d'émission de fluorescence des surnageants ont été enregistrés et leur intensité de fluorescence à 575 nm est reportée sur la **Figure 18**.

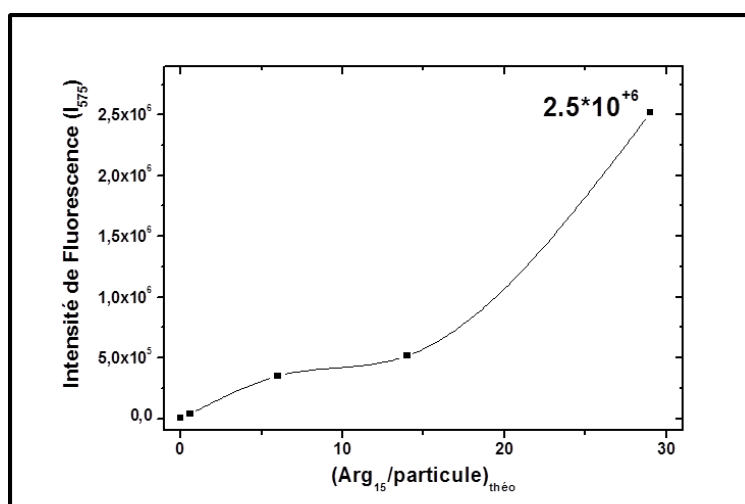


Figure 18 : Intensité de fluorescence des surnageants des différents complexes.

Comme on peut le voir sur cette figure, la quantité de fluorophore présente dans le surnageant augmente parallèlement à la quantité initiale de peptide ajoutée lors de la réaction de complexation ((Arg₁₅/particule)_{théo}). Une estimation de la quantité de peptide liée aux nanoparticules peut être déduite à partir de l'intensité de fluorescence des peptides introduits initialement $I(575)_{\text{référence}}$, **Figure 17**, et l'intensité de fluorescence mesurée dans le surnageant $I(575)_{\text{surnageant}}$, **Figure 18**. Les valeurs du nombre de brins de peptide complexés à une nanoparticule ((Arg₁₅/particule)_{exp}) sont données dans le **Tableau 3**.

	$(\text{Arg}_{15}/\text{particule})_{\text{théo}}$				
	0	0.6	6	14	29
$I(575)_{\text{réf}}^{\text{érence}}$	634	162412	2696846	6955154	11566720
$I(575)_{\text{surnageant}}$	3594	41910	352010	518860	2519600
$(\text{Arg}_{15}/\text{particule})_{\text{exp}}$	-	-	5	13	23

Tableau 3 : Estimation du nombre de brins de peptide Arg_{15} par particule.

L'analyse des surnageants montre ainsi que des quantités croissantes de peptides sont complexées lorsque la quantité introduite initialement augmente.

Nous avons ensuite enregistré les spectres d'émission de fluorescence des complexes et leur intensité de fluorescence à 575 nm est reportée **Figure 19**.

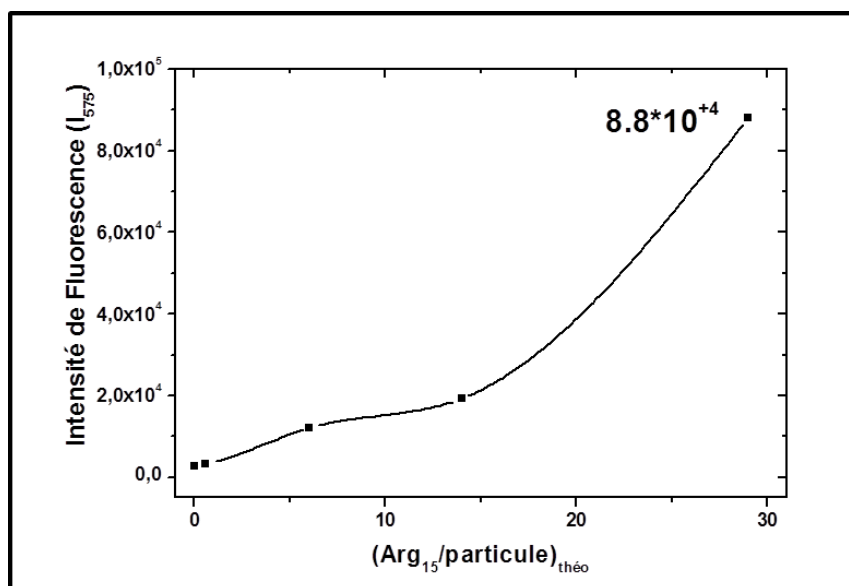


Figure 19 : Intensité de fluorescence des différents complexes ($[\text{Fe}] = 1.3 \text{ mM}$).

En accord avec les résultats précédents, **Tableau 3**, on observe une augmentation de la fluorescence des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28/\text{Arg}_{15}$ en fonction de la quantité de peptide introduite initialement. On peut cependant remarquer que l'intensité des complexes reste étonnamment faible par rapport à celle attendue, **Tableau 3**. Ce phénomène peut être dû à un quenching de fluorescence induit par la surface des nanoparticules (Cf. **Chapitre 3**).

Les résultats obtenus par cette méthode de complexation étant dans l'ensemble assez décevant, décrochage de Li28, faible fluorescence des complexes, nous nous sommes orientés vers la recherche d'une autre stratégie de fonctionnalisation permettant la complexation de Li28 et du peptide cationique (Arg_{15}) sur une nanoparticule de maghémite par interactions électrostatiques. Les différents travaux entrepris sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

V. INTERCALATION D'UNE COUCHE DE POLY-L-ARGININE : STRATEGIE D'ASSEMBLAGE COUCHE PAR COUCHE

Les polycations (Cf. *Chapitre 1*) sont couramment utilisés pour transporter des acides nucléiques dans les cellules. Ainsi, l'équipe du Professeur A. Carpentier a démontré en 2011, lors d'une étude menée sur plusieurs polycations (poly-arginine, poly-lysine, poly-histidine et chitosan), que la poly-arginine était un très bon candidat pour la formation d'un complexe ternaire avec Li28 et un court peptide (OVA) composé de 8 acides aminés (SIINFEKL).⁽²²⁾ Le protocole expérimental qu'ils ont mis au point leur a permis d'obtenir des particules ayant un diamètre hydrodynamique variant de 400 nm lorsqu'il est mesuré immédiatement après la synthèse, à environ 1 μm au bout d'une dizaine d'heures. Leurs particules ont été développées dans le cadre de la formulation de vaccins et les associations formées à partir de poly-L-arginine (PolyR) ont démontré une plus grande stabilité des complexes, une meilleure réponse immunitaire ainsi qu'une moindre toxicité que les autres adjuvants utilisés dans cette étude. Il nous a donc semblé intéressant d'adapter ce système ternaire à nos particules de maghémite selon le schéma de fonctionnalisation qui est présenté *Figure 20*.

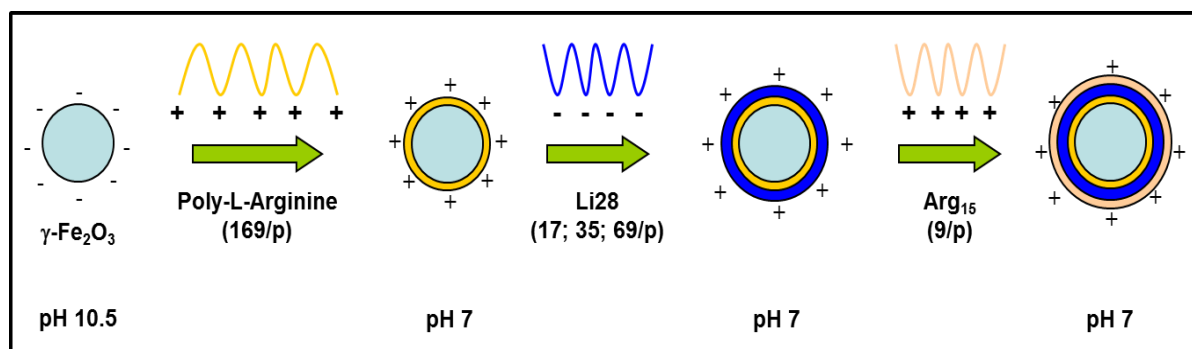


Figure 20: Schéma de fonctionnalisation de nanoparticules de maghémite par assemblage couche par couche de PolyR, Li28 et Arg₁₅.

Il s'agit tout d'abord de fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec de la poly-arginine. Sa charge positive, devrait permettre une meilleure interaction électrostatique avec Li28 et ainsi éviter son relargage ; comme cela a été observé précédemment lors de la deuxième étape de complexation par Arg₁₅.

V.1. Fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite par la Poly-L-Arginine

Lorsque le pH d'une solution de particules de maghémite devient basique, la surface de la nanoparticule se charge négativement (Cf *Chapitre 3, Figure 6*). Nous avons donc mis à profit cette dernière propriété pour fonctionnaliser la surface des nanoparticules de maghémite

par la PolyR. Le protocole utilisé est le suivant : 500 μL d'une solution de poly-L-arginine ([PolyR] = 1,67 g/L) est ajouté à 500 μL d'une solution de nanoparticules ([Fe] = 25 mM) à pH = 10,5. La poly-L-arginine que nous avons utilisée présente d'après le fournisseur (Sigma Aldrich) une masse molaire moyenne de 13300 ou 7500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et un degré de polarisation de 69 ou 39 en fonction du mode d'analyse utilisé (respectivement par mesure de la viscosité ou diffusion de la lumière). Afin de pouvoir évaluer le nombre moyen de polymère associé à une particule, nous avons choisi pour la suite de cette étude d'utiliser la valeur obtenue par diffusion multi angle de la lumière soit une masse moyenne de 7500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Le ratio utilisé dans cette expérience est, si l'on s'en tient à cette dernière valeur, d'environ 170 molécules de polymère par nanoparticule. Après mélange, les particules sont incubées pendant 4 heures à 37°C sous agitation (thermomixeur). Les particules sont ensuite séparées du mélange réactionnel par filtration tangentielle à l'aide de filtres ayant un seuil de coupure égale à 30 kDa (Ultracel Amicon). Le dosage du filtrat est effectué par spectroscopie UV-Visible à l'aide du réactif de Bradford en utilisant la courbe de calibration présentée **Figure 21**.

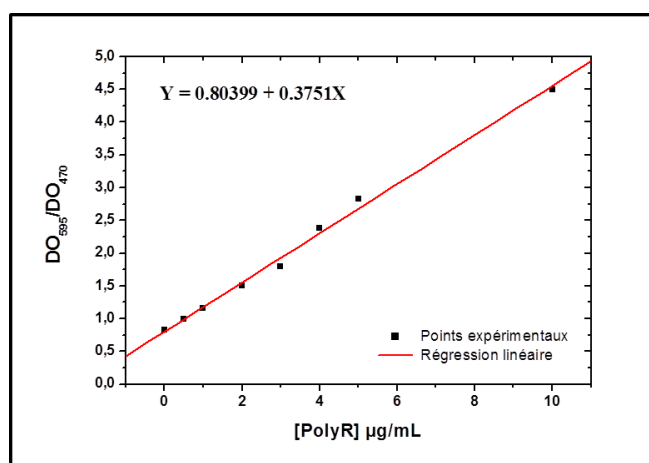


Figure 21: Droite de calibration du PolyR par dosage de Bradford.

Cette droite de calibration a été établie en calculant le rapport entre l'absorption à 595 nm caractéristique de la liaison du bleu de Coomassie avec les acides aminés et l'absorption à 470 nm caractéristique de la forme libre du colorant. Le dosage Bradford du filtrat nous a permis d'estimer un rendement de complexation de l'ordre de 80% soit en moyenne environ 140 brins de PolyR par nanoparticule. Les mesures de taille hydrodynamique et de potentiel zêta, réalisées en utilisant une solution de complexes $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PolyR}$ à pH = 7 avec une concentration en fer égale à 3 mM, indiquent un diamètre hydrodynamique moyen de 57 nm et un potentiel zêta de + 63 mV. Ces deux valeurs confirment la complexation du PolyR à la surface de la nanoparticule de maghémite.

V.2. Fonctionnalisation des complexes $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PolyR}$ par Li28 et Arg₁₅

V.2.1. Fonctionnalisation par Li28

La fonctionnalisation des nanoparticules obtenues précédemment a été effectuée pour 3 valeurs du rapport $R = \text{Li28}/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PolyR}$, respectivement $R = 17 ; 35 ; 69$. Pour cela, les complexes $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PolyR}$ et l'oligonucléotide sont incubés à $\text{pH} = 7$ pendant 16 heures à 25°C sous agitation (thermomixeur) à une concentration en fer de 3 mM. Les mesures de taille hydrodynamique et de potentiel zêta mesurées à l'issue de cette expérience sont présentées **Tableau 4**.

	R			
	0	17	35	69
Dh(nm)	57	58	60	69
Z(mV)	+63	+59	+52	+50

Tableau 4 : Valeurs du diamètre hydrodynamique (Dh, Z-Average) et du potentiel zêta (Z) mesurées dans l'eau (pH 7) des différents complexes à une concentration en fer de 3 mM.

On observe une augmentation du diamètre des particules accompagnée d'une diminution du potentiel zêta au fur et à mesure que R augmente. Ceci indique, du moins qualitativement, la complexation effective de Li28 à la surface des particules.

V.2.2. Fonctionnalisation par Arg₁₅

Pour l'étape de fonctionnalisation par Arg₁₅, nous avons ajouté un équivalent de 9 brins de peptide par particule. Les trois solutions précédentes ont donc été incubées en présence du peptide pendant 3 heures à 25°C sous agitation (thermomixeur). Les mesures de taille hydrodynamique et de potentiel zêta mesurées à l'issue de cette expérience ne présentent pas de grandes variations comparées aux résultats obtenus en l'absence de peptide, **Tableau 5**.

	R (Li28/NP)							
	0		17		35		69	
Arg₁₅/NP	0	0	9	9	0	9	0	9
Dh(nm)	57	58	57	60	59	69	68	
Z(mV)	+63	+59	+59	+52	+51	+50	+49	

Tableau 5 : Valeurs du diamètre hydrodynamique (Dh, Z-Average) et du potentiel zêta (Z) mesurées dans l'eau (pH 6,5) des différents complexes à une concentration en fer de 3 mM.

Les solutions ont ensuite été filtrées par centrifugation sur des membranes ayant un seuil de coupure égale à 30 kDa (Ultracel Amicon). Il est à noter que l'analyse visuelle de ces membranes en fin de filtration, a révélé une forte coloration rose imputable à l'adsorption du

peptide ou des complexes. Les données décrivant la stabilité colloïdale des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@PolyR/Li28/Arg_{15}$ après filtration sont présentées **Tableau 6**.

	R			
	0	17	35	69
Dh(nm)	57	57	62	71
Z(mV)	+63	+51	+48	+47

Tableau 6 : Valeurs du diamètre hydrodynamique (Dh, Z-Average) et du potentiel zêta (Z) mesurées dans l'eau (pH 6,5) des différents complexes à une concentration en fer de 3 mM.

A la lecture des données contenues dans ce tableau il est très difficile de se prononcer sur la nature des complexes observés après filtration.

Les filtrats et les complexes ont alors été analysés par spectroscopie UV et les spectres sont présentés **Figure 22**.

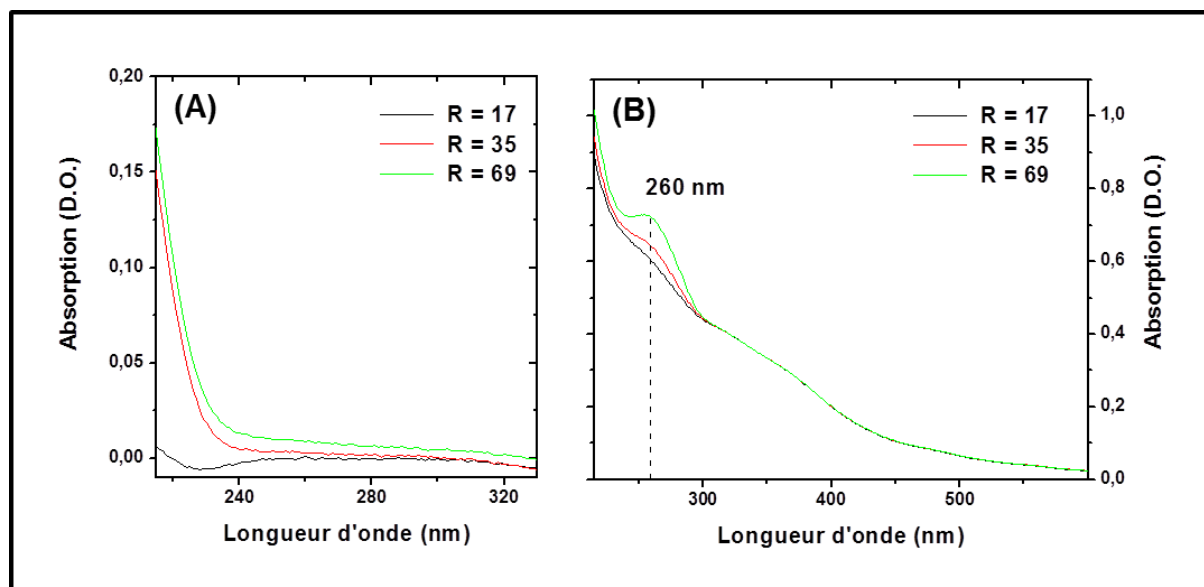


Figure 22 : Spectres UV-Visible (A) des filtrats et (B) des nanocomplexes (spectres normalisés à 350 nm) pour différentes valeurs de R.

L'absence d'une bande d'absorption vers 260 nm dans les spectres UV des filtrats nous permet de conclure que le rendement de complexation de Li28 sur les particules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@PolyR$ est proche de 100%, **Figure 22(A)**. L'analyse qualitative des spectres des complexes confirme d'ailleurs ce résultat puisque l'on observe une augmentation de l'absorption à 260 nm en fonction de la valeur de R, **Figure 22(B)**.

La dernière étape de caractérisation des complexes a consisté à évaluer la quantité de peptide liée à chaque particule. Bien que des réserves puissent être émises sur la technique de

séparation du peptide (analyse visuelle des membranes après filtration) nous avons néanmoins tenté d'évaluer le rendement de complexation du peptide par spectroscopie de fluorescence. Nous avons enregistré les spectres de fluorescence des filtrats et des complexes pour les différentes valeurs de R. Les résultats sont présentés **Figure 23**.

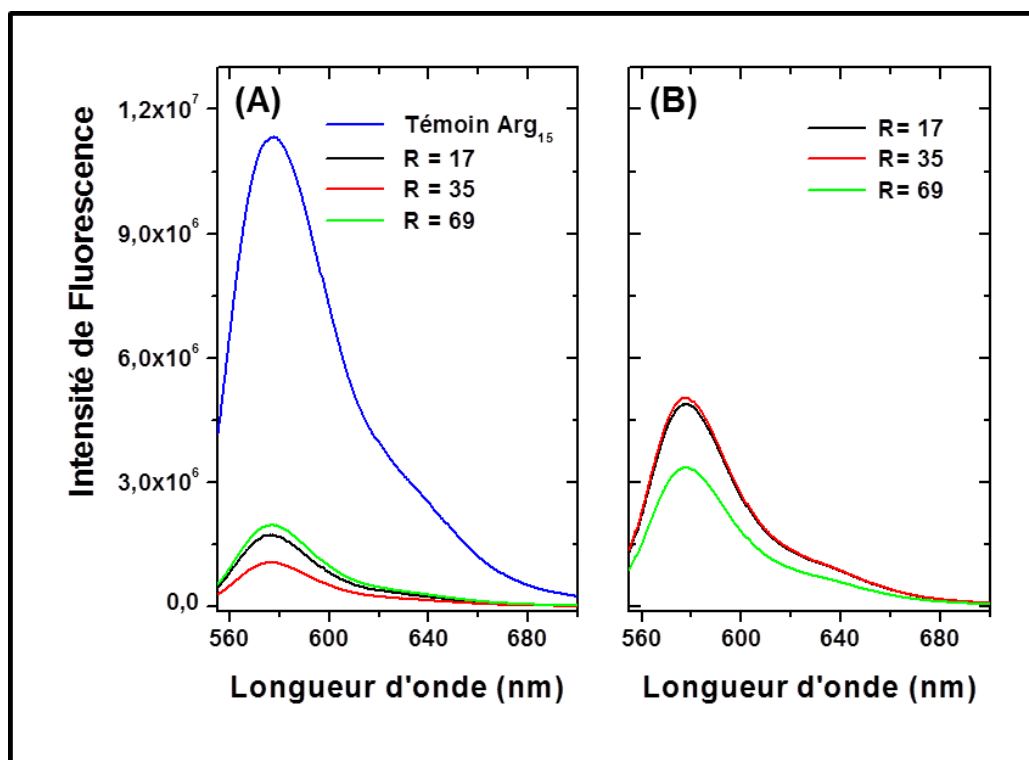


Figure 23 : Spectres de fluorescence (A) des filtrats et (B) des nanocomplexes pour différentes valeurs de R.

Les spectres de fluorescence des filtrats enregistrés pour les différentes valeurs de R présentent une faible intensité de fluorescence, **Figure 23(A)** spectres noir, rouge et vert, si on la compare à l'intensité maximale attendue dans le cas où le rendement de complexation de Li28 serait nul, **Figure 23(A)** spectre bleu. Si on considère que tout le Li28 non complexé aux nanoparticules est récupéré dans le filtrat lors la dernière étape de synthèse, il est possible d'établir un rendement de complexation et d'estimer le nombre de peptides par particule. Ce rendement pour les trois complexes est de l'ordre de 85-90% soit environ 7 à 8 Li28 par particule.

Les nanocomplexes, **Figure 23(B)**, présentent des intensités maximales de fluorescence intermédiaires, entre celles observées pour les filtrats et celle mesurée pour la quantité initiale de Li28. Ce résultat indique la présence de peptides à la surface des particules. Cependant en tenant compte du phénomène de « Quenching », qui apparait suite à la complexation du

fluorophore sur la nanoparticule, il est impossible d'utiliser ces données pour quantifier le nombre de peptide par particule.

Nous avons vu au Chapitre 3, qu'en présence de sérum le relargage du fluorophore conduit à une augmentation de la fluorescence au cours du temps ce qui permet d'obtenir le temps de demi-vie du complexe dans un milieu biologique. Cette expérience permet aussi d'estimer la valeur du « Quenching » dans ces conditions particulières. Nous avons donc préparé un complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{PolyR}/\text{Li}28/\text{Arg}_{15}$, en utilisant le protocole décrit précédemment avec une valeur de R égale à 58. Le suivi de l'intensité de fluorescence de ces particules a été effectué à $\text{pH} = 7$ avec une concentration en fer proche de 0.7 mM et en présence de 10% de sérum de veau fœtal. L'intensité de fluorescence attendue pour la quantité de peptide utilisée dans cette expérience est d'environ 2×10^6 lorsque Arg_{15} n'est pas associé aux particules ($[\text{Arg}_{15}] = 300$ nM). Les résultats de cette étude sont présentés **Figure 24**.

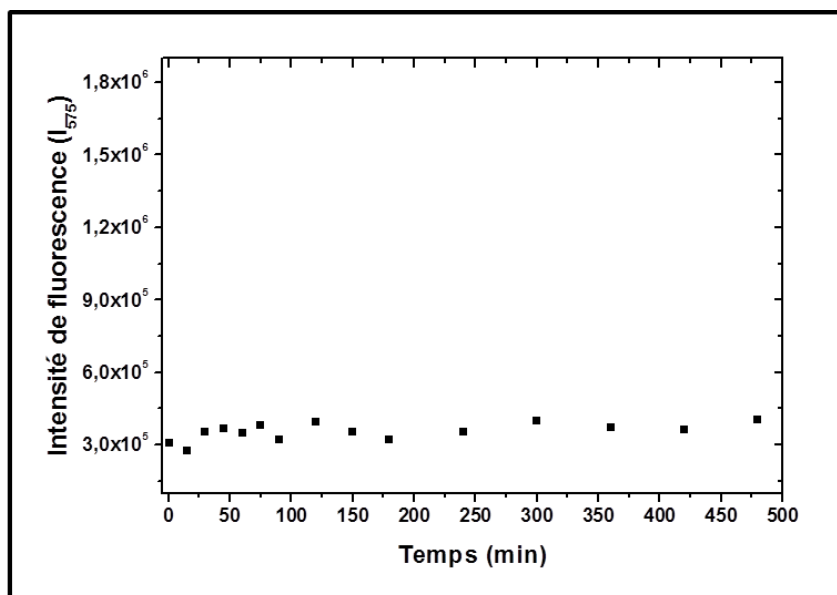


Figure 24 : Stabilité du complexe en présence de 10% de sérum de veau fœtal.

Même après 500 min, aucune variation significative de l'intensité de fluorescence du complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{PolyR}/\text{Li}28/\text{Arg}_{15}$ n'est observée dans nos conditions expérimentales. De plus l'intensité de fluorescence mesurée est relativement faible au vu de la quantité de peptide ajoutée lors de la complexation.

Ce résultat peut être interprété de différentes manières. Le « Quenching » étant dépendant de la distance qui sépare le fluorophore de la particule, il est possible qu'il ne soit plus observable lorsque l'on intercale une couche de PolyR entre le peptide et la surface de la particule. Dans ce cas, la faible intensité de fluorescence mesurée est vraisemblablement due

au fait que peu de peptide est présent sur les particules et que celui-ci est resté adsorbé à la membrane lors de l'étape de filtration. Une autre possibilité, est que le complexe soit suffisamment stable pour que le relargage ne se produise. Ceci serait en accord avec les résultats décrits par l'équipe du Professeur Carpentier dans le cadre de leur mélange ternaire PolyR/Li28/OVA.⁽²²⁾ L'étude de stabilité du complexe dans une solution saline (PBS) à 37°C a montré que moins de 4% de Li28 s'était dissocié du complexe au bout de 3 semaines d'incubation. Dans une telle hypothèse, la faible intensité de fluorescence détectée **Figure 24**, est alors due à un « Quenching » du fluorophore en raison de sa proximité avec la surface de la particule. Dans ce cas, le rendement de complexation de l'ordre de 85-90% obtenu par dosage des filtrats est tout à fait envisageable et la technique de filtration peut être retenue. En conclusion de cette étude, les données expérimentales ne nous permettent pas d'établir avec certitude le rendement de complexation du peptide Arg₁₅ sur des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @PolyR/Li28, mais attestent de sa présence.

V.3. Internalisation des complexes par des macrophages (RAW 264.7)

Afin de vérifier que les nanocomplexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @PolyR/Li28/Arg₁₅ ont bien la potentialité de délivrer leur chargement dans des cellules, nous avons testé leur internalisation par des macrophages murins de la lignée RAW 264.7. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Claire Banissi dans le laboratoire du Professeur Carpentier à l'Hôpital Européen Georges Pompidou.

Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 3 heures en présence des particules (R=58) à deux concentrations différentes ([Fe] = 35 et 175 μM soit en particules [NP] # 1,8 et 9 nM). Après incubation le milieu de culture est éliminé et les cellules rincées plusieurs fois avec une solution de PBS. Une partie des cellules a été isolée pour des analyses immédiates alors qu'une autre partie a été incubée à nouveau pendant 21 heures en présence de milieu seul (« chasse »). Au bout de 3 ou 24 heures, les cellules sont observées par spectroscopie de fluorescence afin de détecter la présence du peptide et analysées à l'aide de la technologie MIAtek pour quantifier l'internalisation de la maghémite.

V.3.1. Visualisation par microscopie de fluorescence

Le peptide Arg₁₅ peut être observé directement en microscopie de fluorescence par l'intermédiaire du groupement TAMRA qui émet une fluorescence dans le rouge. Afin d'observer la colocalisation du peptide et des cellules, l'ADN cellulaire a été coloré en bleu par du DAPI (*Annexe III, II. Coloration au DAPI*). La visualisation directe, par microscopie

de fluorescence, de l'internalisation du peptide Arg₁₅, est présentée **Figure 25** pour des concentrations extracellulaires en fer de 35 et 175 μM après 3 heures d'incubation, **Figure 25(A)** et **(B)** respectivement.

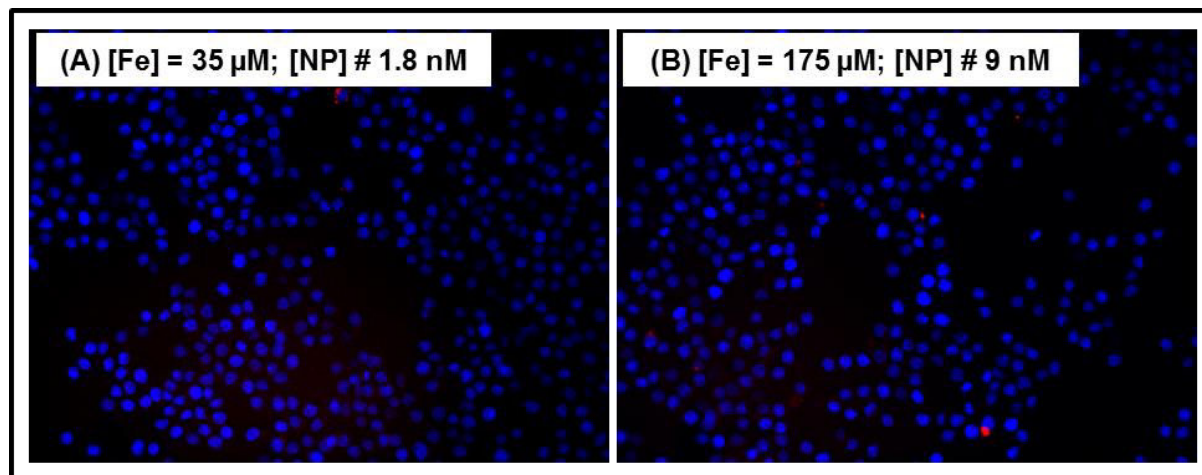


Figure 25 : Visualisation de l'internalisation de Arg₁₅ par microscopie de fluorescence.

Comme on peut le constater sur cette figure, l'émission de fluorescence du peptide n'est pas observée dans la gamme de concentration que nous avons utilisée. L'absence de peptide dans les cellules, ou sa présence en faible quantité, peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. La première explication est peut-être que nous avons fait une mauvaise estimation de la quantité de peptide introduite dans le milieu de culture étant donné que celle-ci a été établie d'après le dosage des filtrats en considérant 8 Arg₁₅ par particule. Il est aussi possible que le complexe ne soit pas du tout stable dans le milieu de culture et qu'une fois le peptide dissocié des nanoparticules il soit éliminé lors de la phase de rinçage avec le PBS. La dernière hypothèse est que les nanoparticules ne rentrent pas ou peu dans les cellules. Afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons effectué un dosage de la quantité de maghémite présente dans les cellules après incubation avec les nanocomplexes.

V.3.2. Quantification par MIAtek

Comme cela a été décrit au chapitre 3, l'analyse MIAtek permet, à partir d'une courbe de calibration préétablie, de mesurer le nombre de nanoparticules de maghémite contenues dans un échantillon donné. Les résultats de cette analyse pour les échantillons décrits précédemment sont présentés **Figure 26**.

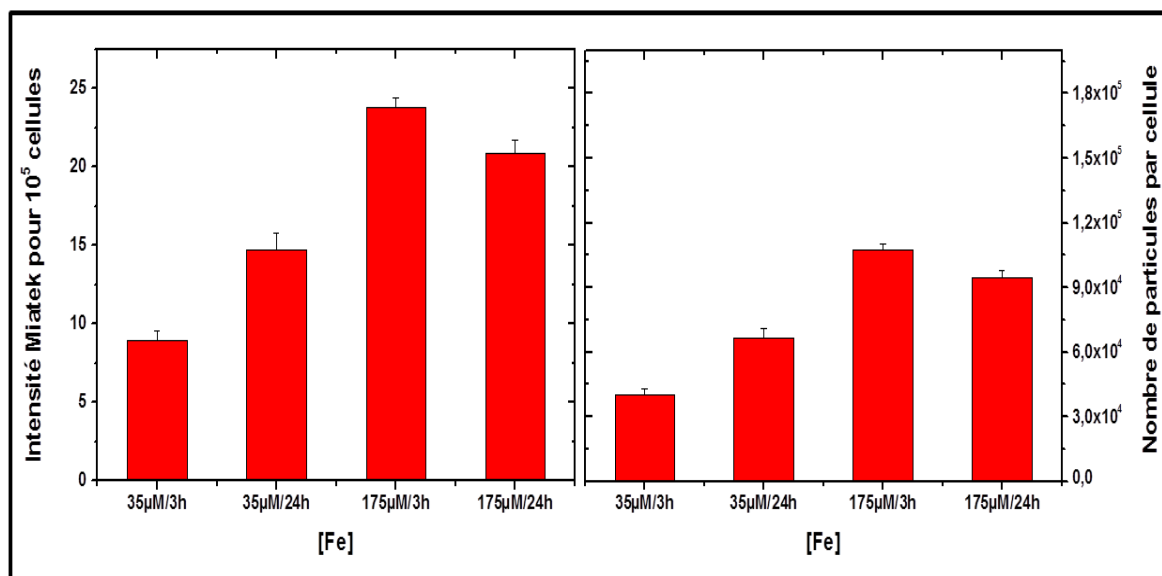


Figure 26 : Quantification de l'internalisation de la maghémite par analyse MIAtek.

Le graphique situé à gauche de cette figure représente l'intensité du signal MIAtek rapportée à 100000 cellules alors que celui de droite représente le nombre moyen de particules internalisées dans un macrophage. Ces résultats sont présentés en fonction de la quantité de nanoparticules ([Fe]) présente dans le milieu extracellulaire durant la période d'incubation. Les analyses ont été effectuées après 3 heures d'incubation ainsi qu'après 24 heures de « chasse ». On peut voir sur cette figure que le nombre moyen de particules internalisées dans un macrophage est d'environ 50000 lorsque les cellules sont incubées pendant 3 heures à une concentration en fer de 35 µM et qu'il passe à environ 100000 lorsque la concentration en fer est de 175 µM. Ces valeurs, en limite du seuil de détection de l'appareil (# 200 ng de maghémite), sont nettement inférieures à celle obtenue avec le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{dODN}$ pour lequel on détectait environ 20 fois plus de particules (en l'absence de champ magnétique) à une concentration en fer de 125 µM (Cf **Chapitre 3, Figure 27**).

En conclusion, cette nouvelle méthode de complexation couche par couche ne semble pas adaptée pour la fonctionnalisation de surface à la fois du peptide et de l'acide nucléique même si en présence de poly-arginine l'association de l'oligonucléotide avec la nanoparticule semble plus robuste. Une des raisons de cet échec est peut-être liée à la forte charge positive portée par la particule à toutes les étapes de la fonctionnalisation repoussant ainsi l'approche du peptide. En se basant sur cette constatation, nous nous sommes orientés vers la recherche d'un autre protocole de fonctionnalisation privilégiant l'interaction électrostatique entre l'oligonucléotide et le peptide.

VI. COMPLEXATION DE LI28 ET D'UN PEPTIDE CATIONIQUE : STRATEGIE EN UNE SEULE ETAPE

VI.1. Fonctionnalisation des nanoparticules

Afin de favoriser l'approche électrostatique nous avons établi un protocole de fonctionnalisation en une seule étape dans lequel un mélange contenant l'oligonucléotide et le peptide est ajouté à une solution de nanoparticules stabilisées à pH = 2 selon le schéma présenté *Figure 27*.

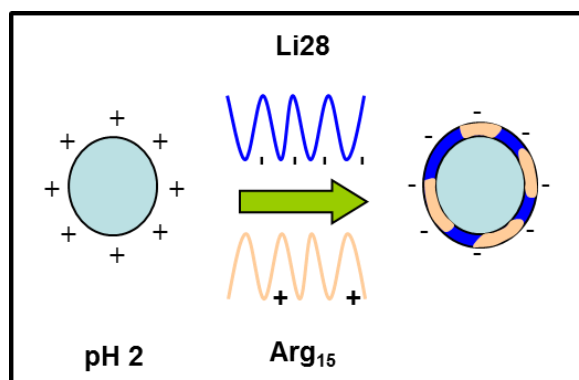


Figure 27: Schéma de fonctionnalisation de nanoparticules de maghémite par Li28 et Arg15.

Ce protocole est très proche de celui décrit lors de la fonctionnalisation par étape (§ III.1.). Les nanoparticules sont solubilisées dans 500 μL d'eau à pH = 2 à une concentration en fer proche de 9 mM et la solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. Séparément, Li28 et Arg₁₅ sont mis en solution dans 500 μL d'eau à un pH final compris entre 6 et 7 ([Li28] = 26 μM et [Arg15] = 4 μM). La complexation est réalisée à température ambiante sous agitation circulaire pendant 30 minutes. Dans ces conditions, la composition du mélange ternaire est telle que l'on a 58 Li28 et 9 Arg₁₅ par nanoparticule de maghémite soit des conditions identiques à celles utilisées pour le test d'internalisation des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@PolyR/Li28/Arg_{15}$ par des macrophages RAW 264.7 (§ V.3.). Le ratio choisit pour la complexation de ces trois constituants devrait permettre de conférer à la particule une charge négative lors de toutes les étapes de fonctionnalisation et ainsi favoriser l'association du peptide cationique avec l'oligonucléotide et ainsi la formation d'un complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28_Arg_{15}$. Après complexation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes et le surnageant séparé des particules d'oxyde de fer par l'intermédiaire d'un aimant afin d'éliminer l'oligonucléotide et le peptide n'ayant pas réagi. Finalement les complexes ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28_Arg_{15}$) sont dilués dans 1 mL d'eau ultrapure, à une concentration en fer

proche de 4,5 mM, et le pH est ajusté à 7-7,5 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium. Comme lors des études précédentes le surnageant et les particules ont été analysés par spectroscopie d'absorption UV et émission de fluorescence afin de caractériser le complexe formé.

VI.2. Caractérisation des nanoparticules

Des mesures de diamètre hydrodynamique, par diffusion dynamique de la lumière, et de potentiel zêta, effectuées sur une solution de complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28_Arg}_{15}$ à une concentration en fer de 0,7 mM et à pH 7 indiquent un diamètre hydrodynamique de 86 nm (Z-Average) et un potentiel zêta de - 53 mV. Cette valeur qui à priori doit contribuer à assurer aux complexes une bonne stabilité colloïdale devrait aussi être favorable à la stabilité de l'association acide nucléique/peptide.

Le surnageant ainsi que le complexe ($[\text{Fe}] \# 0,7 \text{ mM}$) ont ensuite été analysés par spectroscopie UV et les spectres sont présentés **Figure 28**.

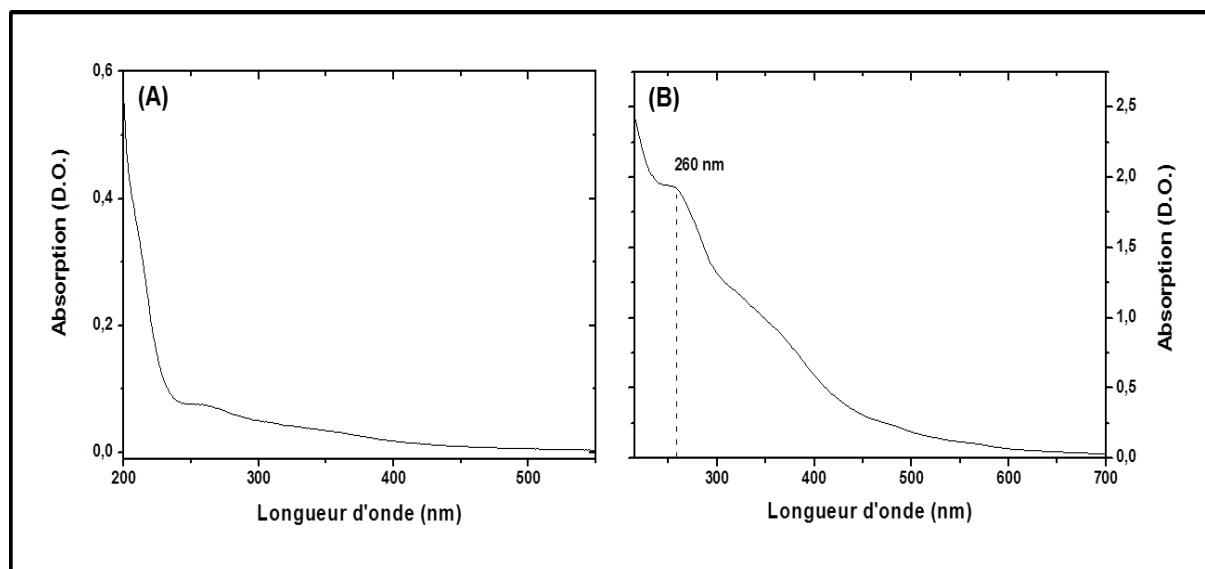


Figure 28 : Spectres UV-Visible (A) du surnageant et (B) des nanocomplexes à pH = 7.

Contrairement à l'étude, par spectroscopie UV, des surnageants issus de la complexation par étape (**Figure 16**, § IV.2.), le spectre du surnageant présenté **Figure 28(A)** ne révèle pas l'existence d'une quantité importante de Li28 non complexé aux nanoparticules. La présence de Li28 à la surface des nanoparticules est d'ailleurs confirmée par la bande située vers 260 nm dans le spectre d'absorption des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28_Arg}_{15}$, **Figure 28(B)**. L'analyse quantitative de l'absorption à 260 nm nous a permis d'estimer que le rendement de

complexation de l'oligonucléotide à la surface de la maghémite était de l'ordre de 98% soit environ 57 brins de Li28 par nanoparticule.

Pour tenter d'estimer la quantité de peptide Arg₁₅ contenue dans les complexes, nous avons ensuite enregistré les spectres d'émission de fluorescence du complexe et du surnageant à pH 7. Ces spectres sont présentés **Figure 29**.

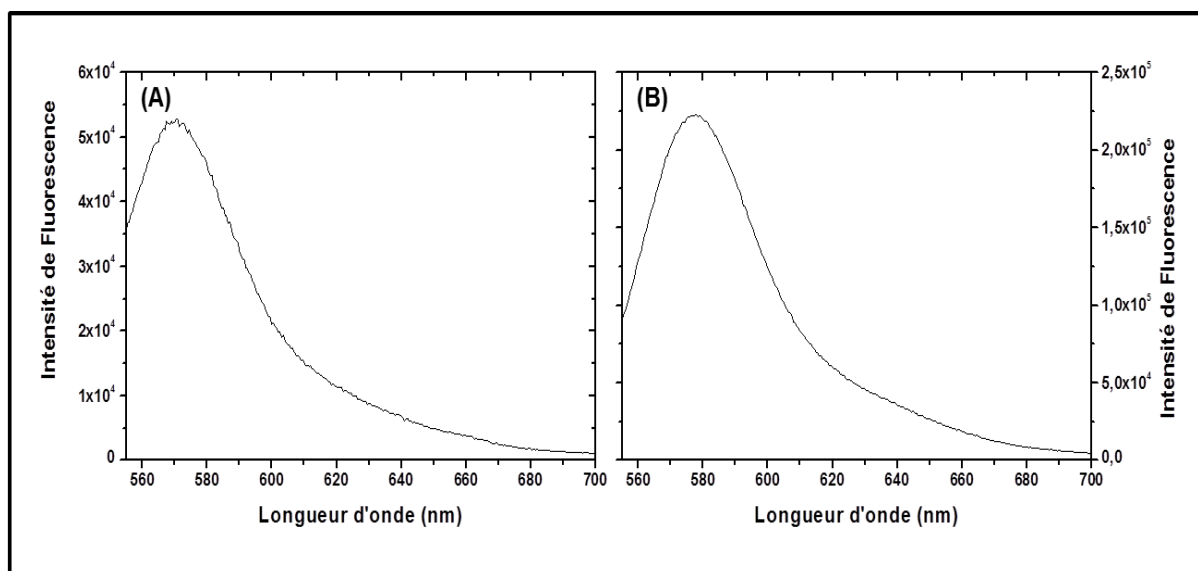


Figure 29 : Spectres de fluorescence (A) du surnageant et (B) des nanocomplexes à pH = 7.

Selon que le rendement de la complexation est total ou nul, on s'attend à une concentration en Arg₁₅ comprise entre 0 et 2 μM dans 1 mL de surnageant. Nous avons vu au paragraphe IV.2. que l'intensité de fluorescence attendue pour une concentration en peptide égale à 2 μM est de l'ordre de $1,2 \cdot 10^7$, **Figure 17(A)**. Comme on peut le constater sur la **Figure 29(A)**, l'intensité de fluorescence du surnageant est de l'ordre de $5 \cdot 10^4$ ce qui permet de penser que plus de 99% du peptide s'est complexé avec Li28 sur les nanoparticules. La présence du peptide sur les particules est confirmée par le spectre du complexe enregistré avec une solution diluée à une concentration en fer proche de 0,7 mM, **Figure 29(B)**. A cette concentration, l'intensité de fluorescence attendue est de l'ordre de $1,75 \cdot 10^6$ si l'on considère que 99% du peptide s'est lié à la particule. On observe cependant que l'intensité de fluorescence du complexe est de l'ordre de $2,25 \cdot 10^5$ soit environ 8 fois moins que l'intensité attendue, **Figure 29(B)**. Cet écart peut être attribué au « Quenching » du fluorophore suite à la réaction de complexation révélant ainsi la proximité immédiate entre le peptide et la surface métallique de la nanoparticule. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons essayé de suivre le relargage du

peptide en présence de sérum. Pour cela nous avons enregistré les variations de la fluorescence en fonction du temps. Ces résultats sont présentés **Figure 30**.

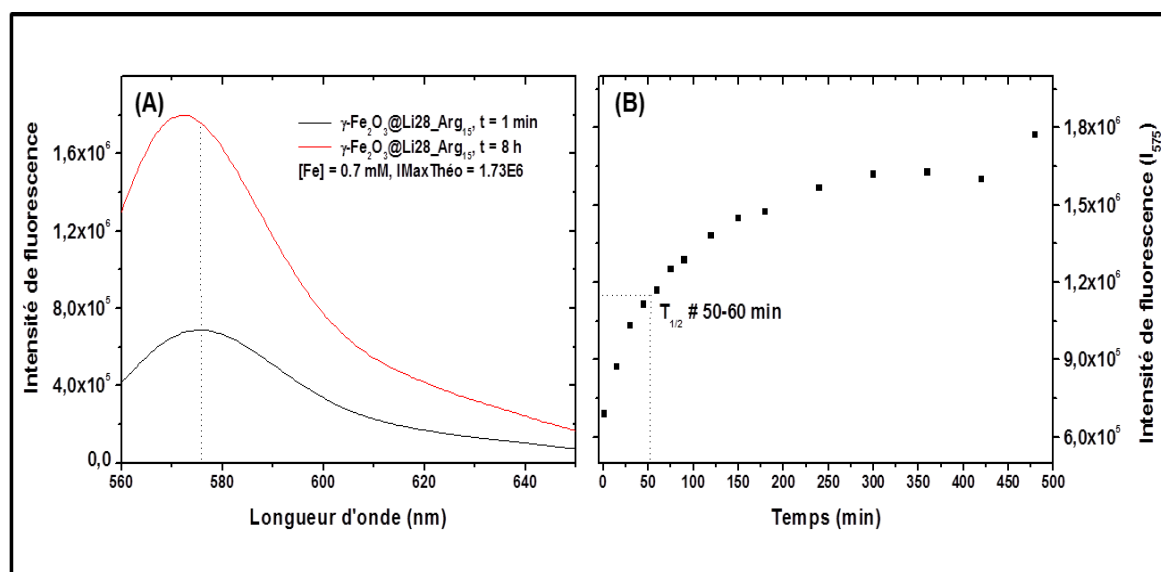


Figure 30 : Stabilité du complexe en présence de 10% de sérum de veau fœtal.

Pour cette expérience, les nanocomplexes ont été mis en solution à une concentration en fer proche de $0,7$ mM en présence de 10% de sérum de veau fœtal et les variations de l'intensité ont été suivies à température ambiante pendant 8 heures. Contrairement à ce qui a été observé pour le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{PolyR/Li28/Arg}_{15}$, **Figure 24**, l'intensité de fluorescence des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28_Arg}_{15}$, **Figure 30**, augmente en fonction du temps pour atteindre une valeur maximum proche de celle attendue dans le cas où l'on a complexé 99% du peptide. Ce résultat confirme donc les conclusions tirées de l'analyse du surnageant et montre que le protocole de fonctionnalisation en une seule étape permet d'obtenir de bon rendement de complexation de Li28 et Arg₁₅ à la surface de nanoparticules de maghémite. Les données présentées **Figure 30(B)**, permettent de plus de déterminer le temps de demi-vie du complexe ($T_{1/2}$) dans ce milieu biologique ; tout au moins en ce qui concerne le peptide. Le $T_{1/2}$ du complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28_Arg}_{15}$ a été estimé entre 50 et 60 minutes dans nos conditions expérimentales. Cette valeur est nettement plus faible que celles observées au chapitre 3 avec le dODN à squelette phosphodiester pour lequel nous avons estimé des $T_{1/2}$ allant de 2 à 6 heures en fonction de la quantité d'oligonucléotide complexée à la surface de la particule. Différents facteurs peuvent expliquer cette différence tels que les modifications chimiques, la structure primaire et secondaire de l'acide nucléique ou encore la présence du peptide cationique et des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre ce changement de propriété.

VI.3. Internalisation des complexes par des macrophages (RAW 264.7)

De la même façon que pour les nanocomplexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@$ PolyR/Li28/Arg₁₅, nous avons étudié l'internalisation des complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@$ Li28_Arg₁₅ par des macrophages murins de la lignée RAW 264.7. Le protocole utilisé pour ces expériences est le même que celui décrit au paragraphe V.3 de ce chapitre.

VI.3.1. Visualisation par microscopie de fluorescence

Les cellules ont été incubées pendant 3 heures en présence d'une concentration en nanoparticules de 1,8 ou 9 nM, soit des concentrations en fer de 35 et 175 μM respectivement. Les images obtenues par microscopie de fluorescence au bout de 3 heures d'incubation et après 24 heures de « chasse » sont présentées *Figure 31*.

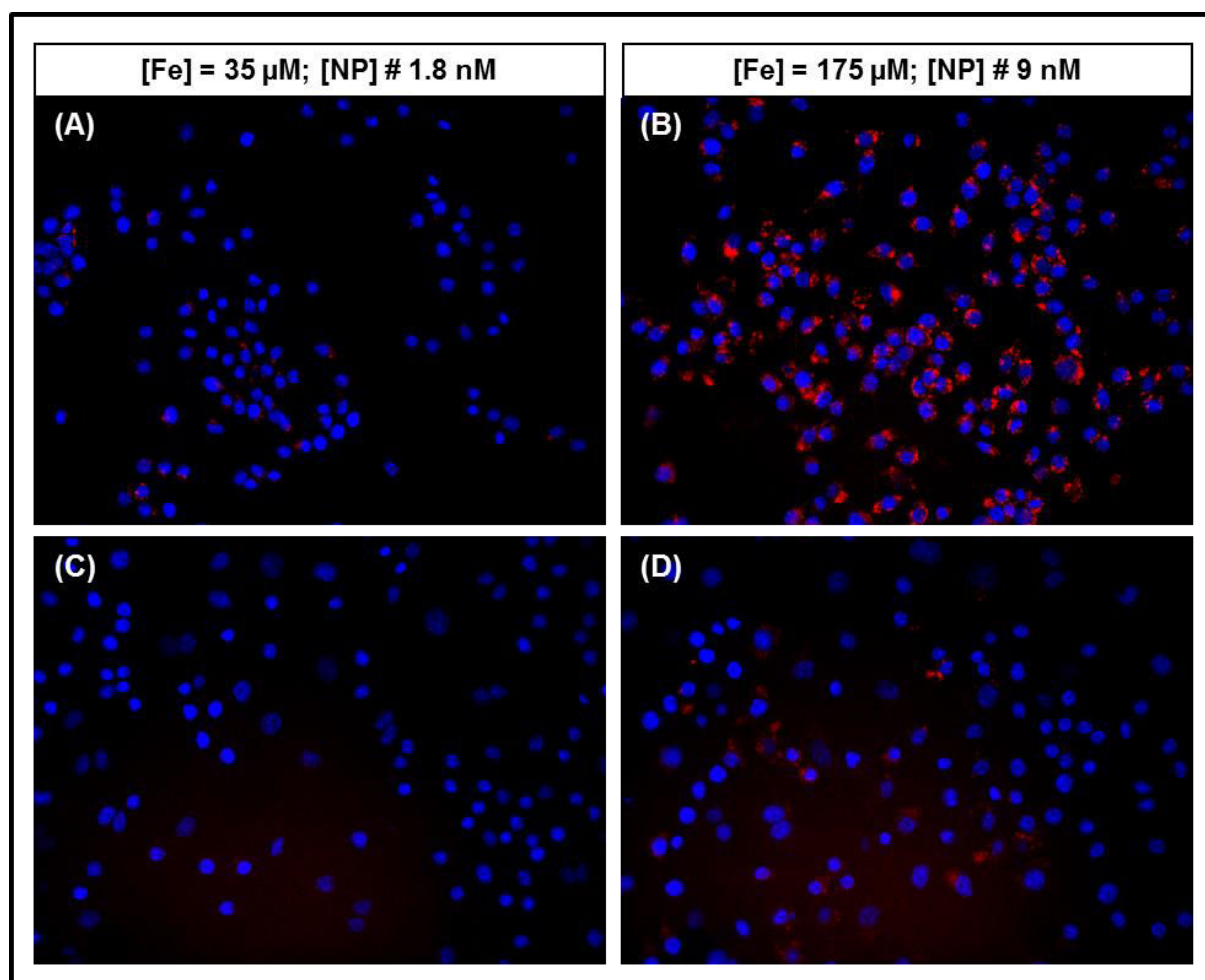


Figure 31 : Visualisation de l'internalisation de Arg₁₅ par microscopie de fluorescence.

Les cellules incubées avec la plus faible concentration en particule ([NP] = 1,8 nM) semblent n'avoir internalisé que peu de peptide comme le démontre la faible intensité de fluorescence

du TAMRA observée au bout de 3 heures d'incubation et 24 heures de « chasse », **Figure 31(A)** et **(C)** respectivement. Au contraire lorsque la concentration extracellulaire en nanoparticules augmente, la fluorescence du TAMRA à l'intérieur des cellules devient nettement visible, **Figure 31(B)**, et persiste encore faiblement après 24 heures dans les cellules, **Figure 31(D)**. Même si il est difficile de quantifier l'internalisation du peptide Arg₁₅ par simple imagerie de fluorescence, il semble néanmoins probable qu'une quantité relativement importante de nanocomplexes ait été internalisée par les macrophages. Afin de confirmer ce résultat nous avons effectué un dosage de la maghémite contenue dans les cellules après 3 heures d'incubation. Ce dosage a été effectué à l'aide de la technologie MIAtek.

VI.3.2. Quantification par MIAtek

Les résultats de l'analyse MIAtek ont été obtenus dans les conditions décrites précédemment pour le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@PolyR/Li28/Arg_{15}$, **Figure 26**, et sont présentées **Figure 32**. Ces deux figures sont donc directement comparables.

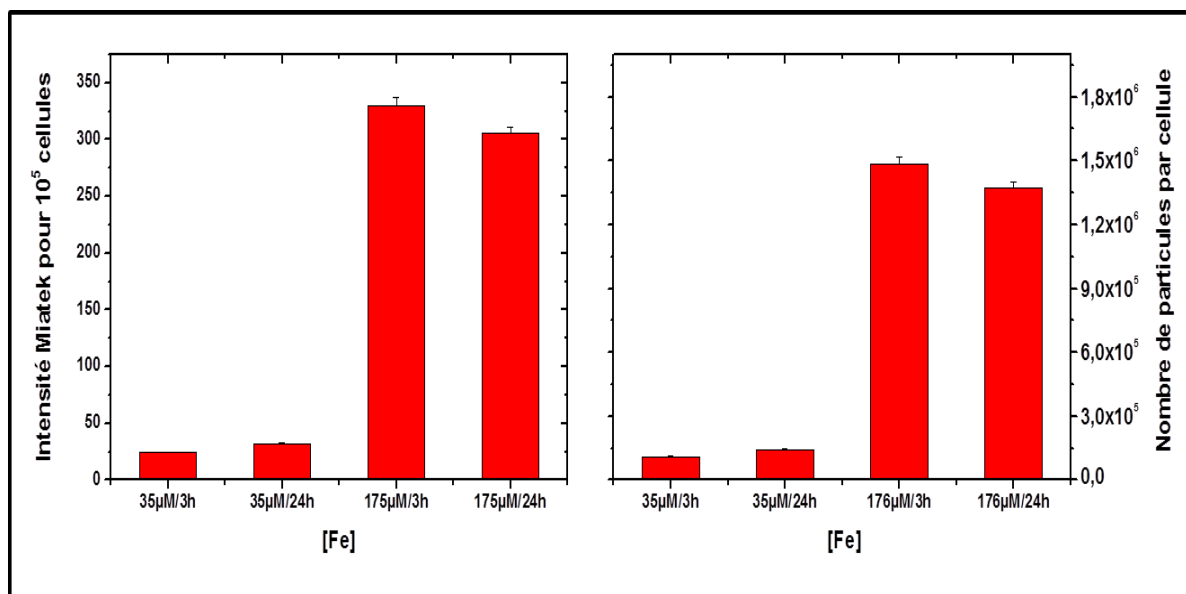


Figure 32 : Quantification de l'internalisation de la maghémite par analyse MIAtek.

Lorsque les cellules sont incubées à une concentration en fer de 35 µM avec les complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Li28_Arg_{15}$, l'intensité MIAtek, rapportée à 10⁵ cellules, reste assez faible avec un signal équivalent à celui obtenu pour les complexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@PolyR/Li28/Arg_{15}$ à une

concentration de 175 μM ce qui représente en moyenne environ 100000-150000 particules par cellule. Par contre lorsque la concentration en particule augmente, i.e. 175 μM en fer, on détecte un fort accroissement du signal magnétique et l'on s'approche alors des valeurs observées avec le complexe $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{dODN}$ (Cf. **Chapitre 3**) puisque l'on estime qu'il y a environ 1,5 million de nanoparticules par cellule. Les données obtenues par dosage magnétique corroborent donc les observations de microscopie confirmant ainsi l'internalisation des nanocomplexes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Li28_Arg}_{15}$ dans les macrophages murins. Ces résultats vont également dans le sens d'une meilleure internalisation des nanoparticules lorsqu'elles sont chargées négativement.

Au regard des objectifs affichés dans ce chapitre, le mode de fonctionnalisation en une seule étape est de loin le meilleur puisqu'il permet d'associer sur une même nanoparticule de maghémite un oligonucléotide phosphorothioate et un peptide cationique sans aucun autre intermédiaire, en utilisant uniquement les forces électrostatiques exercées par les différents composants du système. Le protocole employé permet de plus d'obtenir de très bons rendements de complexation. Les nanoparticules formées ont un diamètre hydrodynamique inférieur à 90 nm (Z-Average) et un potentiel zêta de l'ordre de -50 mV ce qui leur confère une bonne stabilité colloïdale. Le temps de demi-vie du complexe dans le sérum n'est pas très élevé mais l'association est tout de même suffisamment stable pour que la nano-plateforme puisse délivrer le peptide au sein de cellules immunitaires. Dans le cadre de la vaccination, il pourrait être intéressant de tester ce système sur un modèle animal en utilisant une autre séquence peptidique à l'image des résultats publiés par le Professeur A. Carpentier avec OVA.⁽²²⁾

Références bibliographiques

1. Tung CH, Weissleder R. Arginine containing peptides as delivery vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**; 55: 281-294.
2. Traboulsi H, Larkin H, Bonin MA, Volkov L, Lavoie C, Marsault E. Macrocyclic cell penetrating peptides : a study of structure-penetration properties. *Bioconjug. Chem.* **2015**; DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00023.
3. Carpentier A, Laigle-Donadey F, Zohar S, Capelle L, Behin A, Tibi A, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Lacomblez L, Taillibert S, Puybasset L, Van Effenterre R, Delattre JY, Carpentier AF. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro. Oncol* **2006**; 8: 60-66.

4. Suzuki T, Ohsumi S, Makino K. Mechanistic studies on dépurination and apurinic site breakage in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1994**; 22: 4997-5003.
5. Gilar M, Fountain KJ, Budman Y, Holyoke JL, Davoudi H, Gebler JC. Characterization of therapeutic oligonucleotides using liquid chromatography with on-line mass spectrometry detection. *Oligonucleotides* **2003**; 13: 229-243.
6. Fearon KL, Hirschbein BL, Chiu CY, Quijano MR, Zon G. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: large-scale synthesis and analysis, impurity characterization, and the effects of phosphorus stereochemistry. *Ciba Found. Symp.* **1997**; 209: 19-31.
7. Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. **1984**; Springer-Verlag New York.
8. Mallajosyula SS, Pati SK. Effect of protonation on the electronic properties of DNA base pairs: applications for molecular electronics. *J. Phys. Chem. B.* **2007**; 111: 11614-11618.
9. Gilar M, Belenky A, Smisek DL, Bourque A, Cohen AS. Kinetics of phosphorothioate oligonucleotide metabolism in biological fluids. *Nucleic Acids Res.* **1997**; 25: 3615-3620.
10. Zimmer Ch, Luck G, Venner H, Fric J. Studies on the conformation of protonated DNA. *Biopolymers* **1968**; 6: 563-574.
11. Sorokin VA, Gladchenko GO, Valeev VA. DNA protonation at low ionic strength of solution. *Makromol. Chem.* **1986**; 187: 1053-1063.
12. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys. Chem.* **2003**; 104: 477-488.
13. White AP, Reeves KK, Snyder E, Farrell J, Powell JW, Mohan V, Griffey RH, Sasmor H. Hydration of single-stranded phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1996**; 24: 3261-3266.
14. Hartmann B, Bertrand HO, Femandjian S. Sequence effects on energetic and structural properties of phosphorothioate DNA: a molecular modelling study. *Nucleic Acids Res.* **1999**; 27: 3342-3347.
15. Dhaouadi Z, Nsangou M, Hernandez B, Pflüger F, Liquier J, Ghomi M. Geometrical and vibrational features of phosphate, phosphorothioate and phosphorodithioate linkages with hydrated cations: a DFT study. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**; 73: 805-814.
16. Tsuboi M, Kyogoku Y, Shimanouchi T. Infrared absorption spectra of protonated and deprotonated nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta* **1962**; 55: 1-12.
17. Paoletti J, Le Pecq JB. Resonance energy transfer between ethidium bromide molecules bound to nucleic acids. Does intercalation wind or unwind the DNA helix? *J. Mol. Biol.* **1971**; 59: 43-62.
18. Pigram WJ, Fuller W, Davies ME. Letter: Unwinding the DNA helix intercalation. *J. Mol. Biol.* **1973**; 80: 361-365.
19. Cuniberti C, Guenza M. Environment-induced changes in DNA conformation as probed by ethidium bromide fluorescence. *Biophys. Chem.* **1990**; 38: 11-22.
20. Nelson JW, Tinoco I Jr. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides. *Biopolymers* **1984**; 23: 213-233.
21. Vogel B, Frantz S. Determination of DNase activity by degradation of ethidium bromide-DNA complexes using a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.* **2015**; 471: 73-79.
22. Maubant S, Banissi C, Beck S, Chauvat A, Carpentier AF. Adjuvant properties of cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide in combination with various polycations in an ovalbumin-vaccine model. *Nucleic Acid Ther.* **2011**; 21: 231-240.

Conclusion Générale

Nous avons présenté dans ce manuscrit des résultats, obtenus principalement par spectroscopie optique, décrivant l'étude d'interactions d'acides nucléiques, entre eux, avec la protéine Hfq ainsi qu'avec la surface de nanoparticules d'oxyde de fer.

L'étonnante flexibilité conformationnelle des acides nucléiques est une propriété déterminante dans leurs facultés d'adaptation, indispensable pour remplir les différentes fonctions qu'ils occupent au sein de la cellule. Les études structurales entreprises depuis la moitié du 20^{ème} siècle ont largement contribué à notre compréhension de la régulation de l'expression des gènes et par conséquent aux différentes façons d'intervenir dans ces processus.

Notre étude, par spectroscopie UV-Visible et infrarouge, de l'auto-association de DsrA a permis de confirmer l'instabilité, ou la diversité conformationnelle, de la partie centrale de cet ARNnc. En fonction du mode de préparation de l'échantillon, conditions de salinité ou concentration en ARN, différentes formes structurales coexistent au sein d'un équilibre conformationnelle. Aux concentrations les plus élevées, conditions expérimentales de l'infrarouge, nous avons montré que la structure adoptée par une partie de cet ARN permettait, dans certaines situations, d'envisager la polymérisation de DsrA. Même si les conséquences *in vivo* de cette prédisposition à la polymérisation ne sont pas encore établies et qu'elles méritent d'être étudiées plus en profondeur, il a été proposé qu'une telle structure puisse être impliquée dans la régulation de la concentration intracellulaire de DsrA.

DsrA est impliqué dans le contrôle des mécanismes de réponse au stress chez la bactérie *E. Coli* via la formation d'une structure intermoléculaire avec l'ARNm RpoS. Si on sait aujourd'hui que cette régulation s'établit par l'intermédiaire de la protéine Hfq, la structure de ce complexe ternaire est encore assez mal connue et d'une manière générale peu de données structurales existent sur l'interaction de Hfq avec des ADN. Notre étude par spectroscopie infrarouge a montré que la protéine Hfq pouvait se lier à un ADN double brin dA₂₀.dT₂₀. Cette interaction provoque l'ouverture partielle de la double hélice et un changement de la géométrie du brin dA₂₀ dont les sucres adoptent une conformation de type N semblable à celle observée dans les ARNs. La souplesse conformationnelle de l'ADN est probablement à

l'origine de l'affinité inattendue de Hfq pour cette double-hélice. Ces résultats intéressants nous incitent à étudier les interactions de Hfq avec d'autres structures d'ADN et bien évidemment avec DsrA.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés au développement d'un nano-vecteur pouvant transporter un oligonucléotide à l'intérieur de cellules en culture. Nous avons mis au point un procédé d'assemblage basé sur les attractions électrostatiques, permettant de complexer, en une seule étape, un oligonucléotide à la surface d'une nanoparticule de maghémite. Ce protocole permet de contrôler la charge en ADN, avec des rendements très élevés, jusqu'à environ 70 brins d'oligonucléotide pour une particule de maghémite de 10 nm de diamètre. L'analyse spectroscopique a révélé, que suite à la complexation, l'oligonucléotide conserve sa structure et qu'en fonction de la densité en acide nucléique l'axe de la double hélice est orienté parallèlement ou perpendiculairement à la surface de la nanoparticule. Ceci semble avoir une importance en milieu biologique puisqu'à faible densité la configuration adoptée par l'oligonucléotide induit une plus grande résistance du complexe vis-à-vis des constituants du sérum de veau fœtal.

L'internalisation des complexes par des cellules SW480 issues de carcinomes du colon a été évaluée par cytométrie en flux ainsi que par des mesures liées aux propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer. Les résultats ont montré que l'internalisation des nanocomplexes a bien lieu quelle que soit l'orientation de l'oligonucléotide mais que la cinétique de transport est dépendante de la densité.

L'oligonucléotide leurre utilisé dans cette étude a été conçu pour cibler la protéine STAT3 un facteur de transcription impliqué, entre autre, dans les processus de survie cellulaire. Les résultats que nous avons obtenus révèlent que suite à sa libération dans la cellule, l'oligonucléotide s'associe avec STAT3 ce qui conduit à la séquestration dans le compartiment cytoplasmique du complexe ainsi formé. L'inhibition du facteur de transcription entraîne alors une augmentation de la mortalité des cellules cancéreuses.

Enfin dans la dernière partie de ce manuscrit, nous avons vérifié que le processus d'assemblage par voie électrostatique pouvait être étendu à la complexation simultanée d'un oligonucléotide phosphorothioate, présentant donc des propriétés chimiques différentes, et d'un peptide cationique constitué de 15 arginines. En présence de sérum de veau fœtal ce

complexe s'est révélé être moins résistant que celui formé avec le seul oligonucléotide à squelette phosphodiester. Cependant cette association reste tout de même suffisamment stable pour que la nano-plateforme puisse délivrer sa cargaison au sein de cellules immunitaires (RAW 264.7) avec il est vrai un taux d'internalisation plus faible que pour le précédent complexe. Il pourrait être intéressant de poursuivre cette étude en utilisant une autre séquence peptidique et de tester ce système sur un modèle animal.

Annexes

ANNEXE I

I. EXPERIENCES UV

Les échantillons sont prélevés dans la solution mère et dilués dans une cuve jusqu'à un volume final de 1 mL à pH = 7,2. Les conditions salines standard sont 140 mM KCl, 10 mM NaCl et 10 mM cacodylate de sodium. La concentration en ARN est habituellement de 1 μ M. Lorsque d'autres conditions ont été utilisées elles sont précisées dans le texte.

Les cuves sont placées à 5°C dans un porte-échantillon dont la température est régulée par un bain à circulation. La température est mesurée par une sonde placée dans le porte-échantillon et le bain à circulation est programmé pour avoir une variation de température de 0,16°C par minute. Les échantillons sont alors chauffés une première fois à 85°C (dénaturation1, d1), refroidis jusqu'à 5°C (hybridation, h) et chauffés à nouveau à 85°C (dénaturation2, d2). Tout au long de l'expérience de dénaturation-hybridation-dénaturation l'absorbance est enregistrée à 257 et 330 nm en fonction de la température environ tous les 0,15 °C.

Les valeurs des températures de fusion (T_m) sont obtenues à partir de la température observée au maximum de la dérivée de la courbe de fusion.

II. OLIGONUCLEOTIDES ET PROTEINE HFQ

DsrA

Dans ces expériences 4 ARNs de longueurs différentes ont été utilisés : un oligonucléotide A8 de séquence 5'**AAGUGCUU**3' ($\epsilon = 81400 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), un oligonucléotide C14 de séquence 5'**CUUGC**UUAAGCAAG3' ($\epsilon = 138200 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), un oligonucléotide A22 de séquence 5'**AAGUGCUUCUUGC**UUAAGCAAG3' ($\epsilon = 219700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et la séquence DsrA de 87 nucléotides ($\epsilon = 787300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Chap. 2, **Figure 4**). A8, C14 et A22 ont été achetés lyophilisés à la société Eurogentec. Ils ont été mis en solution dans de l'eau ultra pure ne contenant pas de RNAses. La concentration des solutions mères était de 0,6 mM pour A8 et de 0,2 mM pour C14 et A22. DsrA nous a été fourni par l'équipe de Véronique Arluison; la concentration de la solution mère était de 70 nM.

dA₂₀-dT₂₀-Hfq

Les oligonucléotides dA₂₀ et dT₂₀ ont été achetés sous forme lyophilisée à la société Biotech et mis en solution dans de l'eau « ultrapure » (Millipore). Un spectre IR de contrôle a été effectué pour vérifier la pureté de l'échantillon. L'analyse des spectres a révélé pour chaque simple brin la présence d'impuretés dont les bandes d'absorptions masquaient des bandes marqueurs des acides nucléiques, en particulier une bande à 1670 cm⁻¹ de forte intensité masquant la bande du carbonyle C4=O4 des thymine. Les deux échantillons ont donc été purifiés par un système d'ultracentrifugation sur membrane (Millipore). Un spectre de contrôle pour chaque brin a été effectué après purification pour vérifier l'absence des impuretés observées lors du premier contrôle. Les solutions mères ont ensuite été dosées par UV. La concentration (C) de chaque solution a été déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon \cdot \ell \cdot C$ en utilisant des cuves de trajet optique ℓ de 1 cm et des coefficients molaires d'absorption ϵ de 8130 mole⁻¹.cm⁻¹.L pour le brin dT₂₀ et 12170 mole⁻¹.cm⁻¹.L pour le brin dA₂₀.

Le duplexe dA₂₀.dT₂₀ a été obtenu par un mélange stœchiométrique des solutions mères de chaque brin.

La protéine Hfq a été préparée dans le laboratoire de V. Arluison à l'IBPC selon leur protocole habituel.⁽¹⁾ La concentration de la protéine Hfq a été déterminée selon la formule empirique de Waddell : concentration de protéine en µg/mL = 144*(DO₂₁₅/DO₂₂₅). Cette formule permet d'obtenir la concentration d'une protéine en mesurant par UV la DO à 215 nm (DO₂₁₅) et à 225 nm (DO₂₂₅). La masse molaire utilisée pour déterminer le nombre de moles de protéine est 66200 g.mole⁻¹. Il s'agit de la masse molaire de la protéine sous sa forme stable c'est à dire la forme hexamérique.

III. EXPERIENCES INFRAROUGE**DsrA**

Les échantillons, prélevés directement dans les solutions mères, ont été évaporés progressivement sur une fenêtre en ZnSe puis dissous dans un volume final de 1 à 1,5 µL de solvant (H₂O ou D₂O) avant d'être recouverts par une seconde fenêtre de ZnSe. L'échantillon est alors placé dans un cryostat régulé en température avant d'enregistrer le spectre à la température souhaitée. Généralement 5 scans sont accumulés. La concentration en oligonucléotide lors de l'enregistrement des spectres était de 35 mM pour A8, 14 mM pour C14 et 13 mM pour A22.

dA₂₀-dT₂₀-Hfq

Le complexe a été préparé dans un volume de 2,5 mL avec un rapport de 1 hexamère de Hfq pour 7 paires de bases A-T soit à peu près 3 hexamères d'Hfq par double brin d'ADN. L'échantillon a été lyophilisé puis repris dans 20 µl de D₂O pour les spectres ATR soit une concentration finale en hexamère de 2 mM. Pour les spectres en transmission dans H₂O l'échantillon a été évaporé complètement puis repris dans 1,5 µL de solvant soit une concentration finale en hexamère de 20 mM.

Références bibliographiques

1. Arluison V, Folichon M, Marco S, Derreumaux P, Pellegrini O, Seguin J. The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq increases the stability of the hexamer. *Eur J Biochem.* 2004; **271**: 1258-1265.

ANNEXE II**I. ÉTUDE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE**

La spectroscopie IRTF (InfraRouge à Transformée de Fourier) est une technique appropriée à l'étude des acides nucléiques ou des protéines et qui permet de mettre en évidence leurs interactions. Cette technique rapide, relativement économique (# 100 µg pour un spectre) permet de travailler avec des échantillons en solution aqueuse ou non, sans limitation de taille en faisant varier les conditions d'étude (pH, concentration, température, ions ...). Il est aussi possible d'étudier l'influence de l'eau sur ces molécules biologiques en enregistrant des spectres ou l'échantillon est soumis à différents taux d'hydratation (variation de l'humidité relative (R.H.) de 0 à 100%).

L'étude des acides nucléiques en spectroscopie infrarouge a permis d'obtenir des bandes marqueurs spécifiques du type d'appariement des bases, de la conformation des sucres et des phosphates ainsi que de l'orientation relative des brins entre eux.⁽¹⁻⁴⁾ Les informations apportées par les spectres sont généralement réparties dans 4 régions spectrales.

Région de 1750 à 1500 cm⁻¹

Cette région est celle des vibrations d'élongations des doubles liaisons dans le plan des bases. Les bandes observées sont caractéristiques des appariements de ces bases (Watson-Crick, Hoogsteen...).

Région de 1500 à 1250 cm⁻¹

Ce domaine du spectre contient en particulier des bandes qui sont sensibles à la conformation anti ou syn des nucléosides (orientation de la base par rapport au sucre autour de la liaison glycosidique). On trouve aussi une bande marqueur de la géométrie des sucres de la thymidine (conformation Nord ou Sud).

Région de 1250 à 1000 cm⁻¹

Le spectre infrarouge des acides nucléiques présente deux bandes fortes dans ce domaine. La première est attribuée à la vibration d'élongation antisymétrique des groupements phosphates

(autour de 1230 cm^{-1} selon la conformation). La seconde bande située vers 1090 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation symétrique de ces mêmes groupements phosphates.

Région de $1000\text{ à }750\text{ cm}^{-1}$

C'est dans ce domaine ($1000\text{ à }800\text{ cm}^{-1}$) que l'on observe les bandes caractéristiques des conformations adoptées par les sucres. Sont aussi observées des bandes caractéristiques de l'absorption des bases impliquant les vibrations d'élongations des doubles liaisons hors du plan des bases ($800\text{ à }750\text{ cm}^{-1}$).

L'étude des protéines permet par un traitement mathématique (déconvolution du spectre) une estimation relative des structures secondaires : hélice α , feuillets β , structures en coudes...

La bande d'absorption amide I des protéines est principalement due à une vibration d'élongation des carbonyles. L'absorption de cette bande est forte et visible dans la région $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. La spectroscopie IRTF apporte des informations directes sur les modifications de la structure secondaire de la protéine. De plus dans le cas d'interactions protéine-ARN ou protéine-ADN il est tout à fait possible d'obtenir des informations sur les sites d'interactions au niveau de l'acide nucléique.

II. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (TEM)

Les nanoparticules ont été caractérisées en microscopie électronique à transmission à l'aide d'un microscope Philips FEI CM-10. Pour cela une goutte d'une solution de particules est déposée sur une grille de cuivre recouverte par une fine couche de carbone. A partir du cliché TEM, une courbe de distribution est alors établie en reportant la taille de chacune des particules contenues dans un échantillon statistique d'environ 100 particules. Le diamètre moyen des nanoparticules est obtenu en modélisant la courbe de distribution par une loi log normale.⁽⁵⁾

III. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS)

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta des nanoparticules ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière et électrophorèse laser Doppler en utilisant le Zetasizer Nano-ZS commercialisé par la société Malvern. Les mesures sont effectuées à 25°C , avec environ 1 mL d'une solution de particule à une concentration en fer proche de 5.10^{-4} M . Préalablement à la mesure, la solution est soumise à sonication pendant 30 secondes.

La DLS mesure la vitesse de diffusion des particules soumises au mouvement brownien grâce à la spectroscopie à corrélation de photons qui permet d'observer, en fonction du temps, le « speckle » produit par l'illumination des particules avec un laser. Les variations de la lumière diffusée par les nanoparticules sont ensuite analysées par un autocorrélateur et un coefficient de diffusion des particules est alors calculé à partir de la fonction d'autocorrélation obtenue. En dehors de la température (T) et de la viscosité (η) du solvant, la vitesse de déplacement d'une particule dépend directement de sa taille et le calcul de la distribution peut être établi à partir de la relation de Stokes-Einstein, équation (1).

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Dans cette équation, k est la constante de Boltzmann et D le coefficient de diffusion translationnelle qui rend compte de la vitesse de déplacement de la particule. A la différence des mesures de taille obtenues en TEM, le diamètre hydrodynamique (d_H) est la somme de la taille de la particule et de l'épaisseur de la couche d'hydratation qui l'entoure, **Figure 1**.

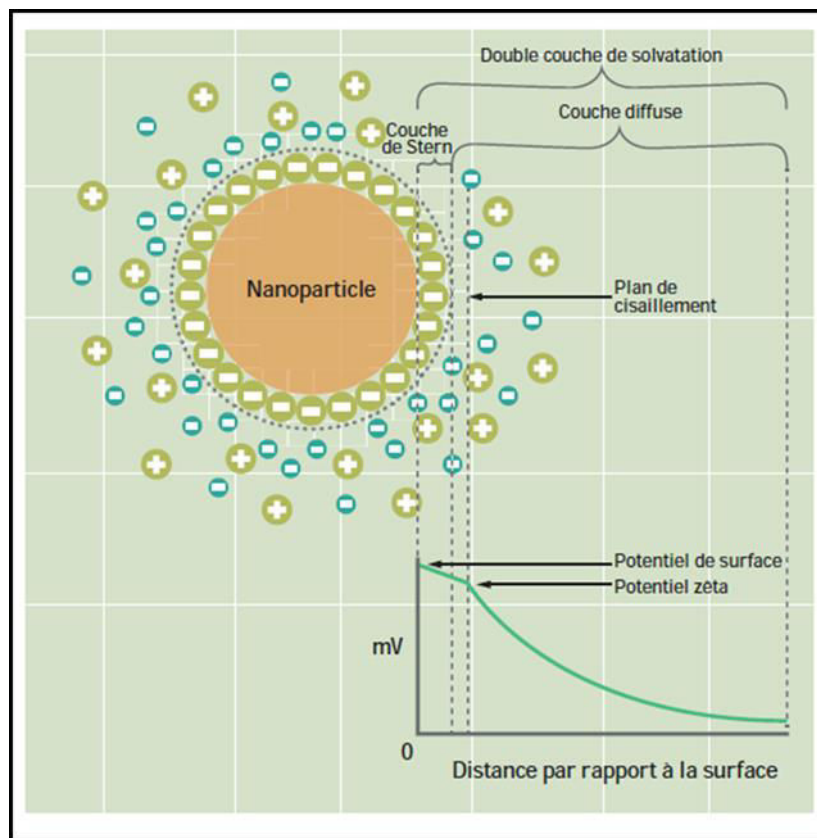


Figure 1 : Modélisation de la couche de solvation entourant une particule en solution. (D'après document Malvern)

En fonction du modèle mathématique appliqué aux données brutes, le logiciel de traitement permet de représenter une distribution de la taille hydrodynamique de plusieurs façons différentes. Pour une population monomodale la méthode dite « des cumulants » permettra d'obtenir une taille moyenne que l'on appelle Z-Average. Ce résultat est fortement influencé par les particules de plus grande taille qui diffusent la lumière avec une plus grande intensité. Pour des populations multimodales, ou monomodales, d'autres traitements mathématiques permettent d'obtenir la distribution en fonction de l'intensité de la lumière diffusée, du volume des particules ou du nombre de particules.⁽⁶⁾

Le potentiel zêta est la différence de potentiel entre la particule et la deuxième couche de solvation au niveau du plan de cisaillement, **Figure 1**. Ainsi, la charge de la particule dans un milieu défini dépend de la charge de surface mais aussi de la concentration et du type d'ions présents dans la solution. Cette charge contribue fortement à la stabilité colloïdale des solutions de nanoparticules d'oxyde de fer et la stabilité de la dispersion peut-être altérée en modifiant les paramètres physicochimiques de la solution. Le potentiel zêta, la charge, des particules est obtenue en mesurant leur mobilité électrophorétique. En présence d'un champ électrique, la vitesse à laquelle se déplacent des particules chargées est régie par l'intensité du champ appliqué et leur potentiel zêta. A partir de l'intensité du champ électrique appliqué, la mesure de la vitesse de déplacement, en utilisant l'effet Doppler, permet de calculer le potentiel zêta.

Références bibliographiques

1. Tsuboi M, Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids. *in: E.G.J. Brame (Ed.), Applied Spectroscopy Reviews, Dekker, New York 1969; 45-90.*
2. Liquier J, Taillandier E. Infrared spectroscopy of nucleic acids. In: Mantsch HH, Chapam D, editors. *Infrared spectroscopy of biomolecules*. New York: Wiley-Liss; **1996**. p. 131-158.
3. Taillandier E, Liquier J. *Vibrational Spectroscopy of Nucleic Acids in Handbook of Vibrational Spectroscopy (2002)*, J. M. Chalmers and P. R. Griffith Ed., Wiley Pub. Co., pp3465-3480.
4. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys. Chem.* **2003**; 104: 477-488.
5. De Montferrand C, Lalatonne Y, Bonnin D, Lievre N, Lecouvey M, Monod P, Russier V, Motte L. Size-dependent nonlinear weak-field magnetic behavior of maghemite nanoparticles. *Small* **2012**; 8: 1945-1956.
6. Lim JK, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**; 8: 381.

ANNEXE III

I. COLORATION DE PERLS

Cette technique de coloration permet de mettre en évidence, en milieu cellulaire, la présence d'ions fer III, qui sous l'action du ferrocyanure de potassium vont former un précipité de ferrocyanure ferrique. Ce précipité, de couleur bleu-vert, est ensuite observé en microscopie optique. Pour ce faire, les cellules sont tout d'abord lavées deux fois avec un tampon PBS puis fixées sur une lame pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde. Après deux lavages au PBS, les lames sont immergées, pendant 30 minutes à 37°C, dans une solution HCl 1 M contenant 2% de ferrocyanure de potassium (V/V). Les lames sont ensuite lavées au PBS et séchées à l'air pendant 30 minutes avant d'être observées en microscopie.

II. COLORATION AU DAPI

Le DAPI est un fluorochrome qui se lie fortement aux séquences d'acides nucléiques riches en paires AT (Adénine et Thymine). Lorsqu'il est excité à 350 nm, il émet une lumière fluorescente bleue brillante. Sa liaison à l'ADN génomique permet donc de révéler, par microscopie de fluorescence, la zone nucléaire au sein d'une cellule. Après avoir été lavées, trois fois, au PBS, les cellules sont fixées sur une lame avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Au bout de 5 minutes, les cellules sont à nouveau rincées au PBS et marquées avec une solution de DAPI à 1 µg/mL pendant 3 minutes. Après un dernier lavage au PBS, les cellules sont montées entre lame et lamelle dans une solution de Mowiol pour être observées en microscopie de fluorescence.

III. DETECTION DE LA MORTALITE CELLULAIRE

La mortalité cellulaire a été évaluée après 48 heures d'incubation soit par comptage manuel avec du bleu Trypan, soit par cytométrie en flux en marquant les cellules par de l'iodure de propidium (IP) et de l'annexine V. Le double marquage IP-AnnexineV, permet de distinguer les cellules en nécrose (mort induite) des cellules en apoptose (mort cellulaire programmée). A l'instar du BET, l'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN dont la fluorescence dans le rouge va être exacerbée lors de sa liaison à l'ADN. L'annexine V est une protéine, modifiée par ajout d'un fluorophore (FITC), ayant une forte affinité pour la phosphatidylsérine, un phospholipide normalement présent sur la face intérieure de la membrane plasmique. Le marquage au bleu de Trypan, ou à l'iodure de propidium, va

permettre de quantifier la mort cellulaire à un stade avancé, dans lequel les membranes cellulaires sont devenues perméables à ces molécules, permettant ainsi la coloration du cytoplasme par le bleu de Trypan, ou la liaison de l'iodure de propidium avec l'ADN nucléaire. Le marquage à l'annexine V permet lui, de détecter la mort cellulaire à un stade plus précoce, dans lequel les membranes ne sont pas complètement perméabilisées mais fortement perturbées par un flip-flop des phosphatidylsérines vers l'extérieur de la membrane plasmique, permettant à l'annexine de s'y lier.

Pour mesurer la mort cellulaire par double marquage IP/AnnexineV, les cellules sont suspendues dans une solution contenant l'annexine V (Binding buffer), en présence d'iodure de propidium, selon le protocole du fournisseur (BD Pharmingen, Morangis, France), avant d'être analysées par cytométrie en flux.

Pour mesurer la mort cellulaire par marquage au bleu de Trypan, on ajoute à une suspension cellulaire quelques μL d'une solution diluée de bleu de Trypan (0,4%). On dépose ensuite environ 15 μL de cette suspension sur une cellule de Malassez pour effectuer un comptage manuel des cellules sous microscope optique.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude, par spectroscopie optique, des interactions que peuvent avoir des acides nucléiques entre eux ou avec des surfaces de différentes natures telles que des protéines ou des nanoparticules inorganiques. Dans une première partie, nous présentons une étude structurale, réalisée par spectroscopies UV et IR sur des séquences nucléotidiques contenues dans DsrA, un ARN non-codant. Plusieurs modèles d'auto-association sont proposés. Dans une deuxième partie, l'association de la protéine Hfq avec un duplexe dA₂₀-dT₂₀ est étudiée par spectroscopie IR. Cette interaction se produit via une ouverture partielle de la double-hélice et une transition conformationnelle des sucres du brin purine. Dans une troisième et quatrième partie, nous nous intéressons à la vectorisation d'oligonucléotides et de peptides. Différentes stratégies de fonctionnalisation de surface de nanoparticules de maghémite sont explorées et l'efficacité des nano-vecteurs est évaluée *in vitro*.

Study of nucleic acids interactions with biomacromolecules and nanoparticles - Vectorization

In this work, we were interested in the study, by optical spectroscopy, of the interactions that may have nucleic acids between them or with surfaces of various types such as proteins, or inorganic nanoparticles. In the first part, we present a structural study by UV and IR spectroscopy on nucleotide sequences contained in DsrA, a non-coding RNA. Several models of self-association are proposed. In the second part, the association of the Hfq protein with a duplex dA₂₀-dT₂₀ is studied by IR spectroscopy. This interaction occurs via a partial opening of the double-helix and a conformational transition of the sugars of the purine strand. In the third and fourth part, we are interested in the vectorization of oligonucleotides and peptides. Different strategies of maghemite nanoparticles surface functionalization are explored and the effectiveness of nano-vectors is assessed *in vitro*.

CHIMIE

Mots-clés: acides nucléiques, spectroscopie, nanoparticules, vectorisation

Laboratoire CSPBAT, UMR CNRS 7244, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY