



HAL
open science

Synthèses et études d'oligonucléotides amphiphiles à visée thérapeutique

Sébastien Benizri

► **To cite this version:**

Sébastien Benizri. Synthèses et études d'oligonucléotides amphiphiles à visée thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT: 2018BORD0116. tel-03081190

HAL Id: tel-03081190

<https://theses.hal.science/tel-03081190>

Submitted on 18 Dec 2020

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : INTERFACE CHIMIE BIOLOGIE

Par Sébastien BENIZRI

**SYNTHÈSES ET ÉTUDES D'OLIGONUCLÉOTIDES
AMPHIPHILES À VISÉE THÉRAPEUTIQUE**

Sous la direction de : Philippe BARTHÉLÉMY

Soutenue le 11 juillet 2018

Membres du jury :

M. STRAZEWSKI, Pierre
M. STULZ, Eugen
Mme. MOUMNÉ, Lara
Mme. ROCCHI, Palma
M. BARTHÉLÉMY, Philippe

Professeur Université de Lyon 1
Professeur Université de Southampton
Ingénieur de Recherche INSERM Transfert
Chargée de Recherche Université de Aix-Marseille
Professeur Université de Bordeaux

Rapporteur – Président du jury
Rapporteur
Examineur
Invitée
Directeur de Thèse

CHEM_{BIO}PHARM

Équipe ChemBioPharm
Dirigée par le Professeur Philippe Barthélémy

Laboratoire ARNA (ARN : Régulations Naturelle et Artificielle) INSERM U1212 –
CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux

Bâtiment de Pharmacie, 3^{ème} tranche, 4^{ème} étage, 146 Rue Léo Saignat – 33076
Bordeaux cedex, France



Remerciements :

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Louis Mergny, directeur de l'unité ARNA INSERM U1212, CNRS UMR 5320, pour son accueil au sein de son établissement.

Mes sincères remerciements vont au Professeur Philippe Barthélémy pour m'avoir encadré au cours de ces 3 ans de thèse. Sa disponibilité et son amabilité m'ont permis de m'épanouir tout au long de ce doctorat.

Je suis reconnaissant envers mon jury de thèse, le Professeur Pierre Strazewski, le Professeur Eugen Stulz ainsi que le Docteur Lara Mourné. C'est un immense honneur que vous me faites en acceptant d'être juge de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon respect.

Mes remerciements les plus sincères au Docteur Lara Mourné pour ces années de collaboration, sa bonne humeur et son professionnalisme à travers les différents projets associés.

Un grand merci à l'Inserm Transfert pour avoir soutenu et financé ce projet.

Je souhaite de plus exprimer ma gratitude au Docteur Palma Rocchi et son équipe pour cette belle collaboration.

Je remercie également tous les collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Je suis reconnaissant envers toute l'unité U1212 dans laquelle ma carrière a commencé, et particulièrement grâce au Docteur Cathy Staedel qui m'a donné goût à la recherche par sa motivation, sa persévérance et sa rigueur scientifique. Je n'oublie pas le Docteur Laurent Azéma pour son aide sur la chromatographie préparative, les expériences de T_m et le traitement des données, mais aussi Kati Ba Pierozzi pour m'avoir beaucoup aidé pour l'organisation des contrats et des missions.

De plus, je remercie l'ensemble du laboratoire ChemBioPharm, aussi bien l'équipe de chimie organique, de chimie analytique que celle de physico-chimie, et plus particulièrement le Docteur Arnaud Gissot et Brune Vialet pour leurs compétences en matière d'oligonucléotides, le Docteur Laurent Latxague pour le projet commun sur le Bola F, le Docteur Tina Kauss pour la collaboration sur la résistance aux antibiotiques mais aussi pour son sourire au quotidien ainsi que le Docteur Alexandra Gaubert pour

son expertise en rhéologie, ses relectures sévères, les longues soirées au laboratoire et sa bonne humeur journalière. Je remercie aussi bien entendu le Professeur Sylvie Crauste-Manciet, le Docteur Valérie Desvergues, le Docteur Nitin Bansode pour leur gentillesse au laboratoire, le Docteur Jessica Labarre-Lainé (ainsi que Jildun) pour ses relectures du manuscrit ainsi que Julien Verget pour sa joie de vivre et ses belles expressions. Merci aussi à Jacques pour sa bonne humeur et ses anecdotes.

Je remercie également le laboratoire de chimie analytique, et plus spécialement le Professeur Karen Gaudin, le Docteur Ludivine Ferey et le Docteur Bruno Aliès pour leur expertise dans le domaine de la chimie analytique mais aussi pour leur sourire et leur amabilité.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, et particulièrement au Docteur Katell Bathany pour toutes les analyses de spectrométrie de masse.

Mes remerciements vont aussi au laboratoire de pharmacochimie, notamment le Professeur Jean Guillon, le Docteur Sandra Rubio et Solène Savrimoutou.

Les collaborations avec le pôle électronique du BIC m'ont permis d'acquérir de fortes connaissances dans les expériences de MET. Tout cela, je le dois à tous les membres du laboratoire, notamment au Docteur Étienne Gontier, Sabrina Lacomme et Mélina Petrel.

Pour les futurs docteurs, je remercie bien entendu le caporal-chef Julie Baillet pour son aide précieuse sur la rédaction, Aladin Hamoud pour ses compétences en chimie mais aussi en matière de soirée, Guillaume Bouguéon pour sa sympathie, Koffi Mawussé Kowouvi pour le partage du bureau et son sourire, mais aussi Pierre Vigié pour les nombreux RU (et ton anniversaire) ! Mr Geoffrey Prévot, merci pour ces trois ans, aussi bien pour le travail, les pauses café, les soirées et les bières partagées ! Ne vous en faites pas, c'est bientôt votre tour.

Je pense également au nombreux stagiaires qui sont passés au laboratoire, notamment Marion, Emmanuelle, Matthieu, Alice, Marine, Yasmine, Huyen, Amelle, Mégane, Léa, Victor, Bérangère sans oublier Antoine et Constantin. J'ai passé de très bons moments avec certains d'entre vous que je compte désormais comme des amis et non plus comme des stagiaires ! Un grand merci à Marc, je suis heureux d'avoir fait ta connaissance d'abord en stage, puis ensuite en véritable ami !

Je remercie aussi le Docteur Sybille Kennel et Ananda Appavoo qui m'ont abandonné pour partir au soleil ! Bien sûr, je n'oublierai pas le Docteur Michaël Ramin qui m'a beaucoup aidé et avec qui j'ai pris plaisir à travailler.

Enfin, je remercie mes parents, Nicolas et Alexandre ainsi que Claire et Marine pour m'avoir soutenu, aidé etc etc. et tout simplement d'être là.

Mes remerciements vont bien entendu à tous mes amis qui ont été présents dans cet épisode de ma vie, que ce soit Romain pour cette colocation mémorable, Antoine et Anabel pour le master et le voisinage, les jeunes mariés Andy et Pooja, la petite famille Gerbier dont Cyril que je connais depuis maintenant plus de vingt ans, Émilie, et les 2 petites puces, la petite Capucine qui m'a permis de décorer mon bureau par ses beaux dessins et la petite Juliette ! Je pense également à mes amies de prépa Marie, Jessica et Lydia. Merci aussi à Isaura et Mohamed pour tous les moments passés depuis plusieurs années. Mes pensées vont également à Clément, Julie et Sandy pour ces étés à Bordeaux mais surtout pour cette petite Malgache, Anjara, que j'ai eu la chance de rencontrer lors de cette aventure !

Communications orales :

Targeting TCTP signaling pathway as a therapeutic Strategy in Castration-resistant Prostate Cancer

S. Karaki, R. Mejias, T. Nguyen, S. Benizri, P. Barthélémy, P. Rocchi
Colloque du Cancéropôle PACA, Marseille, France - 14 Janvier 2016

TCTP inhibition by specific antisense oligonucleotide lipid moiety-modified as a new therapeutic strategy to restore hormone- and chemo-sensitivity for the treatment of therapy-resistant prostate cancer

M. De Villeneuve, S. Karaki, S. Benizri, P. Barthélémy, P. Rocchi
24^{ème} Journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate, Paris, France – 18 Novembre 2015

Communications affichées :

Nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant RECQL4 dans les cancers du sein de sous-type luminal B

S. Benizri, C. Staedel, B. Vialet, M. Chaffanet, P. Barthélémy
Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Toulouse, France - 16 et 17 Octobre 2014

Lipid oligonucleotide conjugates: a new tool for nanomedicine

S. Benizri, S. Karaki, B. Vialet, A. Gissot, P. Rocchi, P. Barthélémy
European Nanomedicine Meeting, SF Nano, Grenoble, France – 7 au 9 Décembre 2015
Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France – 6 Avril 2016

Targeting Hsp27 stress-induced signaling pathways using combined RNA-based nanotherapies in Castrate-Resistant Prostate Cancer

C. Cherif, S. Karaki, H. Ziouziou, R. Mejias, T. Nguyen Dang, S. Benizri, M. Camplot, O. Siri, P. Barthélémy, P. Rocchi
Retraite du CRCM, Carry le Rouet, France – 8 et 9 Novembre 2016

Amphiphilic oligonucleotides: a route of new supramolecular drugs

S. Benizri, S. Karaki, B. Vialet, A. Gissot, P. Rocchi, P. Barthélémy
SupraBio, Pessac, France – 6 et 7 Octobre 2016
Siric Brio, Pessac, France – 15 Novembre 2016
European Nanomedicine Meeting, SF Nano, Paris, France – 12 au 14 Décembre 2016
Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale, Bordeaux, France – 12 Avril 2017

Targeting Menin as new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer

C. Cherif, A. El Kawtheri, T. Nguyen Dang, S. Benizri, L. Fazli, P. Barthélémy, M. Gleave, P. Rocchi
25^{ème} Journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate, Paris, France – 16 Novembre 2016

Autonovectorized TCTP-lipid modified antisense oligonucleotide improve stability cell uptake, and efficiency in Castration-Resistant Prostate Cancer

S. Karaki, R. Mejias, T. Nguyen, **S. Benizri**, P. Barthélémy, P. Rocchi
25^{ème} Journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate, Paris, France – 16 Novembre 2016

Étude chromatographique de lipides oligonucléotides par IP-RPLC et HILIC

E. Pau, L. Ferey, **S. Benizri**, B. Vialet, E. Stulz, P. Barthélémy, K. Gaudin
Congrès de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, Paris, France – 28 au 30 Mars 2017

Nucleoside-lipid-based nanocarriers for sorafenib delivery

S. Benizri, S. Karaki, B. Vialet, A. Gissot, P. Rocchi, P. Barthélémy
Young Scientist Symposium, Pessac, France – 18 et 19 Mai 2017

Lipid-oligonucleotides technology: a smart tool for nucleic acid delivery

S. Benizri, S. Karaki, B. Vialet, A. Gissot, P. Rocchi, P. Barthélémy
Journée Scientifique de la FR TecSan, Pessac, France – 22 Juin 2017

Prix du meilleur Poster 

Delivery of nucleic acids and anticancer drugs using Lipid-oligonucleotide technology

S. Benizri, A. Gissot, B. Vialet, S. Karaki, P. Rocchi, P. Barthélémy
Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, Bordeaux, France – 24 au 27 Septembre 2017

Enhance TCTP antisense delivery and efficiency using Lipid moiety modification to restore treatment sensitivity of Castration-resistant Prostate Cancer

S. Karaki, **S. Benizri**, R. Mejias, V. Baylot, N. Branger, T. Nguyen, B. Vialet, K. Oumzil, P. Barthélémy, P. Rocchi
Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, Bordeaux, France – 24 au 27 Septembre 2017

Large scale proteomic approach reveals Menin as new Hsp27 client protein involved in prostate cancer progression

C. Cherif, T. Nguyen Dang, A. El Kawtheri, **S. Benizri**, L. Fazli, M. Gleave, P. Barthélémy, P. Rocchi
26^{ème} Journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate, Paris, France – 15 Novembre 2017
10th African Congress of Immunology, Immunologie pour la santé, Hammamet, Tunisie – 3 au 7 Décembre 2017

Lipid-oligonucleotide technology for delivery of nucleic acids and anticancer drugs

S. Benizri, A. Gissot, B. Vialet, S. Karaki, P. Rocchi, P. Barthélémy

European Nanomedicine Meeting, SF Nano, Talence, France – 5 au 7 Décembre 2017

Brevet :

Antisense Oligonucleotides effective to reduce the expression of menin in cancer cells of a subject – EP Patent EP16 305 135.2 - 2016

P. Rocchi, C. Cherif, **S. Benizri**, P. Barthélémy, A. El Kaoutari

Publications :

pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems

K. Oumzil, **S. Benizri**, G. Tonelli, C. Staedel, A. Appavoo, M. Chaffanet, L. Navailles, P. Barthélémy

ChemMedChem, 10 (11) pp. 1797 – 1801, **2015**, DOI: 10.1002/cmdc.201500381

Uracile based glycosyl-nucleoside-lipids as low molecular weight organogelators

M.A. Ramin, J. Baillet, **S. Benizri**, L. Latxague, P. Barthélémy

New Journal of Chemistry, 40 (12) pp. 9903 – 9906, **2016**, DOI: 10.1039/C6NJ02675C

Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-antisense in castration-resistant prostate cancer

S. Karaki, **S. Benizri**, R. Mejías, V. Baylot, N. Branger, T. Nguyen, B. Vialet, K. Oumzil, P. Barthélémy, P. Rocchi

Journal of Controlled Release, 258 pp. 1 – 9, **2017**, DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.04.042

Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery

S. Benizri, L. Ferey, B. Alies, N. Mebarek, G. Vacher, A. Appavoo, C. Staedel, K. Gaudin, P. Barthélémy

Nanoscale Research Letters, 13 pp. 17 – 24, **2018**, DOI: 10.1186/s11671-017-2420-2

Table des matières

TABLE DES TABLEAUX	16
TABLE DES ANNEXES	16
LISTE DES ABREVIATIONS	17
I. INTRODUCTION	21
A. MECANISMES DE REGULATION DE LA TRADUCTION	22
B. MODIFICATIONS CHIMIQUES DES OLIGONUCLEOTIDES ET MECANISMES D'INHIBITION ASSOCIES	29
C. INTERNALISATION CELLULAIRE DES OLIGONUCLEOTIDES	35
D. UTILISATION DE CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDIQUES	38
1. GALNAC	38
2. PEPTIDES - <i>CELL PENETRATING PEPTIDE</i> (CPP)	41
3. A-TOCOPHEROL	43
4. APTAMERES	44
5. ANTICORPS	45
6. CHOLESTEROL	46
7. SQUALENE	48
8. ACIDES GRAS	49
E. APPLICATION THERAPEUTIQUE DES OLIGONUCLEOTIDES	52
1. TRAITEMENT DE LA RETINITE A CYTOMEGALOVIRUS PAR UN ASO	53
2. TRAITEMENT DE LA DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'ÂGE PAR UN APTAMERE	54
3. TRAITEMENT DE MALADIES CARDIOVASCULAIRES PAR UN ASO	55
4. TRAITEMENT DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD) PAR « EXON SKIPPING »	56
5. TRAITEMENT DE L'ATROPHIE MUSCULAIRE SPINALE (SMA) PAR L'INCLUSION D'EXONS	58
6. TRAITEMENT DE LA MALADIE VEINO-OCCLUSIVE HEPATIQUE SEVERE PAR UN MELANGE D'OLIGONUCLEOTIDES NATURELS	61
7. TRAITEMENT DE L'AMYLOSE HEREDITAIRE A TRANSTHYRETINE (ATTR) AVEC POLYNEUROPATHIE PAR DEGRADATION DE L'ARNM	61
F. PRESENTATION DU PROJET	65
II. CHIMIE ET PHYSICO-CHIMIE DES OLIGONUCLEOTIDES	67
A. CHIMIES DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS ET DES CONJUGUES	67
B. SYNTHESE AUTOMATISEE D'OLIGONUCLEOTIDES AMPHIPHILES	67
C. STABILITE CHIMIQUE DU LASO SS EN CONDITION REDUCTRICE	71
D. COMPORTEMENT DES CONJUGUES NUCLEOLIPIDE-OLIGONUCLEOTIDES EN MILIEU AQUEUX	73
1. DETERMINATION DE LA TENSIONNOMETRIE DE SURFACE	73
2. ANALYSE CONDUCTIMETRIQUE DES LASO EN MILIEU AQUEUX	76
E. ANALYSE DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLECULAIRE DES LASO	77
1. ANALYSE DE DIFFRACTION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS)	77
2. VISUALISATION DES OBJETS SUPRAMOLECULAIRES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	79
F. INFLUENCE DE LA MODIFICATION NUCLEOLIPIDIQUE SUR L'HYBRIDATION DE L'OLIGONUCLEOTIDE A SA SEQUENCE COMPLEMENTAIRE	83
III. ACTIVITES BIOLOGIQUES	87
A. UTILISATION DES CONJUGUES LASO DANS LE CANCER DE LA PROSTATE RESISTANT A LA CASTRATION	87
B. MECANISME D'ACTION DU LASO	99
C. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE <i>IN VITRO</i> DES DIFFERENTS CONJUGUES LASO	101

IV. FORMULATION D'AGENTS THERAPEUTIQUES	103
A. FORMULATION D'UN NOUVEAU COMPOSE DERIVE DE PHENAZINE	103
1. CARACTERISATION DES COMPLEXES LASO / PH 14	105
2. ACTIVITE <i>IN VITRO</i> DES COMPLEXES LASO / PH 14	107
B. FORMULATION DE LA DOXORUBICINE PAR LES LASO	109
C. FORMULATION DE SORAFENIB PAR DES NUCLEOLIPIDES	111
D. HYDROGEL A PARTIR DE LASO	121
E. CONCLUSION DE LA FORMULATION	127
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	129
VI. MATERIELS ET METHODES	133
A. SYNTHESSES DES OLIGONUCLEOTIDES ET DES NUCLEOLIPIDE-OLIGONUCLEOTIDES	133
B. CHROMATOGRAPHIE DES OLIGONUCLEOTIDES	143
1. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE	143
2. PURIFICATION DES OLIGONUCLEOTIDES	144
3. DESSALAGE DES ECHANTILLONS	146
4. CONTROLE DE LA MASSE DES OLIGONUCLEOTIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	147
5. LYOPHILISATION DES ECHANTILLONS	148
C. DETERMINATION DE LA STABILITE CHIMIQUE DU LASO SS EN CONDITION REDUCTRICE	148
D. DETERMINATION DE LA FORMATION D'OBJET SPONTANEE EN MILIEUX AQUEUX	148
1. CONDUCTIMETRIE DES NUCLEOLIPIDE-OLIGONUCLEOTIDES DANS L'EAU DISTILLEE	148
2. ANALYSE PAR TENSIOMETRIE DE SURFACE	149
E. ANALYSE DES NANO-OBJETS PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	149
F. DETERMINATION DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	149
G. ANALYSE DU POTENTIEL ZETA PAR ÉLECTROPHORESE LASER DOPPLER	150
H. ÉTUDE DE LA STABILITE THERMIQUE DES OLIGONUCLEOTIDES	150
I. ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	151
1. CONDITIONS DE CULTURE CELLULAIRE	151
2. ÉTUDE DE TRANSFECTION	151
3. VIABILITÉ CELLULAIRE	152
4. ÉVALUATION DE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT	152
J. ÉTUDES DU MECANISME D'ACTION DU LASO	153
K. ÉTUDE <i>IN VIVO</i>	154
1. TRAITEMENT DES ANIMAUX PAR LES OLIGONUCLEOTIDES	154
2. ANALYSES BIOCHIMIQUES	154
3. ANALYSES STATISTIQUES	155
L. FORMULATION DE LASO/DERIVE DE PHENAZINE	155
M. FORMULATION DE LASO/DOXORUBICINE	156
N. FORMULATION NUCLEOLIPIDE / SORAFENIB	156
O. ÉTUDE DE STABILITE COLLOÏDALE	157
P. PROTOCOLE DE GELIFICATION DU LASO DANS LES MILIEUX AQUEUX	157
Q. ÉTUDE RHEOLOGIQUE DU LASO A 10 % (M/M) DANS LE PBS	157
VII. ANNEXES	160
REFERENCES :	171

Table des figures

<i>Figure 1 : Mécanisme d'inhibition de la traduction par des siARN</i>	23
<i>Figure 2 : Structure de l'ADN double brin et mécanismes d'action des oligonucléotides antisens</i>	26
<i>Figure 3 : Modifications chimiques utilisées en synthèse d'oligonucléotides</i>	30
<i>Figure 4 : Schéma de stratégies de formulation pour la délivrance d'ASO et de siARN</i>	38
<i>Figure 5 : Schéma et structure moléculaire du GalNAc</i>	39
<i>Figure 6 : Schéma du principe d'internalisation cellulaire par les oligonucléotides conjugués au GalNAc</i>	40
<i>Figure 7 : Stratégie de greffage du CPP sur le siARN</i>	42
<i>Figure 8 : Structure moléculaire d'un oligonucléotide conjugué au cholestérol photoclivable</i>	47
<i>Figure 9 : Schéma de la conjugaison du cholestérol par un lien PTO (gauche) ou phosphodiester (droite)</i>	48
<i>Figure 10 : Structure moléculaire du squalène</i>	48
<i>Figure 11 : Structure moléculaire du GRN163L</i>	49
<i>Figure 12 : Stratégie de couplage du cholestérol et du GalNAc sur un oligonucléotide</i>	52
<i>Figure 13 : Structure moléculaire du Fomivirsen, substance active du Vitravene[®]</i>	54
<i>Figure 14 : Structure secondaire du Pegaptanib, substance active du Macugen[®]</i>	55
<i>Figure 15 : Structure moléculaire du Mipomersen sodique, substance active du Kynamro[®]</i>	56
<i>Figure 16 : Structure moléculaire de l'étéplirsén, substance active de l'exondys 51[®]</i>	57
<i>Figure 17 : Principe du mécanisme d'action de l'étéplirsén dans le traitement par saut de l'exon 51 dans la dystrophie musculaire de Duchenne</i>	58
<i>Figure 18 : Structure moléculaire du Nusinersén sodique, substance active du Spinraza[®]</i>	59
<i>Figure 19 : Mécanisme d'action du Nusinersén</i>	60
<i>Figure 20 : Frise chronologique des principales découvertes pour les oligonucléotides thérapeutiques</i>	64
<i>Figure 21 : Structure moléculaire du phosphoramidite nucléolipidique</i>	68
<i>Figure 22 : Structures moléculaires du LASO et du LASO SS</i>	68
<i>Figure 23 : Chromatogrammes des oligonucléotides ASO et contrôle Scr ainsi que leurs conjugués lipidiques respectifs</i>	70
<i>Figure 24 : Analyses qualitatives des oligonucléotides synthétisés</i>	71
<i>Figure 25 : Réduction du pont disulfure du LASO SS</i>	72
<i>Figure 26 : Analyses HPLC de la stabilité du LASO SS en présence de DTT</i>	72
<i>Figure 27 : Clivage du LASO SS en condition réductrice</i>	73
<i>Figure 28 : Variation de la tension de surface des LASO dans l'eau distillée en fonction de leur concentration</i>	74
<i>Figure 29 : Variation de la tension de surface des LASO dans le PBS</i>	75
<i>Figure 30 : Conductimétrie du LASO dans l'eau distillée</i>	76
<i>Figure 31 : Caractérisation des nano-objets formés par les LASO à 30 µM en DLS</i>	78
<i>Figure 32 : Courbe de DLS du LASO solubilisé dans l'eau distillée à 150 µM</i>	79
<i>Figure 33 : Images de MET des solutions à 30 µM de LScr (gauche) et de LASO (droite) dans une solution aqueuse de 0,9 % en masse de NaCl</i>	80
<i>Figure 34 : Observation en MET d'une particule de LASO d'environ 200 nm après coloration à l'acétate d'uranyle</i>	81
<i>Figure 35 : Images de MET des assemblages supramoléculaires de LASO contrastés au tétra-oxyde de ruthénium</i>	82
<i>Figure 36 : Influence de la séquence et de la conjugaison nucléolipidique sur l'hybridation de l'oligonucléotide avec son complémentaire en série ADN PTO</i>	83
<i>Figure 37 : Influence des modifications chimiques sur la température de fusion des oligonucléotides ASO et LASO (gauche) et exemple d'une cinétique de déshybridation du duplexe LASO 3' / ARN (droite)</i>	84
<i>Figure 38 : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante des oligonucléotides inhibiteurs avec l'ARN complémentaire et la RNase H</i>	99
<i>Figure 39 : Western Blot montrant l'effet inhibiteur des différentes conjugaisons LASO</i>	101
<i>Figure 40 : Structure moléculaire d'une phénazine utilisée comme colorant, le rouge neutre</i>	103
<i>Figure 41 : Structure moléculaire du dérivé phénazine (Ph 14)</i>	104
<i>Figure 42 : Mesure du diamètre hydrodynamique de la formulation LASO / Ph 14</i>	105
<i>Figure 43 : Mesure de la charge globale de surface des particules de Ph 14 formulées avec le LASO</i>	105
<i>Figure 44 : Stabilité colloïdale de la formulation LASO / Ph 14 conservée à 4 °C</i>	106
<i>Figure 45 : Observation microscopique à un grossissement x 200.000 des formulations LASO / Ph 14</i>	106
<i>Figure 46 : Dose réponse de Ph 14 non encapsulé (Ph 14), du DMSO (DMSO) et des nanoparticules LASO / Ph 14 (Nano ph 14/ TCTP-LASO) sur une culture de cellules PC-3</i>	107

Figure 47 : Structure moléculaire de la doxorubicine	109
Figure 48 : Caractérisation des nano-objets de LASO / Doxorubicine formulés par SNALP	110
Figure 49 : Structure moléculaire du sorafénib, substance active du Nexavar®	111
Figure 50 : Comportement macroscopique des oligonucléotides à 25 % (m/m) dans l'eau distillée	121
Figure 51 : Comportement macroscopique des oligonucléotides en présence de PBS	122
Figure 52 : Comportement du LASO à 10 % (m/m) dans le PBS observé en MET	123
Figure 53 : Détermination du LVER du gel formé par le LASO à 10 % (m/m) dans le PBS	124
Figure 54 : Modules élastique G' et visqueux G'' de l'hydrogel formé par le LASO à 10 % (m/m) dans le PBS en fonction de la température	125
Figure 55 : Etude de thixotropie de l'hydrogel LASO à 10 % (m/m) dans le PBS	126
Figure 56 : Schéma récapitulatif des projets de recherche utilisant la technologie des nucléolipide-oligonucléotides en collaboration avec l'équipe ChemBioPharm	132
Figure 57 : Cycle de synthèse automatisée d'oligonucléotides sur support solide	134
Figure 58 : Réaction de déprotection du DMT par le DCA	135
Figure 59 : Réaction d'activation de la phosphoramidite lors de la synthèse d'oligonucléotides	135
Figure 60 : Réaction de couplage du phosphoramidite sur l'alcool primaire en position 5'	135
Figure 61 : Réaction d'oxydation du groupement phosphite en lien phosphodiester lors de la synthèse d'oligonucléotides	136
Figure 62 : Réaction de thiolation du groupement phosphite en lien phosphorothioate lors de la synthèse d'oligonucléotides	136
Figure 63 : Réaction de capping de l'oligonucléotide n'ayant pas réagi	137
Figure 64 : Exemple de réaction de déprotection d'un oligonucléotide phosphorothioate	137
Figure 65 : Exemple de réaction secondaire de la formation d'adduit cyanoéthylé sur une base azotée de type thymidine	137
Figure 66 : Structure du phosphoramidite amphiphile synthétisé	138
Figure 67 : Réaction de couplage entre l'oligonucléotide et le phosphoramidite nucléolipidique	139
Figure 68 : Structure du Thiol-Modifier C6 S-S CE Phosphoramidite	139
Figure 69 : Structure moléculaire d'un nucléolipide-oligonucléotide amphiphile contenant un pont disulfure	140
Figure 70 : Structure des phosphoramidites utilisés pour la synthèse 5' → 3'	142
Figure 71 : Chromatogrammes de purification des conjugués nucléolipide-oligonucléotides LASO (haut) et le contrôle nucléolipidique LScr (bas)	146

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des volumes utilisés lors d'une synthèse de 40 µmol d'un oligonucléotide de 21 bases sur le système AKTA OP 10	141
Tableau 2 : Comparatif de deux synthétiseurs d'oligonucléotides	143
Tableau 3 : Gradient chromatographique pour l'analyse des ASO	144
Tableau 4 : Gradient chromatographique pour l'analyse des LASO	144
Tableau 5 : Gradient HPLC préparative pour la purification des LASO	145
Tableau 6 : Liste des séquences étudiées pour la stabilité thermique des duplexes	151

Table des annexes

Annexe 1 : pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems	160
Annexe 2 : Spectre de masse du LASO	166
Annexe 3 : Spectre de masse du ASO	167
Annexe 4 : Spectre de masse du LScr	168
Annexe 5 : Spectre de masse du Scr	169

Liste des abréviations

<u>2,4,6-THAP :</u>	2,4,6-TriHydroxyAcétoPhénone
<u>2'-O-MOE :</u>	2'-O-MéthOxyÉthyle
<u>2'-OMe :</u>	2'-O-Méthyle
<u>3'UTR :</u>	Région transcrite non traduite (<i>Untranslated Transcribed Region</i>)
<u>6-FAM :</u>	6-Carboxyfluorescéine
<u>ACN :</u>	ACétoNitrile
<u>ADN :</u>	Acide DésoxyriboNucléique
<u>AGO2 :</u>	Argonaute 2
<u>ALT :</u>	ALanine Aminotransférerase
<u>AMM :</u>	Autorisation de Mise sur le Marché
<u>ApoB :</u>	Apolipoprotéine B
<u>ARN :</u>	Acide RiboNucléique
<u>ARNm :</u>	Acide RiboNucléique messenger
<u>ASGPR :</u>	Récepteur de l'asialoglycoprotéine (<i>ASialoGlycoProtein Receptor</i>)
<u>ASO :</u>	Oligonucléotide AntiSens (<i>AntiSense Oligonucleotide</i>)
<u>AST :</u>	ASpartate aminoTransférerase
<u>ATCC :</u>	Collection Américaine de Cultures Types (<i>American Type Culture Collection</i>)
<u>BCA :</u>	Acide BicinChoninique
<u>BEH :</u>	Pont d'Éthylène Hybride (<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>)
<u>CAC :</u>	Concentration d'Agrégation Critique
<u>CCD :</u>	Dispositif à transfert de charge (<i>Charge Coupled Device</i>)
<u>cEt :</u>	<i>S-constrained Ethyl</i>
<u>CNA :</u>	<i>Dioxaphosphorinane-Constrained Nucleic Acid</i>
<u>CPG :</u>	Verre à porosité contrôlée (<i>Controlled Pore Glass</i>)
<u>CPP :</u>	Peptide Pénétrant dans les Cellules (<i>Cell Penetrating Peptide</i>)
<u>CRCM :</u>	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
<u>CRPC :</u>	Cancer de la Prostate résistant à la castration (<i>Castration-Resistant Prostate Cancer</i>)
<u>DCA :</u>	Acide DiChloroacétique
<u>DCM :</u>	DiChloroMéthane
<u>ddC :</u>	didéoxyCytosine
<u>DDTT :</u>	3-((<i>N,N</i> -diméthylaminométhylidène)amino)-3H-1,2,4-dithiazole-5-thione
<u>DLS :</u>	Diffraction Dynamique de la Lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
<u>DMD :</u>	Dystrophie Musculaire de Duchenne
<u>DMEM :</u>	Milieu de culture (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
<u>DMLA :</u>	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
<u>DMSO :</u>	DiMéthylSulfOxyde
<u>DMT :</u>	DiMéthoxyTrityle
<u>DOPE :</u>	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<u>DTT :</u>	DiThioThréitol
<u>E-VP :</u>	(E)-VinylPhosphonate
<u>EDX :</u>	Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (<i>Energy-Dispersive X-ray spectroscopy</i>)
<u>EGFP :</u>	Protéine fluorescente verte (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
<u>EGTA :</u>	Acide Éthylène Glycol Tetraacétique (<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>)

<u>eIF4E</u> :	Facteur d'Initiation à la Traduction Eucaryote (<i>eukaryotic translation Initiation Factor 4E</i>)
<u>EMA</u> :	Agence Européenne des Médicaments (<i>European Medicines Agency</i>)
<u>ENA</u> :	2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acid
<u>ETT</u> :	5-(Éthylethio)-1H-tetrazole
<u>FDA</u> :	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>Food and Drug Administration</i>)
<u>FHNA</u> :	<i>Fluoro Hexitol Nucleic Acid</i>
<u>FITC</u> :	Isothiocyanate de fluorescéine (<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>)
<u>G'</u> :	Module élastique
<u>G''</u> :	Module Visqueux
<u>GalNAc</u> :	N-acétylgalactosamine
<u>GAPDH</u> :	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
<u>HDL</u> :	Lipoprotéine de Haute Densité (<i>High Density Lipoprotein</i>)
<u>HEPES</u> :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (<i>4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid</i>)
<u>HER2</u> :	Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains (<i>Human Epidermal growth factor Receptor-2</i>)
<u>hnRNP</u> :	RiboNucléoprotéines Nucléaires Hétérogènes (<i>heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins</i>)
<u>HPLC</u> :	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
<u>LASO</u> :	Oligonucléotide AntiSens Lipidique (<i>Lipid AntiSense Oligonucleotide</i>)
<u>LASO SS</u> :	Oligonucléotide AntiSens Lipidique Disulfure
<u>LDL</u> :	Lipoprotéines de Basse Densité (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
<u>LNA</u> :	<i>Locked Nucleic Acid</i>
<u>LNP</u> :	NanoParticule Lipidique (<i>Lipid NanoParticle</i>)
<u>LVER</u> :	Domaine Linéaire de Visco-Élasticité (<i>Linear ViscoElastic Region</i>)
<u>MeOH</u> :	Méthanol
<u>MET</u> :	Microscopie Électronique à Transmission
<u>MTT</u> :	Bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium
<u>NL</u> :	NucléoLipide
<u>OBD</u> :	<i>Optimum Bed Density</i>
<u>PAGE</u> :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
<u>PBS</u> :	Tampon Phosphate Salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
<u>PdI</u> :	Indice de Polydispersité (<i>Polydispersity Index</i>)
<u>PEG</u> :	PolyÉthylène Glycol
<u>Ph 14</u> :	Dérivé de Phénazine
<u>PLK1</u> :	<i>Polo-Like Kinase 1</i>
<u>PMO</u> :	Phosphorodiamidate Morpholino Oligo
<u>PNA</u> :	Acide Nucléique peptidique (<i>Peptide Nucleic Acid</i>)
<u>PO</u> :	Phosphodiester
<u>PSMA</u> :	Antigène membranaire spécifique de la prostate (<i>Prostate-Specific Membrane Antigen</i>)
<u>PTO</u> :	PhosphoroThioate Oligonucleotide
<u>PVDF</u> :	Poly(Fluorure de VinyliDène)
<u>RGD</u> :	Tri-peptide Arginine-Glycine-Aspartate

<u>RISC</u> :	Complexe protéique d'inhibition de l'ARN (<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>)
<u>RNAi</u> :	ARN interférence
<u>RNase H</u> :	Ribonucléase H
<u>SDS</u> :	Dodécylsulfate de sodium
<u>siARN</u> :	Petit ARN interférent (<i>small interference RNA</i>)
<u>SMN</u> :	Gène de survie des neurones moteurs (<i>Survival Motor Neuron</i>)
<u>SNALP</u> :	Particule d'Acide Nucléique et de Lipide Stable (<i>Stable Nucleic Acid Lipid Particles</i>)
<u>TBS</u> :	Solution Saline Tamponnée au Tris (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
<u>tcDNA</u> :	ADN tricyclique (<i>tricyclo DNA</i>)
<u>TCTP</u> :	Protéine tumorale à traduction contrôlée (<i>Translationally Controlled Tumour Protein</i>)
<u>TEAA</u> :	Acétate de TriÉthyle Amine (<i>TriEthylAmine Acetate</i>)
<u>T_m</u> :	Température de fusion (<i>Temperature melting</i>)
<u>TTR</u> :	TransThyRétine
<u>UHPLC</u> :	Chromatographie en phase Liquide Ultra-Haute Performance (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
<u>UNA</u> :	<i>Unlocked Nucleic acid</i>
<u>UV</u> :	Ultra-Violet
<u>VEGF</u> :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
<u>VIH</u> :	Virus de l'Immunodéficiência Humaine

I. Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule biologique nucléaire présente dans toutes les cellules eucaryotes nucléées. Cette molécule, qui contient l'information génétique aussi appelée génome, est essentielle pour réaliser la transcription. Ce mécanisme nucléaire permet de générer l'acide ribonucléique (ARN) qui sera épissé dans le noyau pour ne garder que la partie codante de l'ARN, à savoir les exons. Cette dernière molécule est alors appelée ARN messenger (ARNm). Après interaction avec plusieurs protéines nucléaires, l'ARNm sera transféré au cytoplasme au niveau duquel il sera traduit par le ribosome grâce au code génétique. Ce phénomène, appelé traduction, génère les protéines. Ces macromolécules assurent la majorité des fonctions biologiques au sein des cellules et des tissus.

Les travaux de Zamecnik et Stephenson (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978) en 1978 ont mis en évidence l'utilisation de courts fragments d'ADN synthétiques, appelés oligonucléotides, de séquence complémentaire à un ARN viral pour inhiber la réplication du virus du sarcome de Rous. Cette découverte met en exergue la possibilité d'empêcher la réplication d'une souche virale par un oligonucléotide antisens spécifique. En parallèle, les études de biologie moléculaire ont permis d'élucider de nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans des pathologies humaines. L'expression de gènes pathologiques, qu'ils soient génétiques ou modifiés par mutation, serait alors modulable. La découverte des molécules d'ADN antisens rend cette nouvelle technologie très prometteuse pour l'inhibition de gènes spécifiques tant au niveau de la recherche pour des études fonctionnelles qu'au niveau des recherches applicatives.

Les études sur les oligonucléotides ont permis de mettre en évidence deux mécanismes d'inhibition, les technologies ADN antisens (ASO) et d'ARN interférence (RNAi) par les petits ARN interférents (siARN). La première, découverte en 1978, consiste à utiliser un fragment d'ADN complémentaire à la séquence d'ARN cible. Cette complémentarité fait intervenir des paires canoniques (dites de Watson-Crick) entre les bases azotées constituant l'acide nucléique. L'adénine s'apparie avec la thymine par deux liaisons hydrogène et la guanine s'apparie avec la cytosine par trois liaisons hydrogène. La seconde technologie, par les siARN, a été décrite pour la première fois par R. Jorgensen

(Napoli *et al.*, 1990) et étudiée principalement par Andrew Z. Fire et Craig Mello (Fire *et al.*, 1998).

La traduction protéique est un mécanisme biologique hautement régulé naturellement. Plusieurs molécules régissent cette régulation, notamment des acides nucléiques. Les petits ARN nucléaires, les microARN ou encore les longs ARN non codants ont un rôle dans la régulation de l'expression génique et dans la production protéique (Bennett and Swayze, 2010). Par exemple, l'activité régulatrice endogène des microARN est comparable à l'action des siARN artificiels (Carthew and Sontheimer, 2009).

Le premier chapitre de l'introduction traitera plus précisément les différents mécanismes d'inhibition engendrés par des acides nucléiques exogènes que sont les ASO et les siARN.

A. Mécanismes de régulation de la traduction

Dans la littérature, plusieurs mécanismes de régulation de la traduction par des acides nucléiques ont été démontrés. Nous séparerons dans cette partie les mécanismes avec et sans clivage de l'ARN.

La modulation de l'expression protéique est effectuée après hybridation de l'acide nucléique, ADN ou ARN, sur la séquence cible par complémentarité de base avec l'ARNm codant. La machinerie cellulaire peut être exploitée suivant le *design* de l'oligonucléotide, la série utilisée ou encore la localisation de la séquence cible. Il en résulte une dégradation de l'ARNm et donc une inhibition de la traduction. Il existe différents mécanismes faisant intervenir des complexes enzymatiques :

- RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) est un complexe protéique reconnaissant les siARN. Ces molécules peuvent être synthétiques ou générées par clivage d'un ARN double brin par la protéine Dicer. Ces acides nucléiques sont constitués de 20 nucléotides pour chaque brin avec un excès de 2 nucléotides à l'extrémité 3' non hybridés. La prise en charge de ces acides nucléiques par le complexe RISC entraîne une dégradation de l'ARNm complémentaire par des endonucléases Argonautes 2 (AGO2) avec une grande spécificité de séquence. L'ARNm résultant est ensuite rapidement dégradé par des exonucléases. Ce mécanisme est catalytique puisque le complexe RISC est toujours fonctionnel après le clivage de l'ARNm (Figure 1) (Kanasty *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004) ;

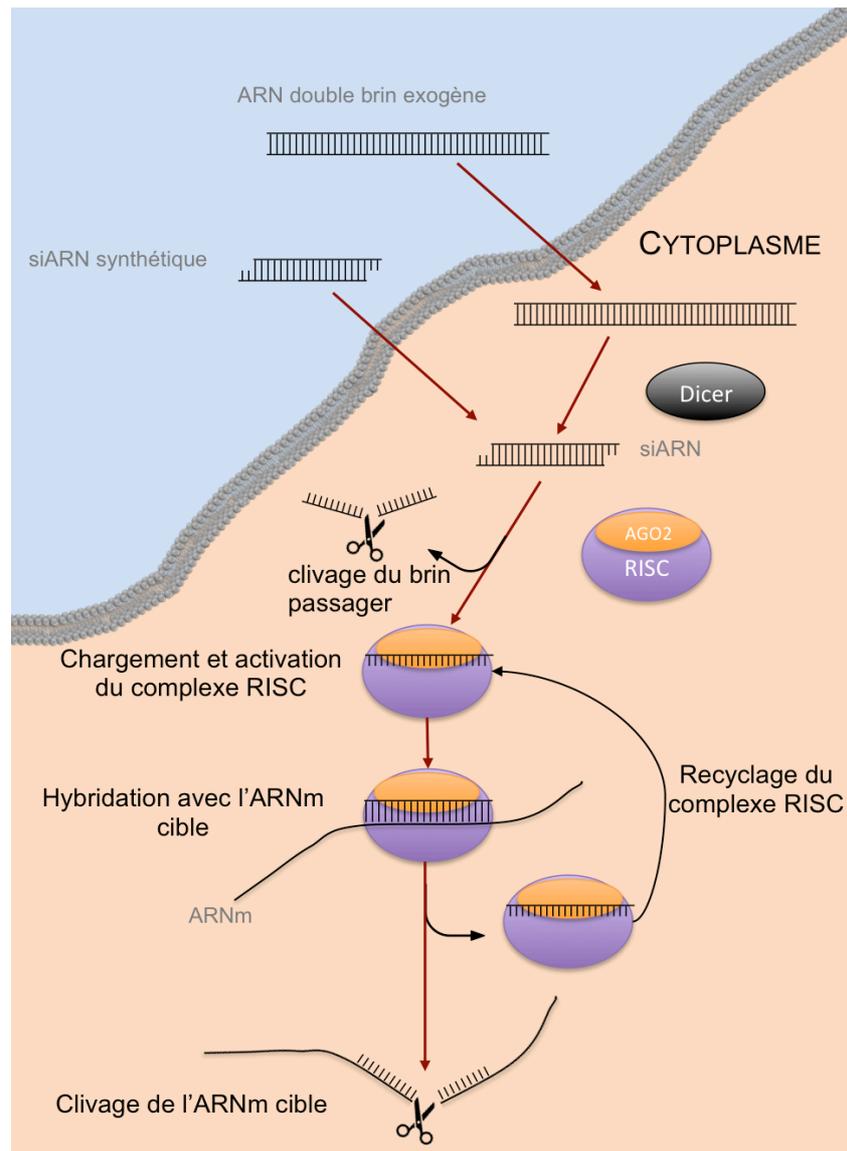


Figure 1 : Mécanisme d'inhibition de la traduction par des siARN

Adapté de Kanasty *et al.*, 2013

Après vectorisation d'un ARN double brin dans le cytoplasme, la protéine Dicer hydrolyse le duplexe en fragment double brin de 22 paires de base. Le siARN formé est reconnu par le complexe protéique RISC. Ce complexe dégrade le brin sens et prend en charge le brin antisens avant d'hybrider l'ARNm complémentaire. La protéine AGO2 hydrolyse spécifiquement l'ARNm associé au brin antisens avant d'hybrider un nouveau brin d'ARNm.

- Chez les animaux, les microARN ne provoquent pas de dégradation directe mais déclenchent la déprotection de la coiffe et la déadénylation provoquant la dégradation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ARNm (Dalmay, 2013; Lim *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005) ;
- Les ribozymes sont des ARN formant une structure tridimensionnelle bien définie capable de catalyser une réaction chimique pour la dégradation de sa cible ARN. Ils sont composés d'un site catalytique central borné par des matrices

de reconnaissance complémentaire à la séquence cible (Cech, 1988; Kurreck, 2004);

- Les DNazymes sont les analogues des ribozymes en séries ADN (Cepeda-Plaza *et al.*, 2018; Doran and Sohail, 2006; Kurreck, 2004) ;
- La ribonucléase H (RNase H) est un enzyme reconnaissant l'hétéroduplexe ADN / ARN. Cette protéine dégrade de manière sélective les amorces ARN, permettant la formation des fragments d'Okazaki (Okazaki *et al.*, 1968), lors de la réplication de l'ADN. La reconnaissance du duplexe par l'enzyme est due à un changement structurale de l'hétéroduplexe après une hybridation de la protéine sur l'hélice d'acide nucléique. Les études cristallographiques par rayons X des dernières décennies ont montré une conformation proche de la forme A (Suresh and Priyakumar, 2014). Cependant, les compositions de l'ADN et de l'ARN, en purines et pyrimidines, sont importantes pour les propriétés structurales et énergétiques. En effet, ces paramètres des hétéroduplexes varient progressivement avec le changement de la teneur en désoxypyrimidine dans leur brin ADN. L'enzyme reconnaît un duplexe hybride ARN / ADN de conformation mixte A et B (Figure 2a). Cet enzyme cible l'ARN pour le clivage par des interactions spécifiques avec les hydroxyles en position 2'. Les états de transitions sont stabilisés par des ions magnésium. L'état de coordination est spécifique des ions magnésium et contribue à la spécificité du substrat. L'étude menée par Davis *et al.* met en évidence une modification de la structure de l'hélice d'une forme A en une forme B après interaction avec l'enzyme ce qui élargit le sillon principale et diminue la courbure du duplexe. La protéine RNase H entre en contact avec les brins d'ADN et d'ARN dans le petit sillon et peut ainsi faire la différence entre une structure hélicoïdale de forme A et de forme B (Davis *et al.*, 2015).

Ce mécanisme est utilisé pour l'inhibition de la traduction par l'addition d'un fragment d'ADN exogène appelé ASO. La RNase H est principalement nucléaire mais existe également dans le cytoplasme. Dans ces deux compartiments cellulaires, la reconnaissance de l'hétéroduplexe ASO / ARN engendre une activité enzymatique par l'intermédiaire de cette protéine. Cela entraîne une

hydrolyse de l'ARN hybridé à l'ASO (Figure 2b (2) et (6)) (Cerritelli and Crouch, 2009; Inoue *et al.*, 1987; Khvorova and Watts, 2017; Monia *et al.*, 1993).

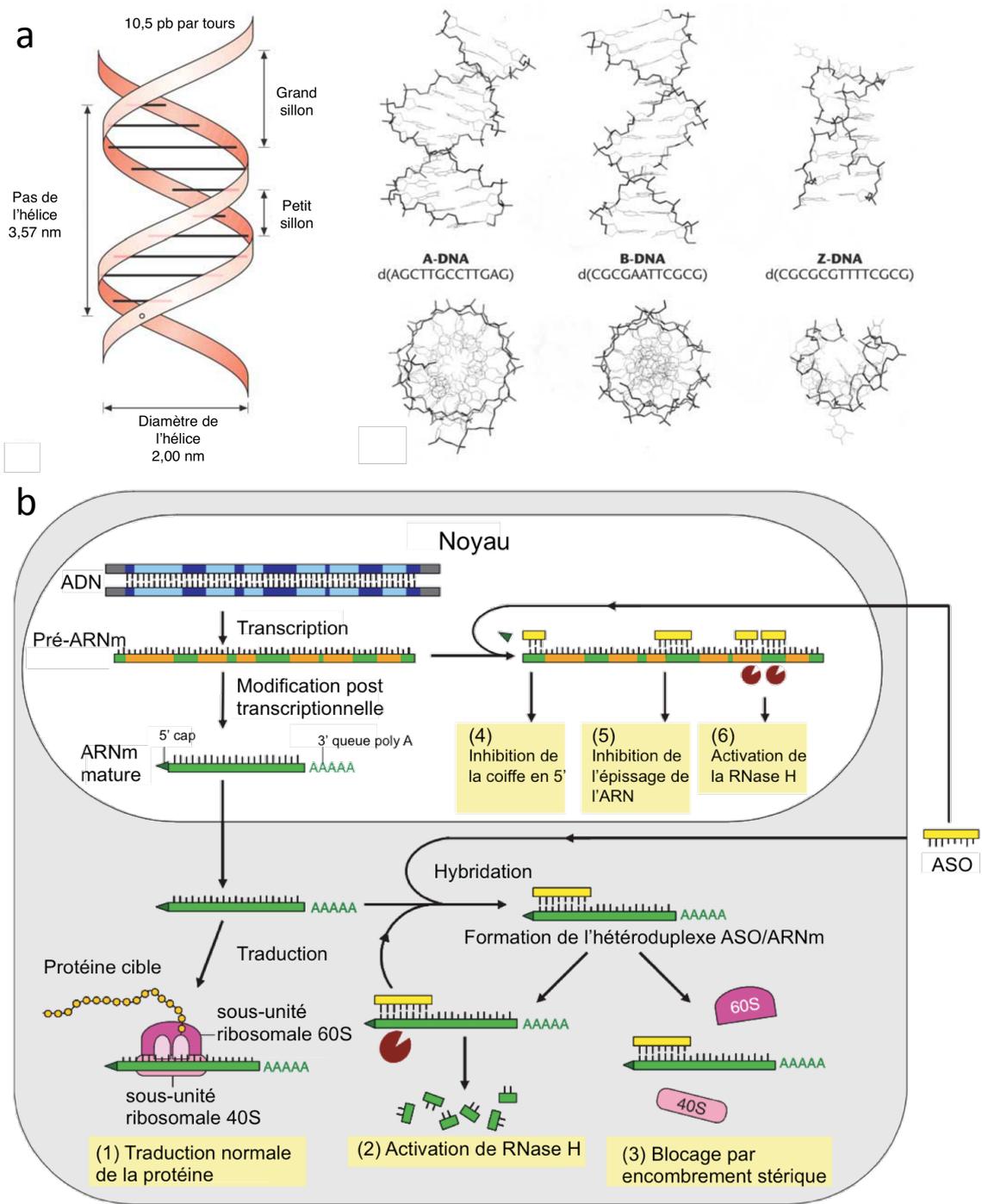


Figure 2 : Structure de l'ADN double brin et mécanismes d'action des oligonucléotides antisens

a/ Différentes formes de l'hélice d'ADN (Adapté de Ussery, 2002)

Structure de la forme B de l'hélice d'ADN proposé par Watson et Crick en 1953, basé sur des études de diffraction (gauche) et structure des formes A, B et Z de l'hélice d'ADN (double brin) décritent à partir de structures cristallographiques (droite).

b/ Mode d'action des oligonucléotides antisens (Adapté de Chan *et al.*, 2006)

L'absence d'ASO induit une expression normale du gène et de la protéine (1). L'internalisation de l'ASO entraîne son hybridation à l'ARNm au niveau de sa séquence complémentaire. La formation de l'hétéroduplexe ASO / ARNm

induit une activation de la RNase H et la dégradation de la partie complémentaire de l'ARNm (2) ou un blocage du ribosome par encombrement stérique (3). Ces deux mécanismes entraînent une inhibition de la production protéique cible. Alternativement, la pénétration de l'ASO dans le noyau peut engendrer une régulation de la maturation de l'ARNm par l'inhibition de la formation de la coiffe à l'extrémité 5' (4), l'inhibition de l'épissage (5) ou l'activation de la RNase H (6).

Les ASO sont à l'origine de différents mécanismes d'inhibition, dans le cytoplasme mais également dans le noyau. Après transcription de l'ADN en ARN pré-messager, plusieurs modifications post-transcriptionnelles sont réalisées comme l'épissage, la mise en place de la coiffe à l'extrémité 5' ou encore l'élongation de la queue polyA à l'extrémité 3'. L'ARNm est ensuite acheminé vers le cytoplasme par des protéines nucléaires appelées exportines au niveau duquel il est traduit en protéines par les ribosomes (Figure 2b (1)).

Lorsqu'un ASO est internalisé, il peut exercer son activité dans deux compartiments cellulaires, le cytoplasme ou le noyau. Dans le cytoplasme, après hybridation de l'oligonucléotide sur l'ARNm mature, deux mécanismes inhibiteurs sont possibles, la dégradation de l'ARNm ou le blocage de la traduction. La reconnaissance de l'hétéroduplexe par la RNase H engendre l'hydrolyse de l'ARNm comme décrit précédemment (Figure 2b (2)). L'ASO peut empêcher la traduction par encombrement stérique en inhibant le site de fixation du ribosome (Baker et al., 1997) ou l'avancée de celui-ci sur l'ARNm (Figure 2b (3)) (Cazenave *et al.*, 1989; Lengyel *et al.*, 1961).

Dans le noyau, plusieurs mécanismes existent également. L'ASO peut inhiber des modifications post transcriptionnelles comme la mise en place de la coiffe à l'extrémité 5' (Figure 2b (4)), ou en se fixant sur les sites de polyadénylation sur les extrémités 3'UTR (Vickers *et al.*, 2001). L'ASO peut également inhiber ou promouvoir l'inclusion d'exons afin de modifier l'épissage de l'ARN pré-messager (Figure 2b (5)) (Dominski and Kole, 1993; Hua *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007).

Les oligonucléotides exogènes peuvent induire de nombreux mécanismes pour l'inhibition de la production de protéines. Cependant, ce phénomène est applicable pour tous les ARN disponibles. La modification de la régulation protéique est réalisable par addition d'un agoniste (He *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008) ou antagoniste (Davis *et al.*, 2009; Esau *et al.*, 2004; Norton *et al.*, 1996) de la cible. Par exemple, il est possible de bloquer l'activité d'un microARN (Schoch and Miller, 2017), ou inversement d'ajouter un mimique de celui-ci pour moduler l'expression d'un gène.

Afin d'avoir une efficacité d'inhibition accrue, il est important que les siARN ou les ASO agissent sur une séquence cible complémentaire accessible de l'ARN.

L'organisme se défend contre les molécules exogènes grâce à des enzymes appelées nucléases (endo- et exo-nucléases) qui visent à cliver les liens phosphodiester (PO) des acides nucléiques non reconnus. Ainsi, différentes modifications chimiques des oligonucléotides ont été développées afin de pallier ce problème de dégradation précoce survenant avant même d'avoir pu constater leur efficacité biologique d'inhibition. Toutes ces modifications chimiques n'entraînent pas les mêmes modes d'action et peuvent être combinées afin d'augmenter les effets visés.

B. Modifications chimiques des oligonucléotides et mécanismes d'inhibition associés

Les différentes chimies développées au cours de ces dernières décennies peuvent faire intervenir différents mécanismes, par la RNase H, le RNAi ou par encombrement stérique. La première modification chimique développée consiste à remplacer le lien phosphodiester en phosphorothioate (PTO) pour pallier les problèmes de dégradation des oligonucléotides. Cette modification permet un recrutement de la RNase H et donc le clivage de l'ARN cible, dans le cas des ASO. La figure 3 récapitule les différents mécanismes mis en jeu selon la modification chimique utilisée (Khvorova and Watts, 2017; Manoharan, 2004; Stein *et al.*, 2005; Zamaratski *et al.*, 2001). Ces différentes séries seront développées par la suite.

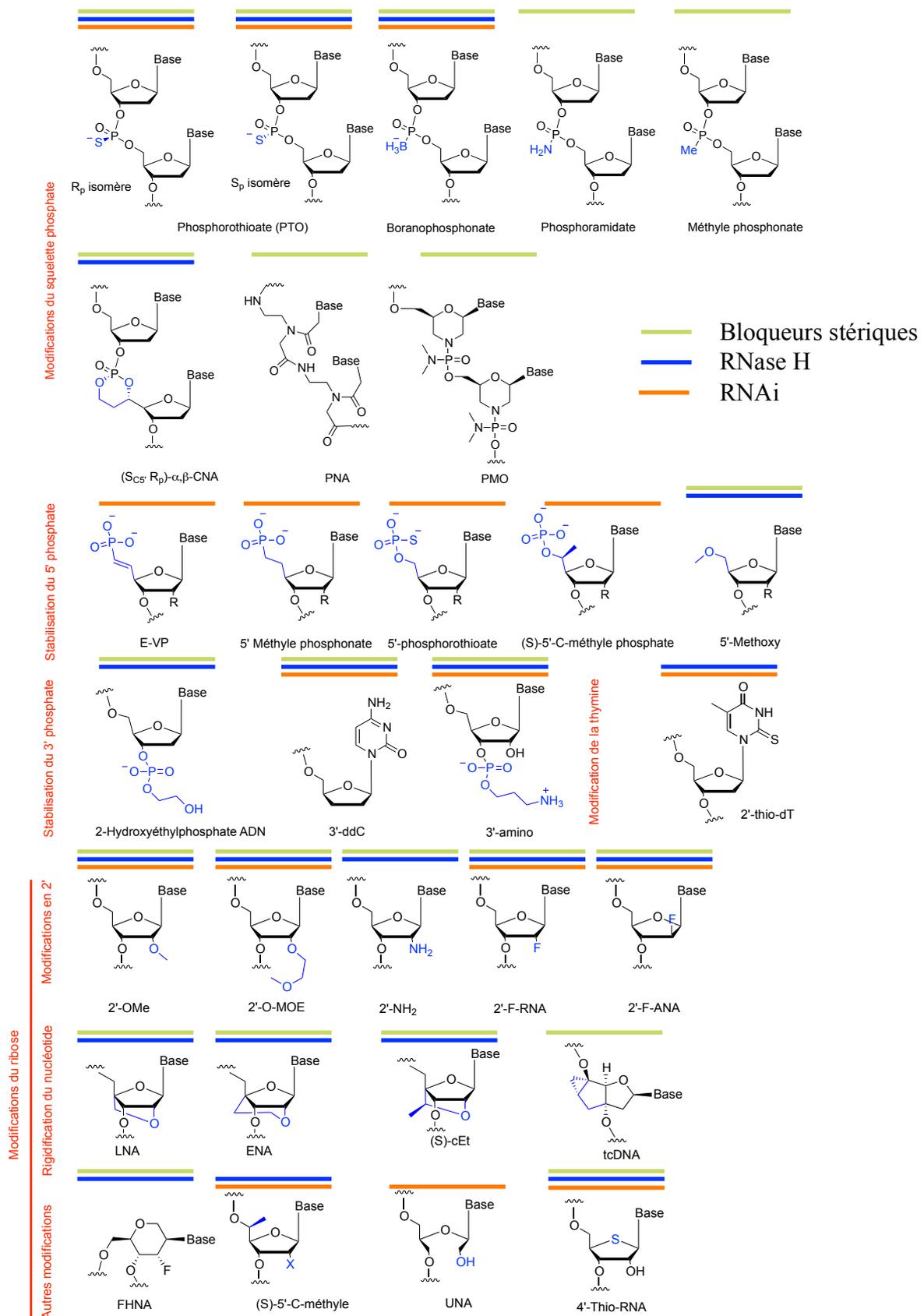


Figure 3 : Modifications chimiques utilisées en synthèse d'oligonucléotides

Les différentes modifications chimiques sont incorporées au niveau du squelette phosphate, du ribose ou des extrémités. La nature et la position du groupement chimique engendrent 3 principaux mécanismes (bloqueurs stériques en vert, activation de la RNase H en bleu et d'ARN interférence (RNAi) en orange). PTO : Phosphorothioate ; CNA : *Dioxaphosphorinane-Constrained Nucleic Acid* ; PNA : *Peptide Nucleic Acid* ; PMO :

Phosphorodiamidate Morpholino Oligo; E-VP: (E)-VinylPhosphonate; ddC: didéoxycytosine; 2'-OMe: 2' O-Méthyle; 2'-O-MOE: 2'-O-Méthoxy Éthyle; 2'-F RNA: 2'- Fluorure en série Acide RiboNucléique; 2'-F ANA: 2'-Fluorure en série Acide ArabinoNucléique; LNA: *Locked Nucleic Acid*; ENA: *2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acid*; cEt: *S-constrained Ethyl*; tcDNA: *tricycloDNA*; FHNA: *Fluoro Hexitol Nucleic Acid*; UNA: *Unlocked Nucleic Acid*.

La température de fusion (T_m) d'un oligonucléotide est reliée à l'affinité de celui-ci pour sa séquence complémentaire. Ce paramètre détermine la température selon laquelle 50 % des oligonucléotides sont hybridés à leur cible. Plus la T_m est élevée, plus l'affinité de l'oligonucléotide pour sa cible est forte et plus le duplexe est stable à 37 °C. Les modifications du sucre 2'-F, LNA et ENA augmentent significativement l'affinité avec le brin complémentaire de 2 à 4 °C par modification. Le duplexe doit conserver des caractéristiques hélicoïdales de conformation de type A pour une inhibition efficace, surtout pour les siARN. Cependant, les caractéristiques conformationnelles seules ne déterminent pas l'activité. Cette dernière est presque totalement inhibée lorsque l'un des deux brins du siARN est en série ADN, tandis qu'une chimère contenant des 2'-désoxyribose aux extrémités conserve son activité (Elbashir *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2000). Une chimère oligonucléotidique est une séquence d'ADN ou d'ARN composée de différentes modifications chimiques. Ces combinaisons sont utilisées pour augmenter la résistance aux nucléases tout en conservant l'activité inhibitrice qu'aurait l'oligonucléotide natif.

La modification du squelette phosphate, grâce à des phosphorothioates (PTO) ou des boranophosphates (Rait and Shaw, 1999) peut également engendrer des mécanismes de RNAi ou de RNase H, en augmentant leur stabilité chimique vis-à-vis des nucléases. Les PTO permettent de conserver des activités enzymatiques polymérase mais aussi RNase par activation de la RNase H1 (Gao *et al.*, 1992). Cet enzyme est principalement nucléaire, ce qui implique un passage dans le noyau pour qu'il soit actif (Stein *et al.*, 2005; Summerton, 2007). Les PTO sont également connus pour être peu spécifiques et interagir avec des protéines comme l'héparine ou des complexes protéiques (Stein *et al.*, 2005). Ces interactions interviennent à des concentrations élevées en PTO et peuvent générer des effets indésirables non négligeables (Winkler *et al.*, 2010). En parallèle, les oligonucléotides et l'hétéroduplexe ASO / ARN peuvent interagir avec des protéines tout en faisant intervenir la RNase H (Liang *et al.*, 2015). Certaines protéines comme les protéines TCP1, La et NPM1 permettent même d'augmenter l'effet inhibiteur de l'ASO. L'étude de Liang suggère que certaines associations ASO / protéine augmentent l'accumulation dans le noyau. D'autres interactions, comme avec la protéine ANXA2,

seraient impliquées dans l'endocytose et l'échappement aux endosomes et lysosomes, ce qui accentue l'effet de l'ASO par sa libération dans le cytoplasme. Tous ces phénomènes d'interaction sont accentués par des liens PTO en comparaison aux liens PO. Dans ce travail, pas moins de 56 protéines intracellulaires capables de se lier aux ASO PTO ont été identifiées (Liang *et al.*, 2015).

L'intervention de la RNase H dans le mécanisme d'inhibition permet d'avoir un effet pseudo catalytique. Lorsque l'oligonucléotide s'hybride à l'ARN, la RNase H reconnaît l'hétéroduplexe et active le clivage de l'ARN hybridé. Ainsi, l'ASO est ensuite relargué dans le milieu et peut s'hybrider à un autre brin d'ARN afin d'inhiber une autre molécule d'ARN de même séquence. Le caractère chiral des PTO permet d'exploiter tout un panel de diastéréoisomères dont l'efficacité inhibitrice variera au contact de la cible (Wan *et al.*, 2014). Il serait intéressant de contrôler la stéréochimie des PTO afin d'augmenter l'activité biologique de ces molécules. Les énantiomères S permettent une meilleure stabilité vis-à-vis des nucléases, mais les énantiomères R sont plus actifs après reconnaissance de la RNase H1. Ainsi, il est possible de contrôler la stabilité et l'activité de l'oligonucléotide en fonction de la position des énantiomères des PTO. Pour une approche thérapeutique, l'activité inhibitrice n'est pas significativement améliorée par l'ASO PTO stéréochimiquement pure, de configuration R ou S comparée à l'activité du mélange stéréochimique (Iwamoto *et al.*, 2017). Cependant, certaines modifications chimiques comme les phosphoramidates (Faria *et al.*, 2001; Froehler *et al.*, 1988) ou les méthylphosphonates (Furdon *et al.*, 1989; Maher and Dolnick, 1988; Quartin *et al.*, 1989; Ts'o *et al.*, 1987) ne sont pas reconnues par la machinerie cellulaire et engendrent une inhibition par encombrement stérique. L'effet pseudo catalytique n'est alors pas préservé.

L'activité inhibitrice semble dépendante de l'alcool libre en position 5' (Chiu and Rana, 2003) pour ce qui est des mécanismes RNAi. Quand le brin antisens est modifié par un groupe méthyle en position 5' (5'-OMe), l'activité est inhibée (Martinez *et al.*, 2002; Nykänen *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2002). Lorsqu'une modification est appliquée sur le brin sens, aucun effet n'est observé (Chiu and Rana, 2003; Czauderna *et al.*, 2003). Seul l'alcool libre à l'extrémité 5' du brin antisens est indispensable pour conserver l'activité biologique. Lorsque l'extrémité 5' du brin antisens est modifiée par un lien phosphate afin de conjuguer une molécule, comme un fluorophore par exemple, l'oligonucléotide

conserve son activité (Harborth *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2002). Une modification en position 5' par un lien phosphodiester n'altère pas l'activité inhibitrice de l'oligonucléotide.

L'extrémité 3' peut être modifiée par un groupement didéoxycytosine (3'-ddC) ou aminopropyle (3'-amino) *via* le groupe phosphate sur le brin antisens d'un siARN sans perte d'activité, contrairement au groupement 2-hydroxyéthylphosphate qui n'est possible que sur le brin sens (guide) (Figure 3).

Les modifications chimiques des riboses peuvent s'avérer très importantes pour améliorer la stabilité des oligonucléotides vis-à-vis des nucléases tout en conservant leur activité inhibitrice. Par exemple, des siARN ont été utilisés sur des cellules T CD4(+) infectées par le VIH. Cet ARN double brin a une activité RNAi lorsque l'alcool en position 2' est modifié par un groupement fluor (2'-F) mais doit être vectorisé dans la cellule (Capodici *et al.*, 2002). *In vivo*, l'accroissement de la résistance aux nucléases due à ces modifications n'est pas directement corrélée à une augmentation ou une prolongation de l'inhibition de la cible (par injection intraveineuse sur la souris) (Layzer *et al.*, 2004).

L'introduction de groupes méthyles en position 2' (2'-OMe) augmente légèrement l'affinité pour le brin complémentaire de 0 à 1 °C par modification (T_m). Cependant, une modification 2'-OMe sur tous les nucléotides est mal tolérée. Ainsi, des molécules contenant de 2 à 4 modifications chimiques aux extrémités, nommées *gapmers*, sont régulièrement synthétisées pour avoir une bonne résistance aux nucléases et ainsi augmenter significativement l'activité biologique (Czauderna *et al.*, 2003). L'augmentation de l'activité inhibitrice et de la résistance aux nucléases est également possible en créant des chimères 2'-OMe / 2'-F pour remplacer les alcools libres en position 2' de l'ARN dans le cas des siARN. De manière générale, la modification de la position 2' empêche une reconnaissance et une dégradation par la RNase H. Cependant, l'utilisation de *gapmers* permet l'augmentation de la stabilité chimique de la molécule dans l'organisme tout en activant les mécanismes de dégradation.

La position des modifications est importante. L'influence du positionnement des modifications 2'-F, 2'-OMe et 2'-O-MOE au sein de la séquence du brin sens et du brin antisens d'un siARN a été évaluée grâce à l'étude de Prakash *et al.* sur l'inhibition de l'ARNm PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog mutated in multiple advanced cancers*

1) responsable du contrôle tumoral d'une lignée cellulaire (Prakash *et al.*, 2005). Cette étude montre par exemple que la position des 2'-O-MOE peut influencer l'inhibition d'un facteur 4 en fonction de la position (de 20 à 90 % d'inhibition à 20 nM sur un modèle cellulaire HeLa).

Une autre étude, réalisée par Stanton *et al.* (Stanton *et al.*, 2012) compare différents *gapmers* comportant des modifications chimiques LNA, 2'-O-MOE, 2'-OMe, 2'-F ou G-clamp (une modification chimique interagissant fortement avec les guanines par 4 liaisons hydrogène). Cette étude a été réalisée sur trois séquences de 14 nucléotides ciblant l'ARNm codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes. 19 constructions différentes ont été réalisées sur ces trois séquences. Les modifications chimiques utilisées ont un impact significatif sur l'activité inhibitrice, les propriétés physiques ainsi que la toxicité. Les tendances observées sur ces différents facteurs sont remarquablement cohérentes entre les trois séquences. Par exemple, un *gapmer* comportant à chaque extrémité trois nucléotides modifiés chimiquement en position 2' par des LNA permet une inhibition de 45 à 55 % de la traduction (en fonction des séquences) après vectorisation de 3 nM dans la lignée Hep3B, tandis qu'avec un *gapmer* comportant à chaque extrémité quatre nucléotides modifiés chimiquement en position 2' par des 2'-F, l'inhibition n'est que de 5 à 15 %.

Les modifications chimiques de type 2'-amino ont quant à elles été très peu étudiées, mais il semblerait qu'elles induisent une diminution drastique de l'efficacité d'inhibition avec un effet accru dans le cas du brin antisens (Parrish *et al.*, 2000). Les modifications de type 4'-Thio-ARN sont incorporées sur le brin sens des siARN aux extrémités afin de conserver leur activité RNAi mais aussi d'améliorer leur résistance aux nucléases (Hoshika *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2012). Elles peuvent également être utilisées lors d'une stratégie antisens aux extrémités pour éviter l'action des exonucléases (Dande *et al.*, 2006). Les modifications de type LNA induisent une forte augmentation de l'affinité pour le brin complémentaire, rendant ainsi une activité RNAi impossible mais permettant une activité efficace du blocage de la traduction (Braasch *et al.*, 2003).

Toutes ces modifications chimiques sont introduites pour répondre aux problèmes de dégradation précoce des molécules d'acides nucléiques exogènes. Cependant, une autre problématique est à prendre en compte. Ces molécules sont pour la plupart des polyanions portant donc une charge globale négative. Il leur est alors très difficile de

franchir la bicouche lipidique des membranes cellulaires sans agent de transfection. Les modifications oligonucléotidiques non chargés, comme les PMO, les PNA et les LNA n'induisent pas de mécanisme de type RNase H. La quantité de ces molécules nécessaire à l'inhibition d'une cible protéique est stœchiométrique. Les mécanismes d'inhibition par encombrement stérique empêchent l'effet catalytique. Ces molécules neutres n'assurent pas une meilleure transfection que leurs analogues polyanioniques.

C. Internalisation cellulaire des oligonucléotides

La vectorisation des oligonucléotides dans le milieu intracellulaire est une étape clef pour leur activité biologique. Les ARNm ainsi que la machinerie cellulaire nécessaires à leur mise en action se situent dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau. Ainsi, plusieurs agents de transfection ont été développés tels que l'oligofectamine® 2000 (Invitrogen™), le JetPEI® (Polyplus transfection®) ou encore le K2® (Biontex™) par différentes sociétés afin d'internaliser les acides nucléiques dans les cellules. Ces produits sont constitués d'agents lipidiques cationiques, généralement composés de polyéthylènimine ou de DEAE-dextran, qui s'auto-organisent en milieu aqueux avec les polyanions des oligonucléotides sous forme d'agrégats. Cette technique de lipofection permet une endocytose, libérant les acides nucléiques dans le cytoplasme. L'inconvénient majeur de cette technique est la toxicité des agents de transfection et l'absence de spécificité *in vivo*. De plus, ces complexes ne sont pas stables en présence de sérum, ce qui empêche une vectorisation convenable *in vivo* (Nelson *et al.*, 2013; Verbaan *et al.*, 2001). Leur haut poids moléculaire (25 kDa) engendre une bioaccumulation rapide au niveau hépatique. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche travaillent sur ce sujet afin d'améliorer la transfection par lipofection (Neuberg and Kichler, 2014). Les agrégats formés à partir de polymères sont appelés polyplexes, à la différence des agrégats lipidiques nommés lipoplexes. De récentes études ont permis d'améliorer la délivrance d'acides nucléiques par modification des polyéthylènimines. Ainsi, Chiper *et al.* ont montré que la modification chimique des oligoéthylènimines de 1,8 kDa par différents domaines aromatiques rend la molécule plus hydrophobe. Ce caractère hydrophobe permet une dissolution des polyplexes à pH acide (dans les endosomes, organite acide présent dans le cytoplasme) et ainsi l'internalisation des acides nucléiques dans le cytosol. La diminution de la taille de ces molécules, de 25 à 1,8 kDa, améliore la biocompatibilité par une clairance rénale

beaucoup plus rapide (Chiper *et al.*, 2017). D'autres études s'intéressent à la combinaison de la polyéthylèneimine modifiée avec du poly(acide lactique-co-glycolique) afin de formuler de nouvelles nanoparticules permettant l'encapsulation d'acides nucléiques comme des plasmides ou des anti-microARN (Zhu *et al.*, 2016). L'étude menée par Zhu *et al.* démontre l'intérêt d'associer le poly(acide lactique-co-glycolique) et l'acide hyaluronique sous forme de nanoparticules pour condenser de l'ADN afin de le vectoriser dans les cellules. L'acide hyaluronique joue dans ce cas le rôle de revêtement à la surface des nanoparticules afin d'améliorer la cytocompatibilité et le ciblage cellulaire.

Le poly(2-diméthylaminoéthyle méthacrylate) ou PDMAEMA est un autre polymère également utilisé pour la transfection d'oligonucléotides (Agarwal *et al.*, 2012) afin de formuler des micelles de taille contrôlée selon le degré de polymérisation de la molécule. Ces micelles permettent l'internalisation et le relargage d'acide nucléique dans des cellules cancéreuses, sans effet cytotoxique du cargo par ajout d'albumine en surface. Ce revêtement permet de transférer préférentiellement les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (Jiang *et al.*, 2014).

Une autre stratégie consiste à utiliser des virus modifiés capable d'internaliser des acides nucléiques dans les cellules (Lukashev and Zamyatnin, 2016; Merten and Gaillet, 2016; Svyatchenko *et al.*, 2012). Cependant, les oligonucléotides ne sont pas délivrés sous forme synthétique mais sous forme intégrée au génome viral. Cette méthode de vectorisation peut entraîner une toxicité.

L'utilisation de nanoparticules lipidiques (LNP) est également fréquente dans la transfection d'acide nucléique. Ce sont des vecteurs non viraux qui ne permettent pas une efficacité de transfection comparable à celle de la transfection virale (Zhao and Huang, 2014). Certaines LNP sont modifiées par des anticorps afin de cibler activement les tumeurs. L'anticorps anti-HB-EGF est utilisé dans le cas du traitement du cancer du sein, qualifié de triple négatif, par administration de siARN sous forme de LNP. Le siARN cible l'ARNm codant pour la protéine *Polo-Like Kinase 1* (PLK1) des lignées cancéreuses MDA-MB-231. Le lipide 1,2-Dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) est important pour la formulation. Il a un rôle essentiel dans le système permettant aux LNP riches en DOPE de modifier la conformation structurale de l'objet et de déstabiliser les membranes endosomales en fonction du pH. Cette composition de LNP-siARN permet au

système d'échapper aux endosomes par changement conformationnel du DOPE. Ces LNP modifiés offrent de bonnes perspectives dans le cadre de la libération d'acide nucléique pour une inhibition protéique et pour retarder la prolifération cellulaire (Okamoto *et al.*, 2018).

Une variante des LNP est l'utilisation de molécules bioinspirées telles que les nucléolipides (NL). Ces derniers ont la capacité de s'auto-assembler pour former différentes structures supramoléculaires (Allain *et al.*, 2012; Baillet *et al.*, 2018; Chabaud *et al.*, 2006; Gissot *et al.*, 2008a; Khiati *et al.*, 2011). L'addition d'acide nucléique avec les NL permet l'obtention de vecteurs pour la transfection (Ceballos *et al.*, 2009, 2010; Chabaud *et al.*, 2006; Luvino *et al.*, 2013). Ces NL ont également été modifiés afin d'améliorer la délivrance d'acide nucléique sous l'action d'un *stimulus*, comme le pH (Oumzil *et al.*, 2015) (Annexe 1).

Dans la littérature, de nombreuses formulations sont décrites pour la vectorisation d'acide nucléique (Aigner and Kögel, 2018). Une autre stratégie consiste à greffer des molécules de manière covalente à l'oligonucléotide pour une approche thérapeutique (Figure 4). Ces molécules peuvent engendrer de nouvelles propriétés moléculaires pour la vectorisation, le ciblage, la furtivité ou encore l'amphiphilie. L'utilisation de molécules biocompatibles telles que les peptides, les lipides ou encore les polymères permet l'assemblage de complexes par interactions électrostatiques, liaisons hydrogène et / ou effets hydrophobes.

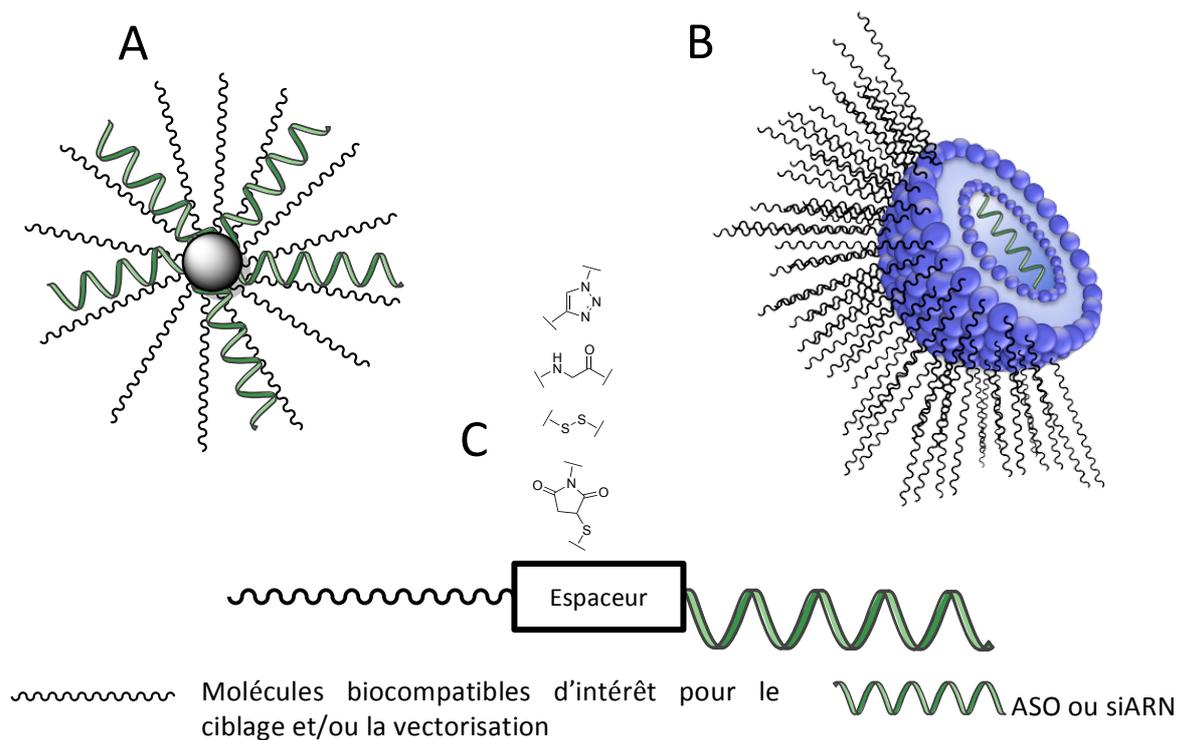


Figure 4 : Schéma de stratégies de formulation pour la délivrance d'ASO et de siARN
Adapté de Järver *et al.*, 2012

A : Formation d'un complexe entre une biomolécule ou un polymère et l'oligonucléotide par interaction électrostatique et / ou effets hydrophobes, B : Formation de structure supramoléculaire liposomale avec agent de ciblage ou de vectorisation (PEG, peptide, CPP, protéine, lipide, glycoconjugué, etc.), C : Conjugaison covalente avec l'oligonucléotide par un lien stable ou clivable.

D. Utilisation de conjugués oligonucléotidiques

Les conjugués oligonucléotidiques sont de plus en plus étudiés. Le potentiel prometteur de ces fragments d'acide nucléique pour la thérapie engendre un intérêt croissant pour le développement pharmaceutique. L'avantage majeur d'un conjugué est d'être une entité moléculaire à part entière contrairement aux formulations, nanoparticules et autres agents de transfection limités dans le cadres du développement d'un futur médicament (hétérogénéité, caractérisation, etc.). De plus, les molécules conjuguées de manière covalente peuvent avoir un rôle biologique dans la reconnaissance et le ciblage de cellules ou tissus, mais aussi dans la furtivité, la pharmacocinétique ou l'internalisation cellulaire.

1. GalNAc

Les modifications par greffage de GalNAc (*N*-acétylgalactosamine) conduisent à des glycoconjugués hydrophiles qui permettent d'augmenter l'internalisation cellulaire

au niveau du foie par des récepteurs ASGPR (*ASialoGlycoProtein Receptor*). Le développement de cette chimie de conjugaison a été réalisé par la société Alnylam Pharmaceuticals (Nair *et al.*, 2014). Cette modification peut être insérée en cours de synthèse sous forme de monomère non nucléosidique ou sous forme « triantennulaire » sur une extrémité (Figure 5). Cette dernière forme est la conformation la plus fonctionnelle et la plus utilisée.

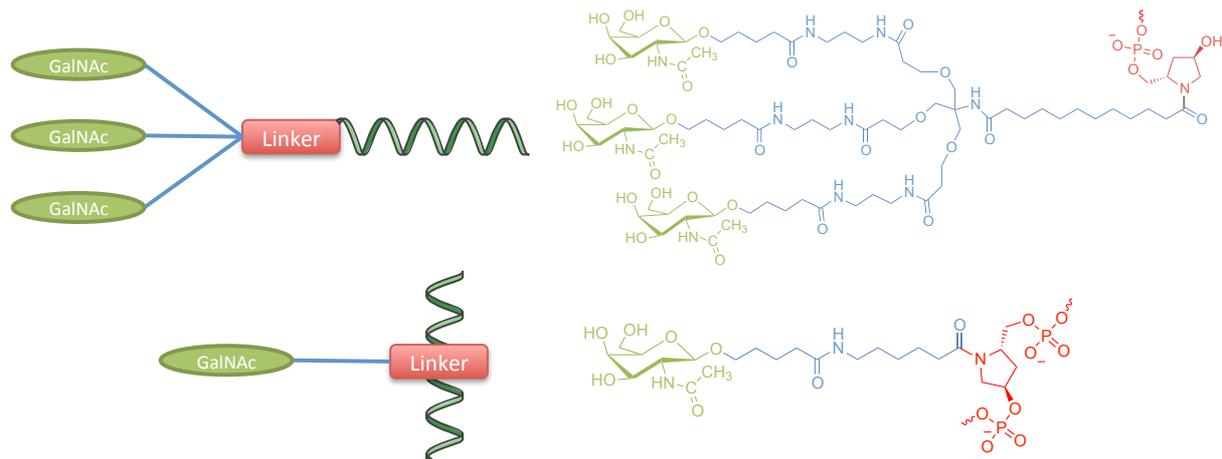


Figure 5 : Schéma et structure moléculaire du GalNAc

Adapté de Matsuda *et al.*, 2015

Schéma représentant un oligonucléotide couplé au GalNAc (gauche) et structure moléculaire (droite). Le GalNAc triantennulaire est représenté dans la partie supérieure, le GalNAc incorporé en cours de séquence dans la partie inférieure.

Les ASGPR sont des récepteurs de la famille des lectines de type C et sont présents sur la membrane plasmique des hépatocytes. Ils sont exprimés à une densité très élevée (5.10^5 copies par hépatocytes). Le galactose et le GalNAc sont les substrats préférés de ces récepteurs. Une fois lié à son substrat, l'ASGPR s'internalise rapidement pour être acheminé vers des endosomes précoces par un mécanisme clathrine dépendant (Girelli *et al.*, 2018). Le pH acide de l'environnement endomembranaire dissocie l'appariement du complexe substrat-récepteur, puis l'ASGPR retourne rapidement au niveau de la membrane plasmique (Figure 6). Le ligand est ensuite acheminé vers les lysosomes. Les ASGPR sont des récepteurs intéressants pour la délivrance d'acide nucléique au niveau du foie car ils permettent un ciblage actif de ce dernier. Ils possèdent un taux d'expression élevé, une internalisation rapide ainsi qu'un recyclage. En absence de siARN, l'ASGPR est un récepteur de signalisation jouant un rôle crucial dans l'homéostasie plaquettaire et dans la régulation de la production de thrombopoïétine.

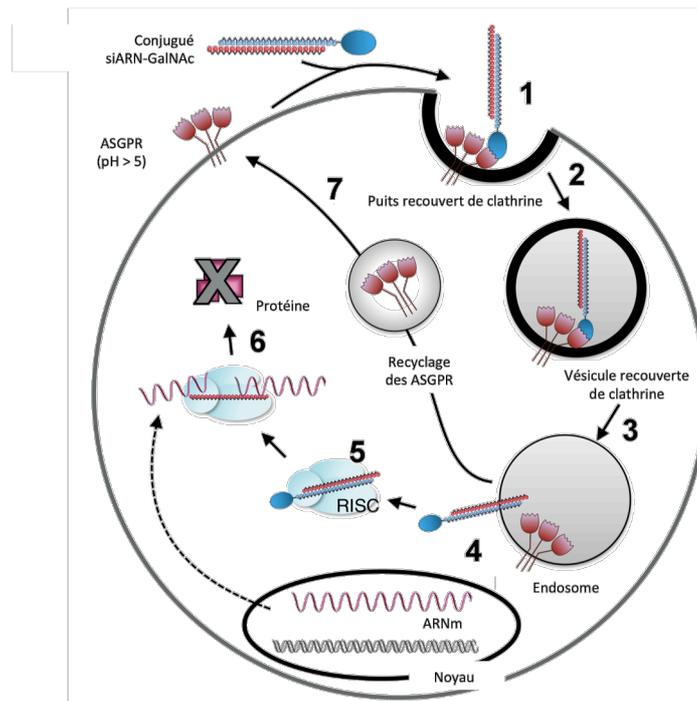


Figure 6 : Schéma du principe d'internalisation cellulaire par les oligonucléotides conjugués au GalNAC

Adapté de document d'Alnylam

L'extrémité GalNac est un substrat pour les récepteurs ASGPR. L'interaction entre ces deux entités engendre un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. L'acidification de l'environnement dissocie le complexe substrat / récepteur (3) libérant les siARN dans le cytoplasme (4). Prise en charge de l'ARNm cible par le complexe RISC pour un mécanisme RNAi (5). Inhibition de la traduction protéique (6). Les récepteurs ASGPR sont recyclés et réacheminés sur la membrane plasmique (7).

La constante d'association entre ces oligonucléotides modifiés et le récepteur est de l'ordre du nanomolaire.

La synthèse est à présent applicable sur support solide (Isaiah Cedillo *et al.*, 2017). Il est possible de greffer cette modification en position 3', 5' ou en cours de synthèse. Les siARN développés sont des *mixmers*, c'est-à-dire possédant différentes modifications chimiques (2'-OMe, 2'-F, PTO) au sein de la même séquence. Ces constructions améliorent la stabilité *in vivo* (Nair *et al.*, 2014). Ces molécules sont absorbées dans les hépatocytes primaires de souris conduisant à l'inactivation des gènes ciblés. L'excellente absorption a été caractérisée par une expérience de radio-marquage. Le mode d'administration en injection sous-cutanée a montré une meilleure distribution dans le foie avec une meilleure efficacité inhibitrice qu'en injection intraveineuse. L'efficacité démontrée de la conjugaison d'un oligonucléotide avec le GalNac en fait une méthode de choix pour le ciblage actif des hépatocytes (Matsuda *et al.*, 2015; Rajeev *et al.*, 2015). Cette technologie est également développée sur les ASO avec une amélioration de

l'inhibition d'un facteur 10 *in vivo* (Prakash *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2016a). La pharmacocinétique des ASO couplés au GalNAc ciblant la lipoprotéine (a) humaine de cette précédente étude a également été évaluée chez le singe (Yu *et al.*, 2016b).

Beaucoup d'autres oligonucléotides couplés au GalNAc sont étudiés en phase clinique. Le siARN Fitusiran (Franchini and Mannucci, 2018; Pasi *et al.*, 2017) est développé par Alnylam pour le traitement des hémophilies. La collaboration entre Ionis et Akcea a mis au point l'ASO IONIS-APO(a)_{L_{RX}} pour le traitement d'hyperlipoprotéinémie et de maladies cardiovasculaires. Deux anti-microARN sont étudiés par Regulus pour traiter des pathologies virales comme l'hépatite C (RG-101) ou en collaboration avec AstraZeneca pour le traitement du diabète de type 2 (RG-125) (Huang, 2017).

2. Peptides - Cell Penetrating Peptide (CPP)

Tout comme les GalNAc, certains petits peptides sont des ligands pour des récepteurs spécifiques. Par exemple, le tripeptide RGD et son analogue cyclo-RGD sont des ligands pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées dans plusieurs cancers, notamment dans les mélanomes (Lobeek *et al.*, 2018). La capacité de greffer des ligands sur les oligonucléotides thérapeutiques engendre des possibilités de ciblage et de vectorisation importantes. L'ajout de plusieurs peptides sur le même oligonucléotide améliore la sensibilité du conjugué pour son récepteur. Le mécanisme d'internalisation est réalisé par endocytose cavoline-dépendante (Alam *et al.*, 2011; Juliano *et al.*, 2011). D'autres peptides, comme la bombésine, sont intéressants pour le couplage à des oligonucléotides. Ce peptide de 14 acides aminés est un neurotransmetteur agissant sur les récepteurs aux protéines G. Cette molécule permet de vectoriser les oligonucléotides dans le noyau des cellules transfectées (Gooding *et al.*, 2016; Ming *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2014).

Les CPP sont de courtes séquences d'acides aminés, ne dépassant généralement pas trente résidus et ont la capacité de traverser la membrane cellulaire avec une toxicité très limitée. La membrane plasmique est franchie par des mécanismes différents selon les CPP sans nécessité d'une reconnaissance par des récepteurs spécifiques. Les CPP les plus couramment utilisés sont des polycations, même s'il existe également des CPP anioniques ou hydrophobes. Les CPP sont classés selon trois catégories, les peptides dérivés de protéines, les peptides chimériques formés par la fusion de deux séquences

naturelles et les peptides synthétiques basés sur des études de structures/fonctions (Bechara and Sagan, 2013).

Les CPP sont utilisés pour la vectorisation de molécules ayant un faible pouvoir pénétrant dans les cellules. Les acides nucléiques étant dans ce cas de figure, les CPP peuvent apporter cette fonctionnalité de pénétration cellulaire pour les applications inhibitrices des oligonucléotides. Les formulations classiques transportant les oligonucléotides peuvent être composées de CPP par mélange physique, mais la conjugaison de ces molécules par un lien covalent est aussi envisagée.

L'étude de Ye *et al.* (Ye *et al.*, 2017) montre l'intérêt de greffer un CPP à un siARN de manière covalente. La modification est réalisée à l'extrémité 3' du brin sens et est espacée du CPP par une chaîne polyéthylène glycol (PEG) de 3,5 kDa (Figure 7).

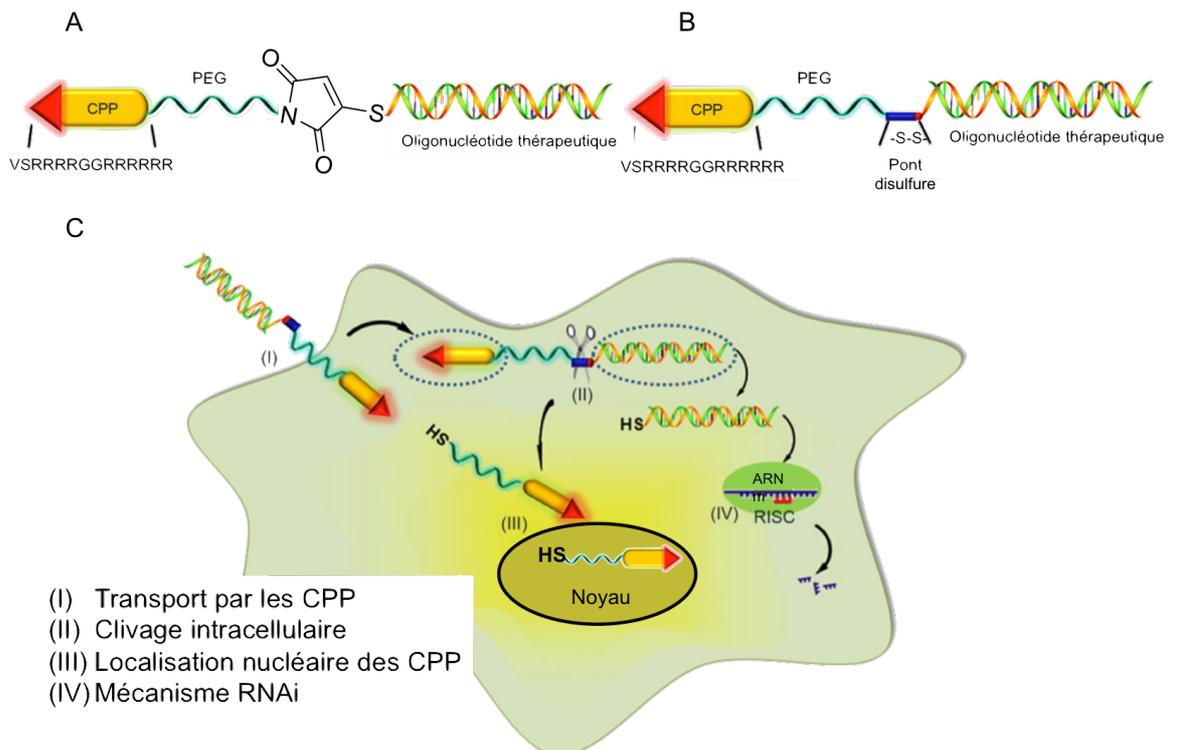


Figure 7 : Stratégie de greffage du CPP sur le siARN

Adapté de Ye *et al.* (Ye *et al.*, 2017)

A : Représentation du conjugué CPP oligonucléotide non clivable. B : Représentation du conjugué clivable par réduction du pont disulfure C : I) Le conjugué pénètre dans la cellule par l'action du CPP II) le clivage du pont disulfure engendre un détachement du siARN et du CPP III) Le CPP pénètre dans le noyau IV) Le siARN exerce son activité inhibitrice par un mécanisme RNAi.

Cette étude compare l'internalisation et l'effet inhibiteur d'un siARN anti-EGFP lorsqu'il est greffé ou formulé avec le CPP de faible poids moléculaire sur des cellules MDA-MB-

231 surexprimant la protéine EGFP. Deux conjugaisons différentes ont été réalisées, l'une par un pont disulfure clivable en condition cellulaire et l'autre de manière covalente non clivable par un lien maléimide. Les résultats montrent une internalisation 2,3 fois plus importante des conjugués par rapport à la formulation. Cependant, l'activité du siARN est différente entre les conjugués. L'environnement réducteur du cytosol génère un clivage du siARN dans la cellule engendrant une inhibition de la traduction de 78,8 % tandis que l'expression de la protéine avec le conjugué non clivable est de 31,7 %. Malgré la moins bonne pénétration cellulaire, la formulation engendre une inhibition de la protéine EGFP supérieure (58,8 %) qu'avec le conjugué non clivable.

Cette classe de bioconjugué représente une méthode de choix pour la délivrance d'acide nucléique. Cette étude *in vitro* ne révèle pas les propriétés de ces molécules *in vivo*. La distribution ainsi que la résistance à la dégradation protéolytique pour maintenir la stabilité *in vivo* ne sont en effet pas évaluées dans cette étude.

3. α -tocophérol

L' α -tocophérol est une forme de vitamine E utilisée pour le traitement de l'hypercholestérolémie. C'est un composé liposoluble qui a été couplé à des oligonucléotides (Asami *et al.*, 2016).

Cette étude consiste à coupler cette biomolécule aux siARN, à l'extrémité 5' du brin antisens de 29 nucléotides. Le brin sens est composé de 27 nucléotides et s'hybride spécifiquement à son complémentaire. Ce conjugué est clivé en condition cellulaire après reconnaissance de ce duplexe par la protéine Dicer pour former un siARN mature de 21 nucléotides par brin. Le couplage a un effet de vectorisation et permet d'avoir une activité inhibitrice bien supérieure au conjugué cholestérol de même nature. Seulement 2 mg/kg sont nécessaires pour réduire significativement l'ARNm de l'apolipoprotéine B (ApoB) dans le foie de souris après injection par voie intraveineuse. Comparativement, le conjugué cholestérol nécessaire pour avoir la même activité est de 50 à 100 mg/kg (Nishina *et al.*, 2008).

Cette biomolécule est également couplée à un ASO pour augmenter l'inhibition du gène endogène dans le foie de souris comparativement à l'ASO non conjugué. La simple conjugaison n'entraîne pas d'effet inhibiteur, un espaceur est essentiel pour conserver l'activité biologique. L'étude de Nishina *et al.* (Nishina *et al.*, 2015) utilise 4 à 7 résidus

oligonucléotidiques de série UNA à l'extrémité 5' pour espacer l' α -tocophérol de la séquence. L'ASO initial est un *gapmer* constitué à chaque extrémité de nucléotides modifiés chimiquement en position 2' par des LNA. Les résidus UNA sont clivés dans la cellule, laissant place à l'ASO initial utilisant un mécanisme RNase H pour l'inhibition de l'ARNm dirigé également contre l'ApoB. L'efficacité inhibitrice est augmentée d'un facteur 3,5 comparé à l'oligonucléotide non conjugué injecté par voie intraveineuse sur le modèle murin. L' α -tocophérol permet également d'améliorer la pharmacocinétique de l'ASO engendrant une accumulation dans le foie à la différence de l'ASO non conjugué qui se distribue principalement dans les reins.

4. Aptamères

Les aptamères sont des séquences d'oligonucléotides (ADN ou ARN) possédant une structure tridimensionnelle bien spécifique. Ces séquences et ces structures sont sélectionnées selon une méthode appelée SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* ou évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel) sélectionnant les meilleurs candidats ayant une affinité de l'ordre du nanomolaire voire du picomolaire pour une cible spécifique. L'étude de Sullenger *et al.* (McNamara *et al.*, 2006) a utilisé cette approche pour concevoir un aptamère capable de cibler les récepteurs au PSMA à la surface cellulaire. Ce conjugué aptamère-siARN agit comme substrat pour l'enzyme Dicer intracellulaire pour le clivage des deux entités dans la cellule. L'ARN de l'aptamère est protégé de la dégradation par des modifications chimiques de type 2'-F sur les pyrimidines pour les expériences *in vitro* en présence de sérum et *in vivo*. Cette étude est une preuve de concept et cible des transcrits anti-apoptotiques. L'inhibition de ces gènes entraîne une baisse significative de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose. Une chimère de l'aptamère portant deux mutations ponctuelles a montré une absence de spécificité de la chimère pour sa cible prouvant la spécificité de liaison entre l'aptamère et le récepteur.

D'autres équipes de recherches étudient la conjugaison des aptamères sur les oligonucléotides pour la transfection par l'interaction avec des récepteurs. Cette stratégie est utilisée pour reconnaître la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe virale du VIH. Le siARN associé cible des gènes viraux comme *tat/rev*. Ce conjugué supprime l'infection par le VIH dans des lignées humaines infectées par le virus mais aussi dans

des modèles murins humanisés (Neff *et al.*, 2011; Zhou and Rossi, 2014; Zhou *et al.*, 2008).

Les aptamères sont des molécules en plein essor. Cependant, la longue séquence oligonucléotidique entraîne des possibilités non négligeables de dégradation par les nucléases. La structure tridimensionnelle étant très importante, il est délicat de modifier ces nucléotides pour augmenter la stabilité sans risquer de perdre la reconnaissance à sa cible.

5. Anticorps

Les anticorps monoclonaux sont les molécules de référence pour la reconnaissance d'une cible biologique. Lieberman *et al.* (Song *et al.*, 2005) les utilisent pour la première fois en 2005 pour la délivrance de siARN, dans le cas d'une inhibition de protéine virale dirigée contre le VIH. Il est également possible de coupler des anticorps aux oligonucléotides en faisant réagir un anticorps couplé à une fonction azoture et un ASO possédant un groupement cyclooctyne pour obtenir un lien triazole. Cette méthode est réalisée par Satake *et al.* (Satake *et al.*, 2016) pour coupler l'anticorps anti-CD22 et l'oligonucléotide MXD3. Cet oligonucléotide cible une protéine dimérique (MXD3) associée au facteur de transcription MYC, responsable de la survie des cellules précurseurs des lymphocytes B dans les leucémies lymphoblastiques aiguës. L'anticorps quant à lui, est une protéine anti-cluster de différenciation 22 (CD22) qui cible spécifiquement les cellules décrites ci-dessus. Il a été démontré que le conjugué induisait une inactivation de la protéine MXD3 qui entraîne une apoptose *in vitro* dans les cellules leucémiques. Ce conjugué entraîne également une cytotoxicité dans les cellules B normales mais pas dans les cellules hématopoïétiques, y compris les cellules souches. *In vivo*, les résultats sont prometteurs car à une dose de 0,2 mg / kg deux fois par semaine pendant 3 semaines, le temps de survie des souris a plus que doublé (médiane 20,5 jours / 42,5 jours).

Ainsi, les conjugués anticorps-ASO permettent une nouvelle approche thérapeutique intéressante pour diminuer les doses et orienter l'accumulation des ASO dans les cellules responsables de la pathologie.

6. Cholestérol

Les conjugaisons lipidiques, et particulièrement les dérivés de cholestérol, sont souvent utilisées pour une vectorisation des oligonucléotides. Ce type de résidu couplé à l'oligonucléotide conserve l'activité biologique sous certaines conditions. L'étude de Godeau *et al.* montre une meilleure internalisation cellulaire *in vitro* de la molécule après greffage par « chimie click » d'un groupement lipidique, cholestérol ou acide stéarique, tout en conservant l'activité antisens par un mécanisme de bloqueur de l'IRES du virus de l'hépatite C (Godeau *et al.*, 2008).

In vivo, le caractère amphiphile apporté par les résidus lipidiques permet une liaison aux lipoprotéines de haute ou de basse densité (HDL et LDL) puis une internalisation par interaction avec les récepteurs aux lipides. Ceci permet aux oligonucléotides d'échapper à la clairance rénale, après une injection intraveineuse ou intrapéritonéale, par l'interaction avec ces protéines et donc l'augmentation de leur poids moléculaire apparent. En culture cellulaire sur une lignée KB-8-5, le cholestérol permet aux siARN d'échapper à la voie endosomale sans agent de transfection. Cette conjugaison entraîne une accumulation de siARN dans l'espace intercellulaire, avec une concentration élevée au contact des cellules 4 heures après ajout des molécules. Après 24 h, la distribution devient homogène avec une accumulation dans le cytoplasme des cellules (Chernikov *et al.*, 2017; Petrova *et al.*, 2012). Cependant, la liaison directe à l'extrémité 5' entre le cholestérol et l'oligonucléotide réduit l'activité inhibitrice de la molécule (siARN ou ASO) (Petrova *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2018). Un espaceur entre l'oligonucléotide et le cholestérol est essentiel pour conserver l'activité biologique par dégradation de l'ARNm.

Ainsi, plusieurs études ont validé l'avantage de coupler un dérivé cholestérol sur un oligonucléotide afin de diminuer la clairance rénale par une affinité avec les HDL et LDL rencontrées dans la circulation sanguine tout en conservant l'activité inhibitrice de l'oligonucléotide. Ainsi l'ApoB a été ciblée dans le foie par un siARN-cholestérol en injection intraveineuse journalière (sur 3 jours) avec une inhibition de 65 % à une dose de 50 mg/kg (Soutschek *et al.*, 2004). La protéine huntingtine a été inhibée de 56 à 66 % après une seule injection intrastriatale de siARN couplé au cholestérol. Ces résultats semblent montrer une amélioration de vectorisation du conjugué siARN-cholestérol par rapport au siARN seul au niveau de différents types cellulaires autres que les cellules hépatiques (DiFiglia *et al.*, 2007).

Des études récentes ont couplé un résidu cholestérol à un siARN, sur le brin sens ou antisens, par un lien photo-clivable (Figure 8). Ce modèle a été testé sur des hépatocarcinomes HepG2, avec une bonne inhibition pour 3 gènes, 2 exogènes (luciférase et gfp) et 1 endogène (Eg5). Cette conjugaison internalise les molécules amphiphiles sans inhiber la cible en absence de *stimulus* lumineux. L'activité inhibitrice des siARN est restaurée après clivage du cholestérol (Yang *et al.*, 2018).

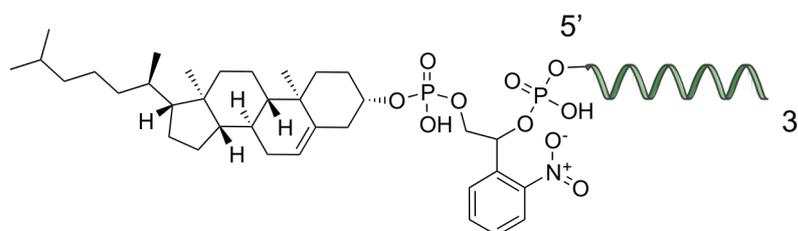


Figure 8 : Structure moléculaire d'un oligonucléotide conjugué au cholestérol photoclivable

Adapté de Yang *et al.*, 2018

Les oligonucléotides peuvent également être conjugués à l'extrémité 5', 3' ou en cours de séquence. La position de ce résidu hydrophobe peut jouer un rôle important dans l'activité de l'antisens. En effet, une étude récente référence six constructions conjuguées avec le cholestérol lié de manière covalente soit aux extrémités, soit après les thymidines en cours de séquence. Cet oligonucléotide est un *gapmer* constitué à l'extrémité 5' de deux nucléotides modifiés chimiquement en position 2' par des LNA et de trois résidus LNA à l'extrémité 3'. Cette séquence cible l'ApoB, et les résultats révèlent une meilleure activité *in vitro* lorsque le cholestérol est positionné à l'extrémité 5' ou en cours de séquence, qu'à l'extrémité 3'. *In vivo*, la conjugaison du cholestérol permet une bioaccumulation au niveau du foie sans différence significative entre la conjugaison aux extrémités ou dans la région ADN. La nature du lien entre le cholestérol et l'oligonucléotide semble avoir son importance sur la biodistribution. Le lien PO ne permet pas une accumulation aussi massive qu'avec le lien PTO. L'activité *in vivo* est cependant compromise avec la conjugaison PTO du cholestérol. En effet, que ce soit à l'extrémité 5' ou dans la séquence, l'oligonucléotide conjugué n'améliore pas l'efficacité du non conjugué. Cependant, l'oligonucléotide conjugué avec le lien PO améliore l'activité biologique de l'ASO d'un facteur 5. Cette observation de Nakajima *et al.* laisse penser que le lien PO peut être clivé dans le foie ce qui générerait un ASO natif vectorisé, n'empêchant aucunement l'activité biologique (Nakajima *et al.*, 2017). Le choix de la

chimie interbase est important pour la conjugaison du cholestérol car le lien PO ne permet pas de résister aux nucléases, mais le lien PTO empêche, dans cette étude, l'activité de l'ASO (Figure 9).

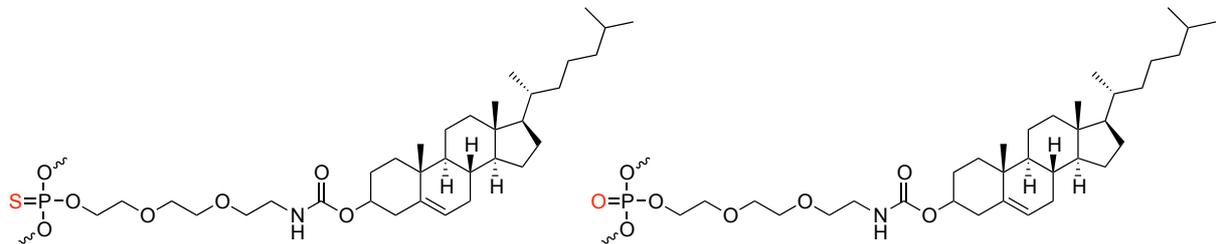


Figure 9 : Schéma de la conjugaison du cholestérol par un lien PTO (gauche) ou phosphodiester (droite)

Adapté de Nakajima *et al.*, 2017

Il est également possible de conjuguer le cholestérol par un lien disulfure afin de cliver la partie lipidique de la partie oligonucléotidique en condition cellulaire comme cela a été réalisé dans l'étude de Moschos *et al.* en 2007 (Moschos *et al.*, 2007).

7. Squalène

Le squalène est un triterpène naturel d'origine animale ou végétale (céréales, fruits, etc.), hydrophobe et précurseur du cholestérol (Figure 10).

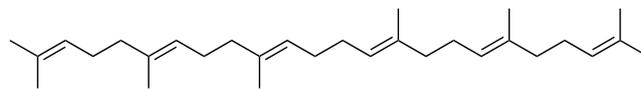


Figure 10 : Structure moléculaire du squalène

L'utilisation de composés hydrophobes dans la modification des oligonucléotides permet de leur donner un caractère amphiphile intéressant. Le squalène est conjugué à l'extrémité 3' du brin sens du siARN avec une chimie maléimide-sulfhydryle. Ces structures squalène-siARN forment des assemblages supramoléculaires sphériques en milieu aqueux d'environ 165 ± 10 nm de diamètre avec un potentiel de surface de -26 mV. Ces nanoparticules augmentent la stabilité des acides nucléiques par rapport aux siARN seuls avec ou sans sérum. Ces nanoparticules ont été étudiées *in vitro* et *in vivo* pour leur potentielle action sur la protéine ciblée RET/PTC1. Une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* de 70 % après 19 jours par injection intraveineuse à une concentration de 2,5 mg/kg aux jours 0, 2, 4, 7 et 10 a été observée (Raouane *et al.*, 2011, 2012).

8. Acides gras

Un exemple de molécule oligonucléotidique conjuguée avec un lipide (GRN163L) est en essai clinique (phase 2) pour le traitement de la myélofibrose. Cet oligonucléotide est en série thio-phosphoramidate et est couplé à un acide gras saturé de 16 carbones à l'extrémité 5' (Figure 11) (Burchett *et al.*, 2014; Goldblatt *et al.*, 2009; Herbert *et al.*, 2005).

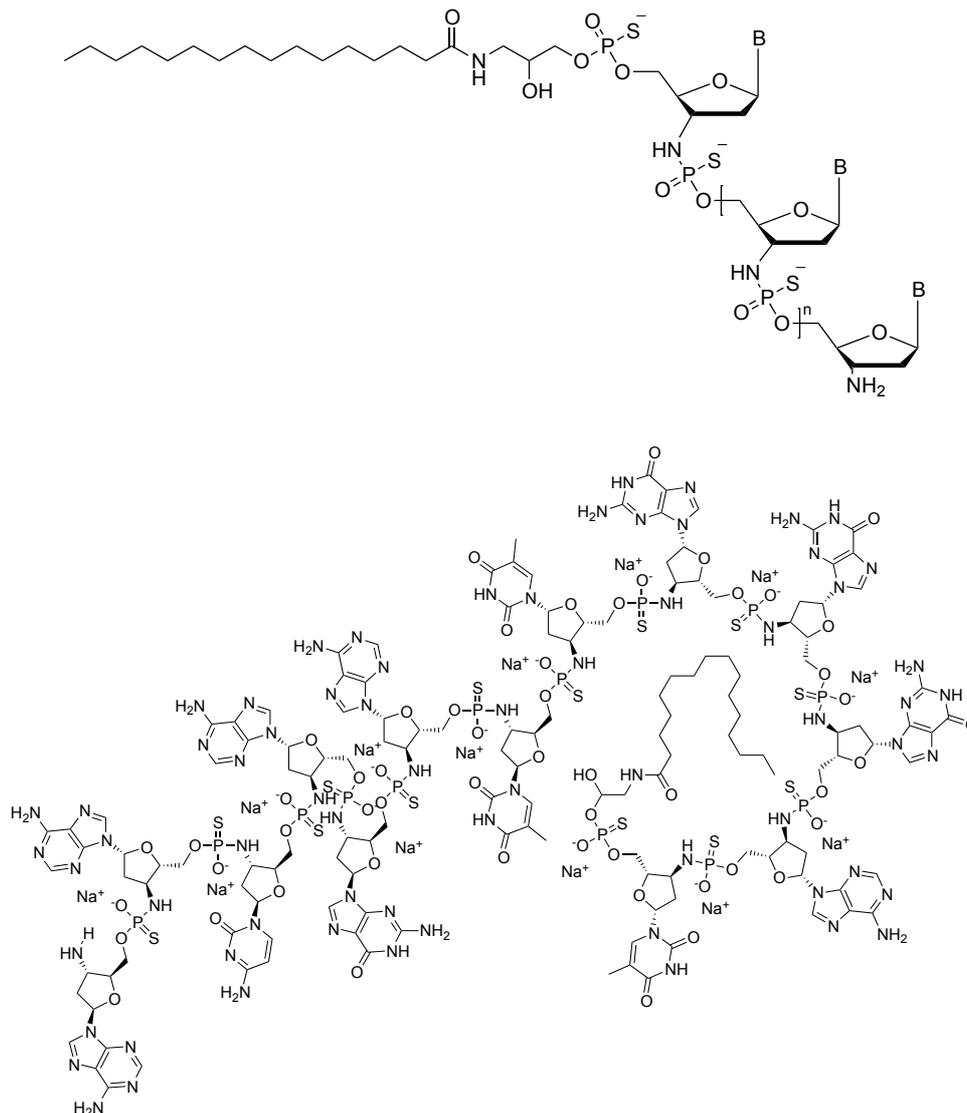


Figure 11 : Structure moléculaire du GRN163L

L'oligonucléotide lipidique GRN163L, de séquence 5' – Palm – TAGGTGTAAGCAA – NH₂ – 3', est synthétisé en chimie thio-phosphoramidate (haut) et permet l'inhibition des activités télomérases. La structure développée (bas) est issue du site internet Chemspider¹

La conjugaison lipidique par le groupement palmitoylé augmente l'effet inhibiteur de l'oligonucléotide contre la télomérase. Cette étude a été réalisée *in vitro*, à une

¹ <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.34983286.html> consulté le 18/05/2018

concentration de 1 μM , et *in vivo* après xénotransgreffe sur les membres postérieurs d'un modèle murin à une concentration de 50 mg/kg injecté par voie intraveineuse. Tous les essais ont été réalisés sans agent de transfection. *In vitro*, les résultats montrent une amélioration de l'activité inhibitrice d'un facteur 1,4 à 39 selon le type cellulaire (col de l'utérus, glioblastome, hépatocarcinome, poumon, mélanome, myélome, ovaire et prostate). *In vivo*, l'activité de la télomérase est inhibée de 56 % après 24 h par rapport au contrôle GRN163 sans lipide ou par rapport au PBS (Herbert *et al.*, 2005). Une étude plus récente compare l'activité du GRN163L avec son homologue 5'oléic163, l'oligonucléotide de même séquence couplé à l'acide oléique (Goldblatt *et al.*, 2009). Ces deux molécules ont été testées sur des cellules de cancer du sein HER2+ en combinaison avec le trastuzumab, un anticorps monoclonal recombinant spécifique des récepteurs HER2, utilisé dans la thérapie anticancéreuse de certaines formes de cancer du sein (HER2+). Cette bithérapie (lipide oligonucléotide / trastuzumab) montre un effet synergique vis-à-vis de la prolifération cellulaire cancéreuse. La nature du lipide n'engendre pas d'effet significativement différent sur l'inhibition de la cible. Le conjugué lipidique de cette étude n'est pas un facteur clef dans l'activité de l'oligonucléotide. Cette combinaison est également testée sur des cellules mammaires non tumorigéniques, sans effet notable sur la prolifération.

De nombreux cancers ont une activité de la télomérase surexprimée. Bloquer cette enzyme revient à réduire la taille des télomères et ainsi diminuer la viabilité des cellules cancéreuses. L'expression de la télomérase de 10 lignées cellulaires de pancréas a été évaluée et inhibée par GRN163L. Les concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) varient entre 50 et 200 nM. L'exposition continue de l'oligonucléotide lipidique entraîne rapidement le raccourcissement des télomères. La taille n'est pas modifiée durant l'expérience, et pendant 3 semaines après la culture sans oligonucléotide modifié. La réactivation des télomérases et l'élongation des télomères reprennent lorsque la substance active n'est plus présente. La durée de vie des cellules pancréatiques cancéreuses est réduite lorsque les enzymes d'élongation des télomères sont bloquées et inactives. Le GRN163L permet de bloquer l'évolution du cancer pancréatique par inhibition des télomérases et maintien de courts fragments télomériques. L'action n'est donc pas curative mais permet de restaurer un phénotype plus facile à éradiquer par les méthodes conventionnelles.

En octobre 2017, le GRN163L (Imetelstat) a obtenu le statut de « *Fast Track* » de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA pour *Food and Drug Administration* en anglais) pour certains patients atteints de syndrome myélodysplasique (Corporation, 2017).

Les oligonucléotides sont des molécules à fort potentiel thérapeutique. L'inconvénient majeur est leur faible pénétration cellulaire et leur demi-vie dans l'organisme. La résistance aux nucléases a été largement étudiée, et les modifications chimiques développées tout au long de ces années permettent dorénavant de moduler l'activité en fonction du type et de la position des modifications.

Les conjugués oligonucléotidiques sont plus récents et apportent à ces molécules de nouvelles capacités. Ainsi, le ciblage et l'internalisation par les GalNAc par exemple permettent une diminution de la dose de substance active pour les essais précliniques.

Certaines études couplent même plusieurs molécules à un oligonucléotide. L'étude de Tajik-Ahmadabad *et al.* (Tajik-Ahmadabad *et al.*, 2017) a développé un CPP, issu de l'Apolipoprotéine E, greffé à l'acide myristique à l'extrémité N-terminal et une cystéine à l'extrémité C-terminal. Ce dernier résidu permet de lier l'ASO à l'extrémité 3' par un lien maléimide. Cet ASO est en chimie PMO et vise à inhiber l'épissage de l'exon 7 dans la pathologie d'atrophie musculaire spinale (SMA) sur l'ARN pré-messager SMN2. Cette stratégie thérapeutique de modulation de l'épissage sera développée dans le prochain chapitre. Ces molécules amphiphiles s'auto-organisent en milieu aqueux et permettent de diminuer la concentration d'un facteur 4 pour avoir la même activité biologique que le conjugué CPP-ASO.

Une autre étude menée par Wada *et al.* consiste à coupler le cholestérol et le GalNAc sur un oligonucléotide (Wada *et al.*, 2018). Ces modifications sont couplées à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide ciblant l'ApoB (Figure 12).

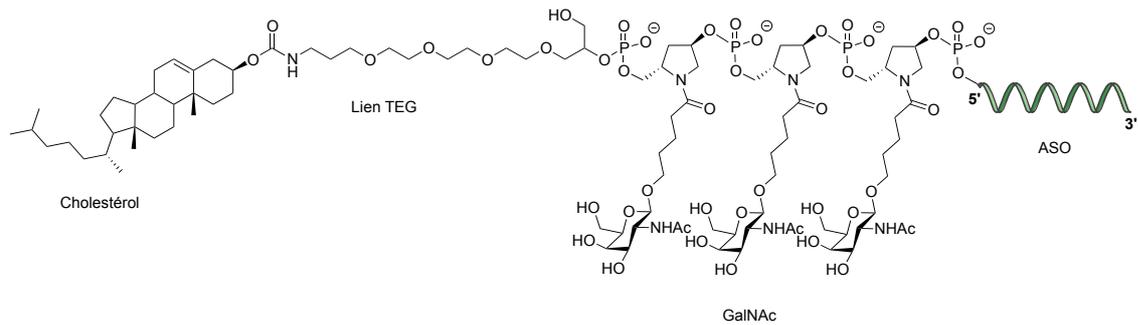


Figure 12 : Stratégie de couplage du cholestérol et du GalNAc sur un oligonucléotide
Adapté de Wada *et al.*, 2018

TEG : Triéthylène glycol ; GalNAc : *N*-acétylgalactosamine ; ASO : Oligonucléotide antisens

Le cholestérol a également été couplé à l'extrémité 3' avec une extension de 3 nucléotides liés par des groupements phosphates, afin de comparer l'efficacité de ces deux conjugués. Chaque greffage est réalisé avec un phosphate sensible aux endonucléases afin de pouvoir libérer l'ASO natif au contact du tissu ou des cellules ciblées. Après dosage, il s'avère que le clivage est effectué dans les 48 h après l'administration. La double conjugaison cholestérol-GalNAc a prouvé son efficacité pour réduire la posologie de l'ASO nu mais également modifier sa biodistribution. L'accumulation rénale du GalNAc seul couplé à l'extrémité 5' est similaire à la double conjugaison, GalNAc et cholestérol, à l'extrémité 5'. L'accumulation dans les reins de la double conjugaison au 2 extrémités est cependant bien inférieure (d'un facteur 5) et est beaucoup plus faible que pour l'ASO non conjugué (d'un facteur 50). L'activité biologique des ASO n'est pas influencée par ces conjugaisons. Ces modifications permettent alors une meilleure distribution dans le foie.

Dans ce dernier chapitre, l'utilisation d'un lipide couplé à l'extrémité 5' a montré une meilleure efficacité que l'oligonucléotide nu. Ce conjugué a même obtenu un statut de « *Fast Track* » afin de développer rapidement ce potentiel médicament.

Les oligonucléotides sont cependant déjà utilisés en clinique, par des injections locales ou systémiques. Le chapitre suivant développe les oligonucléotides ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou en fin d'étude clinique de phase 3.

E. Application thérapeutique des oligonucléotides

De nombreuses cibles thérapeutiques sont traitées par des oligonucléotides. Plusieurs d'entre eux sont actuellement en phase clinique ou préclinique (Bennett and Swayze, 2010; Evers *et al.*, 2015; Girelli *et al.*, 2018; Schoch and Miller, 2017). Les

mécanismes d'inhibition principalement utilisés font intervenir la modulation de l'épissage ou la RNase H. Certaines molécules bloquent la traduction par encombrement stérique comme c'est le cas pour les maladies neurodégénératives sur le récepteur p75 neurotrophine (p75NTR) (Turner *et al.*, 2003). Les modifications chimiques utilisées en études précliniques ou cliniques sont de différentes natures. Les plus utilisées sont les ADN PTO et les 2'-O-MOE. Dans une moindre mesure, les modifications de type 2'-OMe et les LNA sont également utilisées en phase 1 ou 2 d'essai clinique (Bennett and Swayze, 2010; Crooke *et al.*, 2018).

En 2010, la totalité des essais cliniques en phase 3 ainsi que les oligonucléotides approuvés par la FDA étaient en série PTO et faisaient intervenir la RNase H. Les molécules en phase clinique 1 ou 2 faisaient également majoritairement intervenir la RNase H mais présentaient des fonctions chimiques plus variées. Les modifications chimiques 2'-O-MOE, 2'-OMe, LNA et PMO sont utilisées, quant à elles, en tant que chimère.

1. Traitement de la rétinite à Cytomégalovirus par un ASO

Le Fomivirsén (Vitravene®) est le premier oligonucléotide développé pour une thérapie antisens approuvé par la FDA en 1998 et par l'Agence européenne des médicaments (EMA pour *European Medicines Agency* en anglais) en 1999 (Piascik, 1999). Cet oligonucléotide, développé par IONIS Pharmaceutical (anciennement ISIS) en collaboration avec Novartis Ophthalmics, permet de traiter les patients immunodéprimés contre le cytomégalovirus. Cette molécule, constituée de 21 nucléotides liés par des liens PTO, est complémentaire de l'ARNm du virus (Figure 13). Le traitement consiste en une injection intra-vitréenne hebdomadaire de 165 µg d'une solution de Fomivirsén à 6,6 mg/mL (Kozak *et al.*, 2013). L'AMM a été retirée le 30 juillet 2002 à la demande du fabricant pour des raisons commerciales. Le Vitravene® est toujours autorisé en Suisse et peut être délivré en Union Européenne sur demande spécifique.

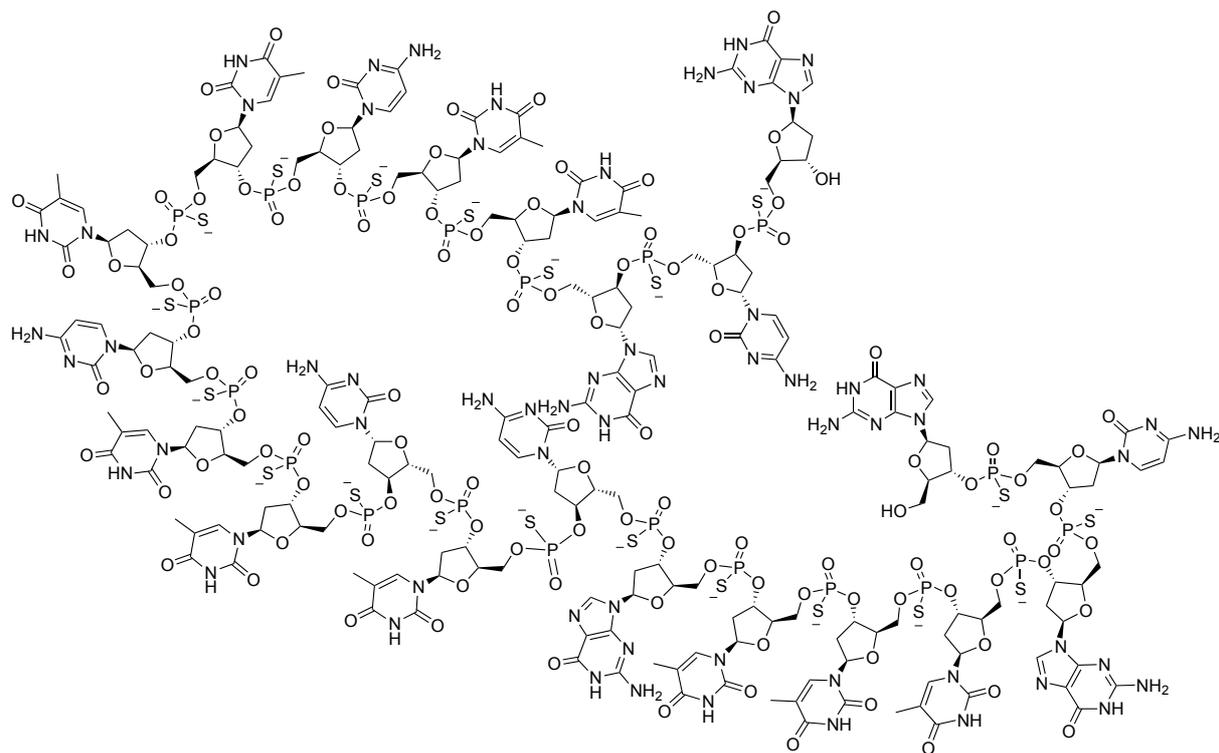


Figure 13 : Structure moléculaire du Fomivirsen, substance active du Vitravene®

La structure développée est issue du site internet Chemspider². La séquence de l'oligonucléotide est 5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'.

2. Traitement de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge par un aptamère

Le Macugen^{®3} (Pegaptanib) est un aptamère ciblant les facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF₁₆₅) (Fine *et al.*, 2005). Cette molécule est constituée de 27 nucléobases et contient un lien PTO 3'-3' désoxythymidine ainsi que deux chaînes ramifiées de polyéthylène glycol de 20 kDa chacune à l'extrémité 5'. Les purines sont méthylées en position 2' et les pyrimidines fluorées en position 2' dans la séquence de l'aptamère pour la résistance aux nucléases (Figure 14). Le Pegaptanib se lie au site de l'héparine sur le VEGF₁₆₅ avec une affinité de l'ordre du picomolaire. Le Macugen[®] est approuvé par la FDA depuis 2004 pour le traitement de la dégénérescence maculaire « humide » associée à l'âge (DMLA). C'est une maladie handicapante, caractérisée par la prolifération de vaisseaux sanguins derrière la rétine, entraînant des troubles voire la perte de la vision. Le Macugen[®] réduit localement la prolifération des vaisseaux sanguins dans l'œil. Ce médicament est injecté par voie intra-vitréenne et n'entraîne pas

² <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.17290388.html?rid=7bdc95ef-4815-40d9-b6b9-98e5bc9e335c> consulté le 18/05/2018

³ Cette molécule, initialement développée par NeXstar, a été rachetée par plusieurs sociétés dont Pfizer, Eyetech Inc ou encore Valeant. Le laboratoire Pharmaswiss ceska republika S.R.O est titulaire de l'autorisation depuis le 1^{er} septembre 2014.

de complication, même à des doses dix fois supérieures que celle présentant un effet thérapeutique optimal. Le médicament est commercialisé sous forme de seringues pré-remplies de 90 µL de solution contenant 0,3 mg de substance active.

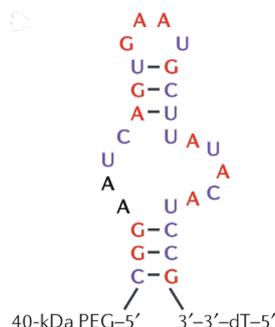


Figure 14 : Structure secondaire du Pegaptanib, substance active du Macugen®
Adapté de Ng *et al.*, 2006

Le Pegaptanib est une séquence oligonucléotidique structurée reconnaissant les facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF₁₆₅).

Plusieurs autres médicaments existent pour traiter la DMLA. En France, le Lucentis® (ranibizumab, Novartis) et l'Eylea® (aflibercept, Bayer) ont obtenu l'AMM dans l'Union Européenne, tandis que l'Avastin® (bévacizumab, Roche) s'ajoute à la liste des concurrents du Macugen® aux Etats-Unis. Ces 4 traitements sont approuvés par la FDA. Trois autres médicaments sont alors disponibles sur le marché pour le traitement de la DMLA. Leurs substances actives sont des protéines recombinantes ou des anticorps monoclonaux dont les cibles thérapeutiques sont également des VEGF.

Un autre acide nucléique est utilisé pour le traitement de la DMLA. Il s'agit du premier siARN utilisé chez l'Homme, appelé bevasiranib. Il est composé d'un duplexe de 21 nucléotides en série ARN et cible également les VEGF (Garba and Mousa, 2010). En combinaison avec le Lucentis®, les effets du bevasiranib n'apparaissent que six semaines après le début du traitement. Cependant, la combinaison Lucentis®/bevasiranib permet d'atteindre une meilleure acuité visuelle qu'avec le Lucentis® seul. Le bevasiranib n'est pas approuvé par la FDA par manque d'efficacité (Crooke *et al.*, 2018).

3. Traitement de maladies cardiovasculaires par un ASO

Le Mipomersen (Kynamro®) est une molécule de 20 nucléobases développée par IONIS et approuvée par la FDA en janvier 2013. Elle a été rachetée par Genzyme Corporation en 2008. La chimie de cet oligonucléotide fait intervenir le concept de chimère avec des nucléotides modifiés par des groupements 2'-O-MOE aux extrémités 5'

et 3'. Les 5 nucléobases de chaque extrémité sont en série 2'-O-MOE et les 10 nucléobases centrales en série PTO (Figure 15).

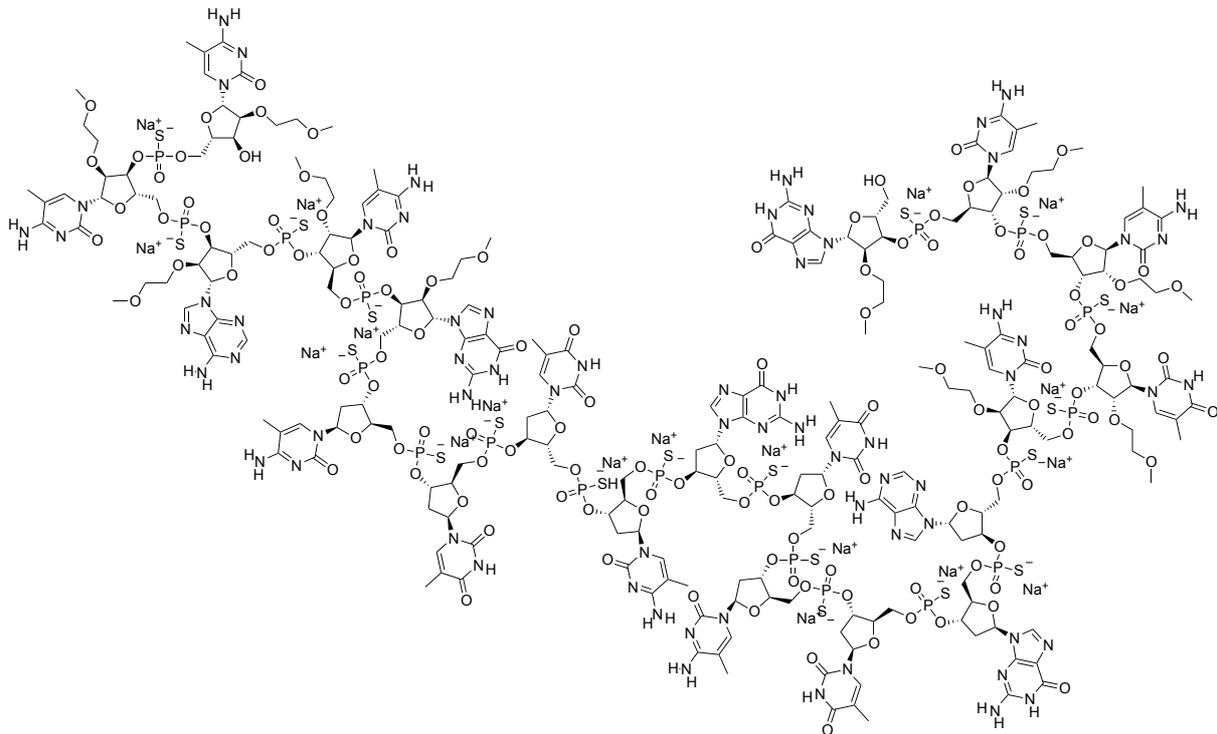


Figure 15 : Structure moléculaire du Mipomersen sodique, substance active du Kynamro®

La structure développée est issue du site internet Chempidier⁴. La séquence de l'oligonucléotide est 5'-GCC UCA GTC TGC TTC GCA CC-3'.

Ce médicament cible les maladies cardiovasculaires en agissant sur l'ApoB par un mécanisme RNase H. Il s'administre en injection sous-cutanée hebdomadaire (Ajufo and Rader, 2018). L'EMA n'a pas approuvé cette molécule après 2 demandes en 2012 et 2013 à cause des effets secondaires potentiels aux niveaux cardiovasculaire et hépatique. Le Kynamro® a été racheté par Kastle Therapeutics en mai 2016.

4. Traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) par « exon skipping »

L'exondys 51® est un médicament commercialisé par Sarepta, composé d'éteplirsén, un oligonucléotide PMO (Figure 16) utilisé pour le saut de l'exon 51 du gène *DMD*.

⁴ <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.24710309.html> et <http://www.kynamro.com> consultés le 18/05/2018

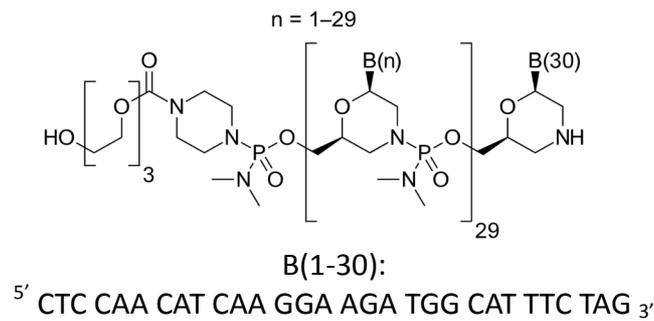


Figure 16 : Structure moléculaire de l'éteplirsen, substance active de l'exondys 51®

Cette excision de l'exon 51 au cours de l'épissage des ARN pré-messager décale le cadre de lecture de la dystrophine, ce qui peut permettre, pour certains patients, de rétablir le cadre de lecture fonctionnel de l'ARNm de la dystrophine, et donc la production d'une protéine tronquée, sans les exons 49 à 51, mais fonctionnelle (Lim *et al.*, 2017) (Figure 17). Cet « exon skipping » permet de traiter environ 13 % des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (Aartsma-Rus and Krieg, 2017; Stein, 2016). Cette molécule est approuvée par la FDA depuis fin 2016 dans le cadre d'une procédure accélérée. Dans l'Union Européenne, la procédure d'AMM est toujours en cours d'examen. Ce médicament est administré en perfusion intraveineuse.

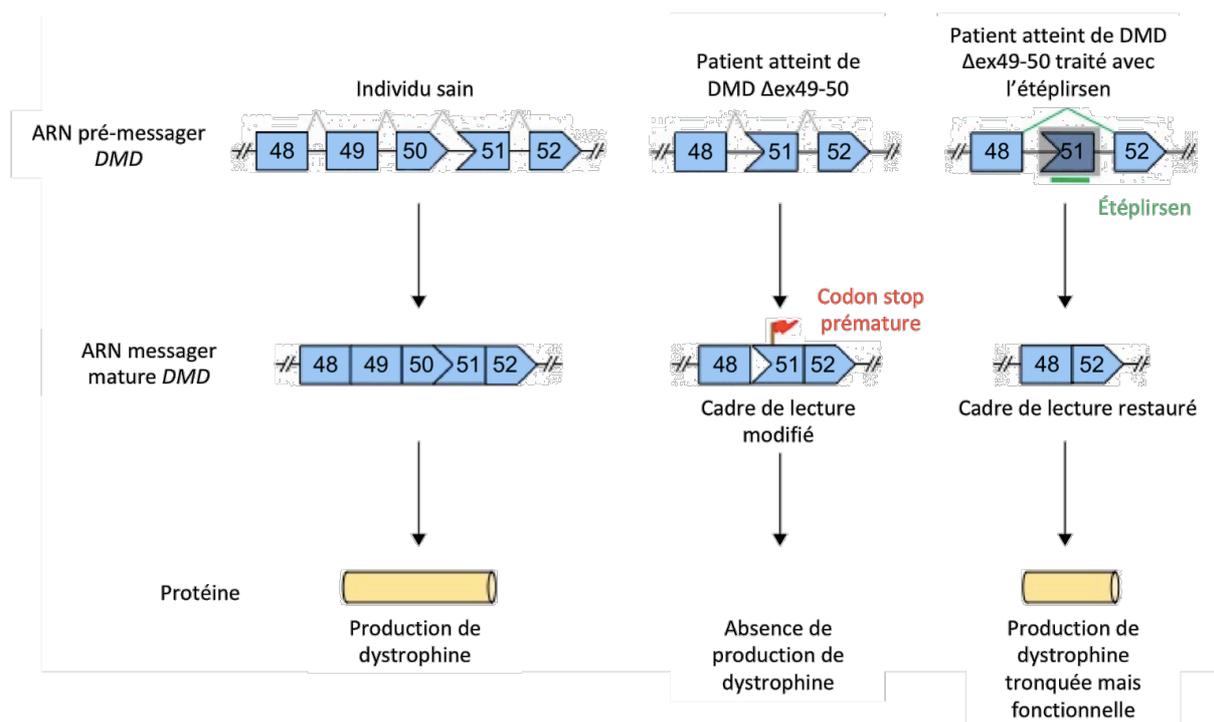


Figure 17 : Principe du mécanisme d'action de l'éteplirsen dans le traitement par saut de l'exon 51 dans la dystrophie musculaire de Duchenne

Adapté de Lim *et al.*, 2017

Un individu sain produit un ARNm mature de la DMD possédant tous les exons (gauche), un patient atteint de DMD a une déficience des exons 49 et 50 (centre). Le traitement avec l'éteplirsen entraîne un saut de l'exon 51 (droite). Le cadre de lecture est conservé, l'ARNm est traduit en une protéine tronquée mais fonctionnelle.

5. Traitement de l'atrophie musculaire spinale (SMA) par l'inclusion d'exons

Le laboratoire Biogen possède depuis décembre 2016 un oligonucléotide approuvé par la FDA. Le Spinraza®, développé par Ionis pharmaceutical, est composé de Nusinersen, un oligonucléotide de 18 nucléobases modifiées en 2'-O-MOE liées par un squelette PTO. Toutes les cytidines sont méthylées en position 5 (Figure 18). Ce produit est le seul traitement existant actuellement pour l'amyotrophie spinale, maladie héréditaire caractérisée par une faiblesse et une atrophie des muscles.

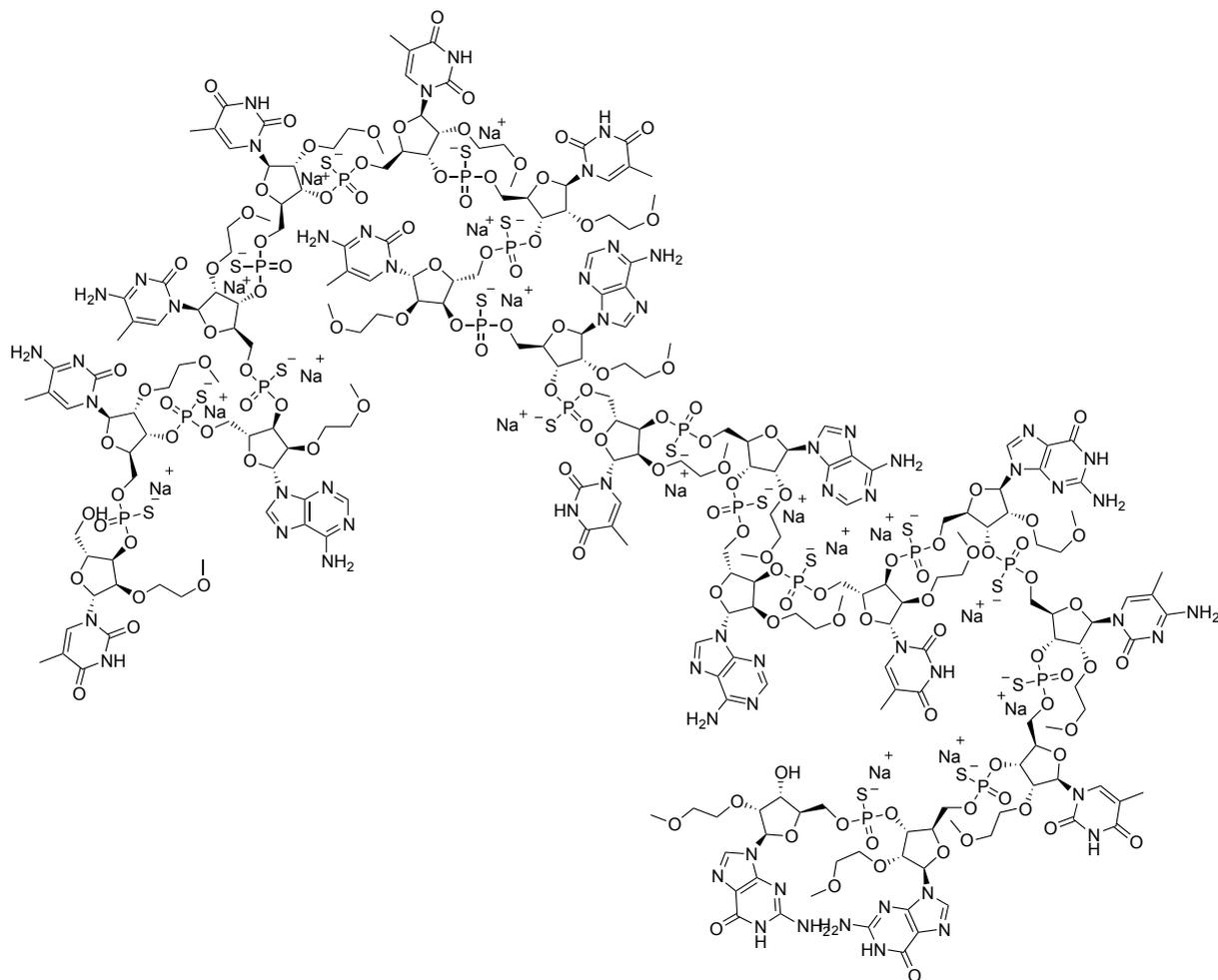


Figure 18 : Structure moléculaire du Nusinersen sodique, substance active du Spinraza®

La structure développée est issue du site internet Chemspider⁵. La séquence de l'oligonucléotide est 5'- TCA CTT TCA TAA TGC TGG -3'.

Chez un individu sain, la protéine SMN (*Survival Motor Neuron*) est codée à partir de l'ARNm SMN1 pour 90 % et par l'ARNm SMN2 pour 10 % car une variation sur le site d'épissage de SMN2 conduit à l'exclusion de l'exon 7 de l'ARN mature. SMN2 est un gène paralogue qui diffère de SMN1 de 5 à 11 nucléotides différents. La majorité des transcrits provenant de SMN2 exclut l'exon 7 ce qui engendre une protéine tronquée rapidement dégradée.

La protéine hnRNP, particules ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires (pour *heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins* en anglais) se lie sur la séquence d'inactivation de l'épissage intronique (ISS-N1) présente dans l'intron 7 de l'ARN pré-messager de SMN2 et conduit à une protéine biosynthétisée tronquée et dysfonctionnelle.

⁵ <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.34983394.html> consulté le 18/05/2018

Chez un patient atteint de SMA, une anomalie génétique ne permet pas la production de SMN par l'ARNm SMN1. Seulement 5 à 10 % de cette protéine sont donc produits par l'ARNm SMN2 ce qui entraîne une déficience et l'apparition des symptômes.

L'inhibition par compétition de la protéine hnRNP par l'ASO Nusinersen entraîne une augmentation du pourcentage d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits d'ARNm du gène codant SMN2 pour la protéine (Chiriboga *et al.*, 2016; Wood, 2018). Les facteurs d'épissage de l'ARN pré-messager sont déplacés et n'inhibent plus l'épissage normal. L'ARN pré-messager est épissé en ARNm contenant l'exon 7 qui est ensuite traduit en protéine SMN fonctionnelle de pleine longueur (Figure 19).

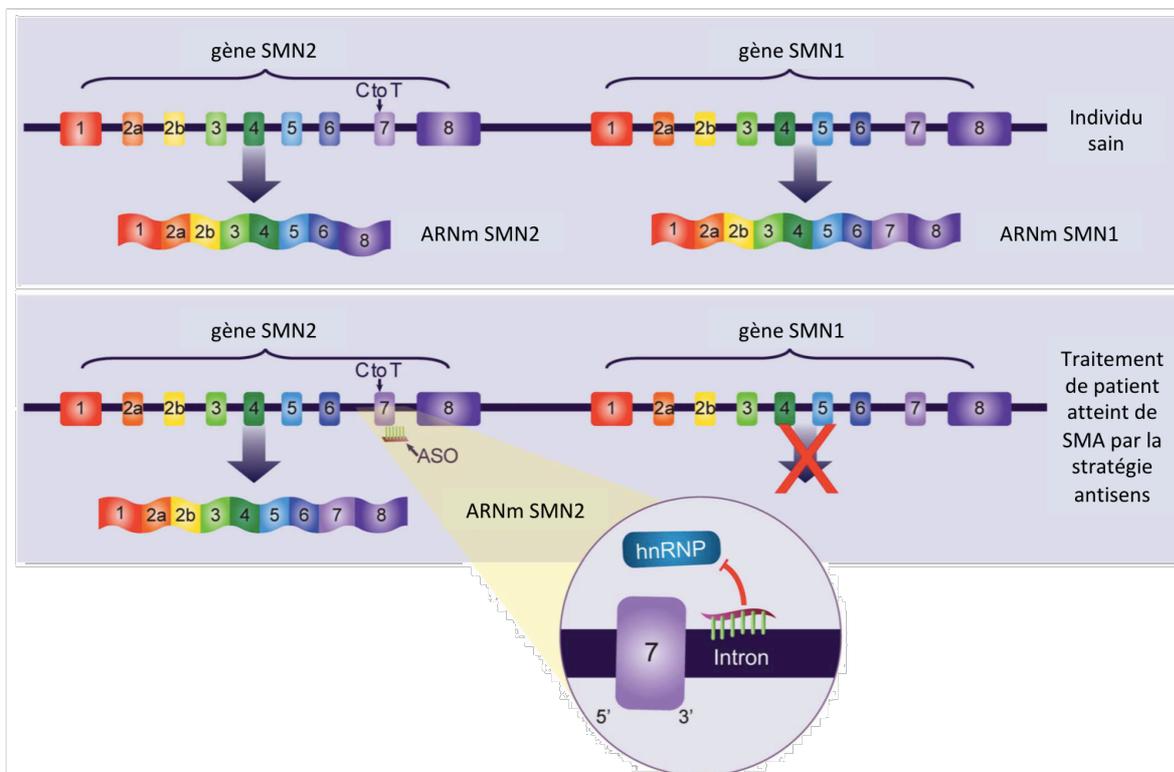


Figure 19 : Mécanisme d'action du Nusinersen

Adapté de Chiriboga *et al.*, 2016

Chez un individu sain, la protéine SMN est produite majoritairement (90 %) par l'ARNm SMN1 (haut). Chez un individu porteur de la mutation génétique entraînant la SMA, l'ARNm SMN1 n'est plus traduit. La production de protéine fonctionnelle n'est pas entièrement assurée par l'ARNm SMN2 qui ne code que pour 5 à 10 % de la protéine. Ce faible rendement est dû aux protéines hnRNP jouant un rôle de répresseur en masquant les sites d'épissage. L'inhibition par compétition de l'action de la protéine hnRNP par l'ASO Nusinersen entraîne une augmentation du pourcentage d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits d'ARNm SMN2. L'ARNm de SMN2 est traduit en protéine SMN complète et fonctionnelle (bas).

6. Traitement de la maladie veino-occlusive hépatique sévère par un mélange d'oligonucléotides naturels

Depuis octobre 2013, un cocktail d'oligonucléotides naturels a obtenu une AMM. La FDA approuve ce mélange appelée Defibrotide (Defitelio[®], Jazz Pharmaceuticals) depuis avril 2016. Ce médicament est commercialisé sous forme de solution pour une voie d'administration intraveineuse. Ce produit n'est cependant pas synthétique mais naturel obtenu par dépolymérisation contrôlée d'ADN de la muqueuse intestinale porcine. En réalité, c'est un mélange polydisperse d'oligonucléotides simple brin (90 %) et double brin (10 %) avec des liens interbases PO. Ce mélange est constitué d'oligonucléotides de 9 à 80 nucléobases avec une moyenne à 50 et une masse moléculaire de $16,5 \pm 2,5$ kDa. Ce médicament est indiqué dans le traitement de la maladie veino-occlusive hépatique sévère, également appelée syndrome obstructif sinusoidal survenant après transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou déclenché par une chimiothérapie à haute dose causant des dommages à l'endothélium sinusoidal hépatique (Bagal *et al.*, 2018).

Le mécanisme thérapeutique est mal connu, dû à la complexité du mélange et à sa très faible concentration, de l'ordre du femtomolaire. Il semblerait qu'il y ait une interaction entre les charges négatives des oligonucléotides polyanioniques et certaines protéines. La revue publiée par Pescador *et al.* (Pescador *et al.*, 2013) détaille et discute les différentes activités potentielles (pro-fibrinolytique, anti-thrombotique thrombolytique, anti-athérosclérotique, etc.) du Defibrotide.

7. Traitement de l'amylose héréditaire à transthyréline (ATTR) avec polyneuropathie par dégradation de l'ARNm

Le Patisiran et le Revusiran développés en collaboration entre Alnylam et Sanofi Genzyme⁶, et l'Inotersen développé par Ionis et GSK sont trois substances actives permettant de réduire l'expression de la transthyréline (TTR) (Shen and Corey, 2018). Ces agents thérapeutiques sont développés dans le traitement de l'amylose héréditaire à TTR avec polyneuropathie. Ces trois composés sont en phase clinique 3 et permettent de comparer l'efficacité de deux siARN, dont un conjugué au GalNAc et un ASO. Une étude compare l'activité inhibitrice de l'Inotersen et du Patisiran avec une diminution de l'expression de la TTR de plus de 80 % dans les deux cas (Niemi *et al.*, 2016).

⁶ <http://www.alnylam.com/alnylam-rnai-pipeline/clinical-trials>, consulté le 18/05/2018

L'Inotersen est un ASO de 20 nucléotides en série PTO sous forme de *gapmer* 5-10-5 avec des groupements 2'-O-MOE aux extrémités. Il est injecté par voie sous-cutanée à une dose de 300 mg par prise hebdomadaire. L'Inotersen, aussi appelé IONIS-TTR_{Rx} (Ackermann *et al.*, 2016), est un ASO nu ciblant l'ARN pré-messager qui fait intervenir la RNase H dans le noyau (Benson *et al.*, 2017). Les essais cliniques de phases 1 et 2 ont été réalisés sur une cohorte de 65 volontaires sains. Lors de l'essai clinique en phase 3, réalisé sur 172 patients atteints de la maladie pendant 64 semaines, trois cas de thrombocytopénie ont été référencés. La surveillance des plaquettes et de la fonction rénale a été augmentée dans l'espoir d'améliorer la gestion des effets secondaires⁷. Cet oligonucléotide a reçu l'autorisation de mise sur le marché de la Commission européenne pour le traitement de la polyneuropathie de stade 1 ou 2 chez des patients adultes atteints d'amyloïdose transthyréline héréditaire sous le nom commercial de TEGSEDI™ le 6 août 2018.

Les deux siARN (Patisiran et Revusiran) diffèrent de l'ASO par leur mécanisme d'action. L'inhibition est régulée par la prise en charge des siARN par les protéines AGO2 et le complexe RISC engendrant le mécanisme d'inhibition par RNAi.

Le Patisiran, aussi appelé ALN-TTR02, est le siARN le plus avancé en cours de développement, puisqu'il complète une étude de phase 3 chez des patients atteints d'ATTR. Il contient 11 modifications chimiques de type 2'-OMe et 4 résidus thymidines. L'administration de la formulation siARN LNP requiert un prétraitement composé d'anti-histamine, d'anti-histamine non stéroïdien et de glucocorticoïde. Lors des études de phase 1 et 2, le Patisiran administré sous forme de LNP réduisait la cible TTR de manière dose dépendante. En phase 2, l'administration intraveineuse de 0,3 mg / kg toutes les trois semaines réduit les taux de protéines TTR de 80 %. L'étude de phase 3 randomisée et contrôlée par placebo est réalisée sur 225 personnes souffrant de l'amylose héréditaire à TTR pendant 18 mois, avec un traitement de 0,3 mg/kg toutes les trois semaines. Des avantages statistiquement significatifs ont été démontrés dans les systèmes de notation standardisés mesurant la progression de la maladie et la qualité de vie. Les événements indésirables les plus fréquents chez les patients traités par Patisiran ont été l'œdème périphérique et les réactions liées à la perfusion (Crooke *et al.*, 2018;

⁷ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01737398>

<http://ir.ionispharma.com/news-releases/news-release-details/new-data-presented-peripheral-nerve-society-meeting-further>, consultés le 18/05/2018

Rizk and Tüzmen, 2017). Ce siARN est également commercialisé depuis le 10 août 2018 par la FDA et a obtenu un avis favorable du comité des médicaments à usage humain en juillet 2018 dans le but d'obtenir une AMM très prochainement.

Alnylam Pharmaceuticals développe en parallèle une substance active semblable conjuguée au GalNAc, en phase clinique 3. Cette molécule, le Revusiran, contient deux liens PTO, 22 substitutions 2'-OMe et le même nombre de 2'-F. C'est le premier siARN conjugué au GalNAc en essai clinique, administré par voie sous-cutanée. L'étude de phase 3 randomisée et contrôlée par placebo, est réalisée sur 206 patients. Le développement est interrompu à la suite de nombreux effets indésirables (dysfonctionnement hépatique, neuropathie périphérique progressive, acidose métabolique) et de nombreux décès. Les causes de ces différents effets indésirables n'ont pas été publiées mais la dose élevée de 500 mg par semaine peut y avoir contribué.

La figure 20 présente les événements importants de ces cinquante dernières années sur le thème des oligonucléotides. Les différentes substitutions et développement des modifications chimiques (jaune) ont été abordés dans le chapitre I B. La technologie antisens est la première découverte permettant de réguler la traduction par des oligonucléotides. Les principales découvertes et développement technologiques sont représentés en bleu et les études cliniques pour une application thérapeutique en vert (Lundin *et al.*, 2015). Les antisens sont là aussi les premiers à être utilisés chez l'Homme et à obtenir une AMM. Le mécanisme faisant intervenir la structure secondaire de l'oligonucléotide est utilisé depuis 2004 avec le premier aptamère, de plus bioconjugué à une molécule de PEG. Les siARN ne sont développés qu'à partir de 2001 et ne sont utilisés chez l'Homme qu'en 2005 avec le bévasiranib. Il s'ensuit alors les modulations de l'épissage. Les antagomirs sont des inhibiteurs de microARN utilisés depuis 2009 et les mimiques de microARN depuis 2013. Ces deux dernières classes d'oligonucléotides utilisent les microARN pour exercer une activité régulatrice d'un gène. Ainsi, le microARN-122 est inhibé dans le traitement de l'hépatite C chronique (Janssen *et al.*, 2013; van der Ree *et al.*, 2014) tandis que le mimique du microARN-34a permet d'amplifier son action antitumorale. Ce microARN est connu pour diminuer l'expression de plus de 30 oncogènes (Beg *et al.*, 2017).

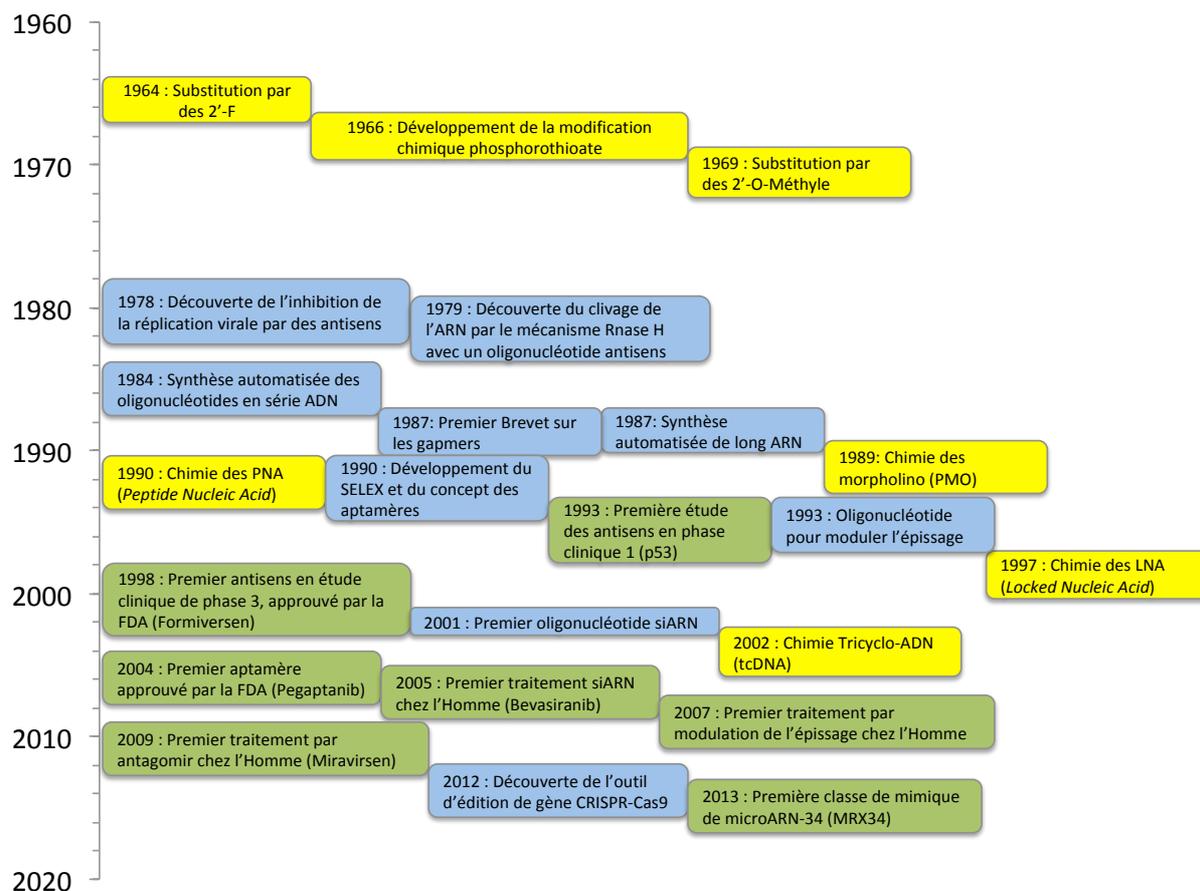


Figure 20 : Frise chronologique des principales découvertes pour les oligonucléotides thérapeutiques

Adapté de Lundin *et al.*, 2015

Les principales modifications chimiques développées pour les oligonucléotides sont représentées en jaune, les découvertes importantes en bleu et les premières utilisations chez l'Homme en vert.

La recherche dans le domaine de la chimie des oligonucléotides engendre différentes possibilités de modifications, substitutions ou couplages, et permet une croissance exponentielle du nombre de nouvelles molécules envisageables. L'évolution des études de biologie moléculaire génère de nouvelles cibles thérapeutiques et une meilleure compréhension des pathologies.

Plusieurs conjugués oligonucléotidiques sont déjà utilisés pour des tests précliniques mais aussi pour des tests cliniques comme les GalNAc (Revusiran), les polymères (Pegaptanib) ou les lipides (GRN163L). Un meilleur ciblage et une meilleure vectorisation sont les objectifs principaux de ces conjugaisons.

F. Présentation du projet

Les nucléolipides sont des molécules synthétisées et étudiées au laboratoire ChemBioPharm. Ce sont des conjugués lipide-nucléotide possédant des propriétés d'auto-assemblage supramoléculaire et de transfection (Baillet *et al.*, 2018).

L'objectif de ce projet est d'étudier le potentiel de ces molécules greffées sur les oligonucléotides. Le nucléolipide utilisé dans ce travail est constitué de deux chaînes lipidiques saturées conjuguées sur l'uridine par une fonction cétale en position 2' et 3'. La synthèse de ce nucléolipide ainsi que de son analogue phosphoramidite a été décrite pour la première fois par Gissot *et al.* (Gissot *et al.*, 2008b).

Le premier objectif de ce projet est d'évaluer les comportements microscopiques et macroscopiques ainsi que les propriétés physico-chimiques de ces molécules.

En parallèle, nous avons évalué la pertinence de cette modification pour la vectorisation cellulaire d'une séquence oligonucléotidique active. Une collaboration avec le Dr. Palma Rocchi (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM) nous a permis de répondre aux questions d'internalisation cellulaire, de mécanisme biologique associé ainsi que l'apport de cette modification sur l'inhibition de la cible thérapeutique.

Enfin, le caractère amphiphile de ces composés est utilisé pour la formulation de substances actives et de molécules possédant une action biologique intéressante synergique à l'action de l'ASO.

II. Chimie et physico-chimie des oligonucléotides

A. Chimies des oligonucléotides antisens et des conjugués

Dans le cadre de ce travail, nous avons collaboré, *via* l'INSERM Transfert, avec treize équipes de recherche nationale. La stratégie habituelle de développement consiste à concevoir une série d'oligonucléotides antisens susceptible d'inhiber la cible visée. Pour cela, les repliements ainsi que la composition en nucléotide de l'ARNm sont étudiés afin de choisir les séquences à tester. Un logiciel informatique a été développé dans l'équipe du Dr P. Rocchi, au CRCM, dans le but de simplifier la sélection de ces séquences. Les méthodes de synthèse et de purification de ces dernières sont exposées dans le Chapitre VI.

Dans ce manuscrit, seule la séquence d'oligonucléotides visant à inhiber la protéine TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) ainsi que son contrôle sera développée. Cet ASO, de séquence 5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3', cible vingt nucléotides de la séquence codante de TCTP. La nomenclature utilisée pour nommer les oligonucléotides est la suivante : ASO pour l'oligonucléotide antisens ciblant TCTP, LASO pour le conjugué nucléolipidique ASO, Scr pour la séquence contrôle 5' CGT GTA GGT ACG GCA GAT C 3' et LScr pour son conjugué nucléolipidique.

B. Synthèse automatisée d'oligonucléotides amphiphiles

Le couplage du nucléolipide est réalisé en cours de synthèse sur support solide comme décrit dans le Chapitre VI grâce au synthon phosphoramidite décrit dans Gissot *et al.* (Gissot *et al.*, 2008b) (Figure 21).

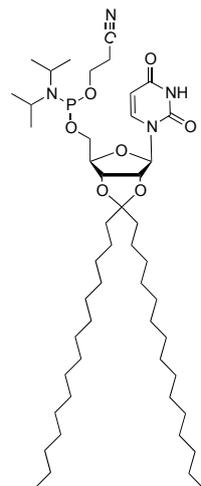


Figure 21 : Structure moléculaire du phosphoramidite nucléolipidique
Adapté de Gissot *et al.*, 2008b

Lorsque l'oligonucléotide est synthétisé, une dernière étape supplémentaire est réalisée pour greffer de manière covalente le nucléolipide à la structure oligonucléotidique (LASO et LScr). Une même molécule de structure identique est également synthétisée avec un groupement disulfure entre l'ASO et le nucléolipide (LASO SS). Les structures chimiques obtenues sont représentées en figure 22.

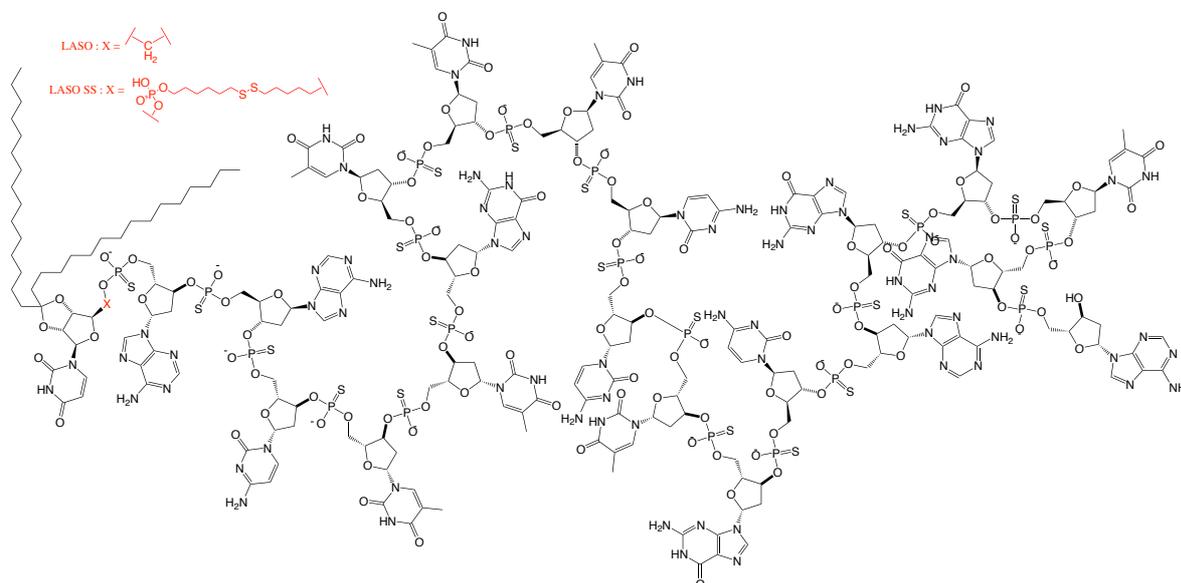


Figure 22 : Structures moléculaires du LASO et du LASO SS

La structure oligonucléotidique est identique entre le LASO et le LASO SS. Le lien clivable présent dans cette dernière molécule est composé d'un pont disulfure séparé de part et d'autre par une chaîne de 6 carbones. Le groupement phosphate à l'extrémité 5' relie l'oligonucléotide au nucléolipide par l'intermédiaire de l'alcool primaire en position 5'.

Le rendement de synthèse du couplage nucléolipidique sur ces molécules polyanioniques est caractérisé en chromatographie liquide haute performance (HPLC) par appariement

d'ions tri-éthyle ammonium. L'analyse chromatographique est réalisée en phase inverse, avec une phase stationnaire apolaire greffée avec des chaînes carbonées. La phase mobile est constituée d'ion tri-éthyle ammonium jouant le rôle de contre-ions pour la rétention des molécules par effets hydrophobes. Les conjugués nucléolipide-oligonucléotides possèdent deux chaînes hydrophobes de 15 carbones leur permettant une rétention supplémentaire par rapport aux oligonucléotides non conjugués. Ainsi, la séparation des molécules conjuguées par rapport aux oligonucléotides est aisée. Cependant, les avortons de synthèse ne sont pas séparés de l'oligonucléotide nu avec cette colonne chromatographique. Une colonne plus apolaire est utilisée pour pouvoir discriminer les oligonucléotides de différentes longueurs.

Les chromatogrammes analytiques (Figure 23) donnent une information sur le rendement de synthèse du dernier couplage c'est-à-dire du conjugué nucléolipidique (LASO et LScr). En effet, l'aire sous la courbe à 260 nm est proportionnelle à la quantité de matière d'oligonucléotide présent dans l'échantillon. Dans ces exemples de chromatogrammes, les rendements de synthèse des produits bruts sont supérieurs à 95 % pour les oligonucléotides (ASO et Scr) et d'environ 90 à 95 % pour les oligonucléotides nucléolipidiques (LASO et LScr).

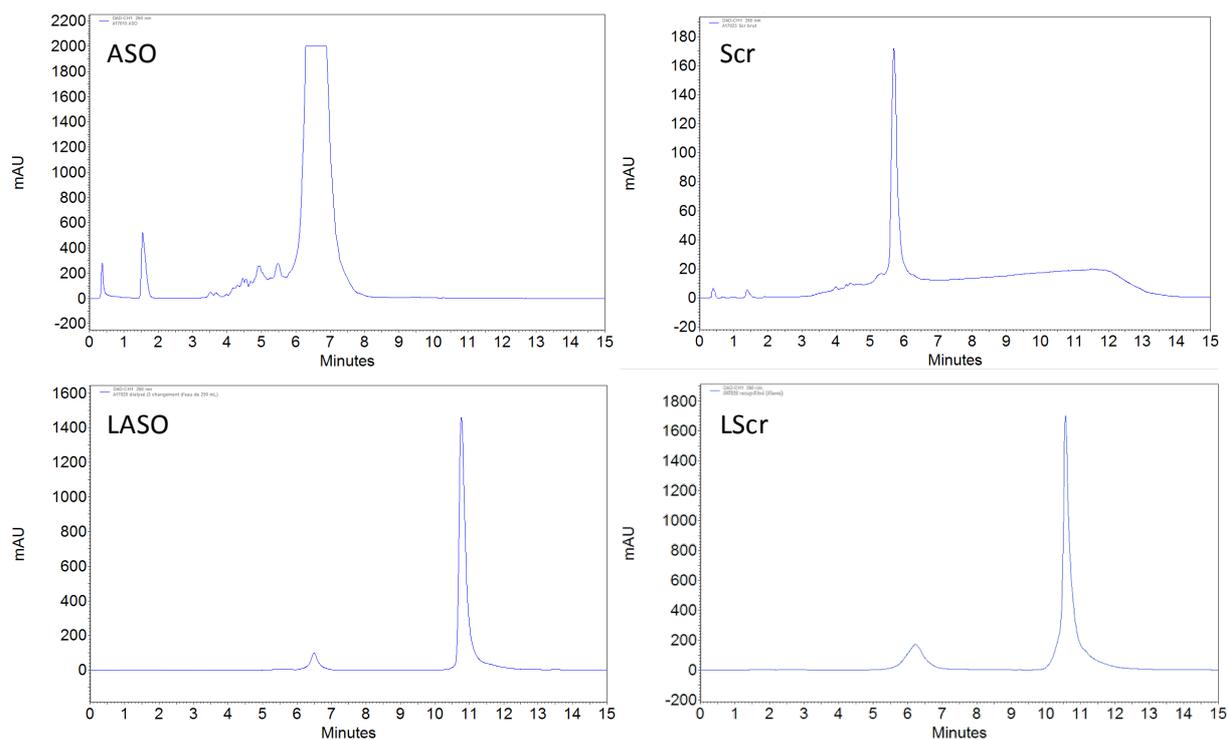


Figure 23 : Chromatogrammes des oligonucléotides ASO et contrôle Scr ainsi que leurs conjugués lipidiques respectifs

L'analyse chromatographique est réalisée avec une colonne hydrophobe C₁₈ pour les oligonucléotides classiques ASO, Scr (haut) et avec une colonne hydrophobe C₄ pour les conjugués nucléolipidiques LASO, LScr (bas).

ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

Les molécules sont purifiées par HPLC préparative, puis contrôlées par HPLC analytique avant d'être caractérisées par spectrométrie de masse (Figure 24).

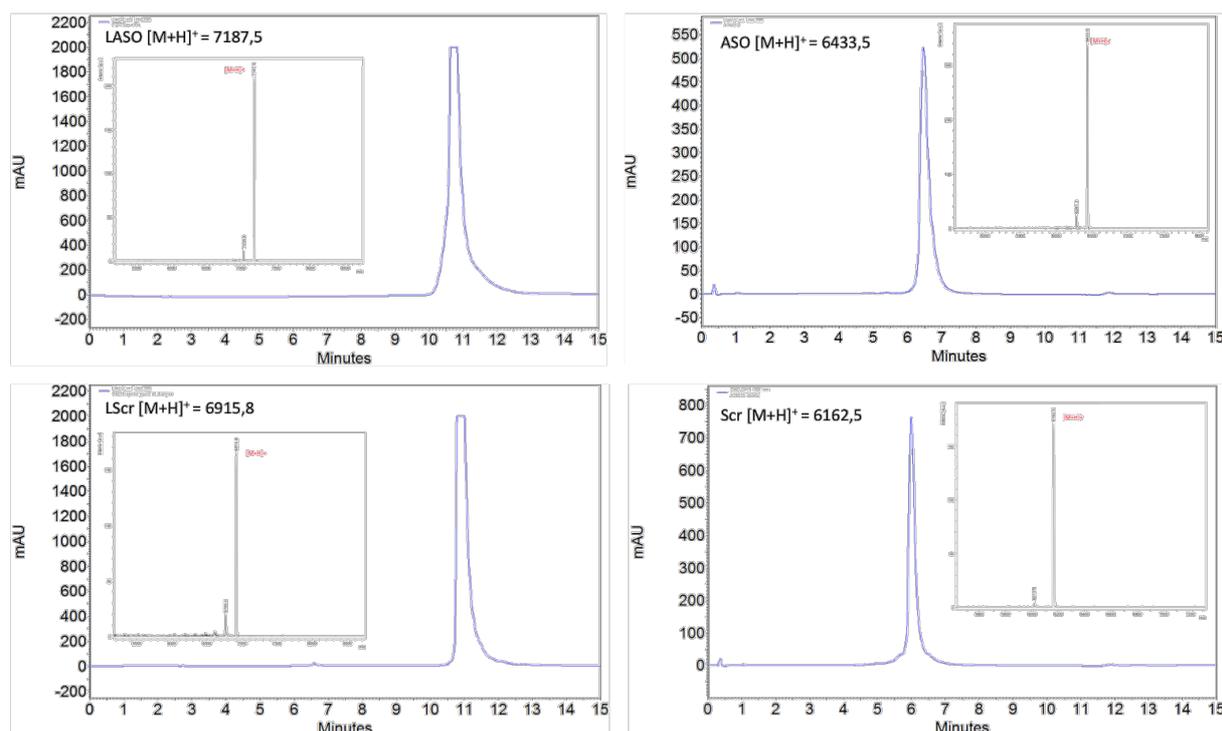


Figure 24 : Analyses qualitatives des oligonucléotides synthétisés

Chromatogrammes des oligonucléotides purifiés LASO, LScr (gauche) et ASO, Scr (droite). Les spectres de masses de chaque molécule sont ajoutés en insert du chromatogramme et en Annexes 2 à 5 (LASO, ASO, LScr, Scr respectivement).

ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

Les chromatogrammes obtenus renseignent sur la pureté des molécules pour les caractérisations physico-chimiques et les études biologiques. Les spectres de masses permettent de vérifier la qualité des synthèses effectuées. Les rapports masse/charge (m/z) des ions parents coïncident avec la masse théorique.

C. Stabilité chimique du LASO SS en condition réductrice

Le glutathion est la molécule réductrice non protéique la plus retrouvée dans les cellules de mammifère. Sa concentration est de l'ordre du millimolaire et peut atteindre une dizaine de millimolaires dans les cellules cancéreuses (Cao *et al.*, 2016; Gamcsik *et al.*, 2012). L'utilisation de ce paramètre cellulaire pour cliver la copule lipidique du LASO SS serait intéressante. La stabilité chimique de cette molécule est évaluée en présence d'agent réducteur. L'oligonucléotide conjugué avec le nucléolipide par un lien disulfure a été caractérisé comme précédemment, puis étudié en présence de dithiothréitol (DTT) pour mimer l'effet du glutathion. L'action de l'agent réducteur sur le LASO SS engendre deux molécules, le ASO SH et le nucléolipide NL SH (Figure 25).

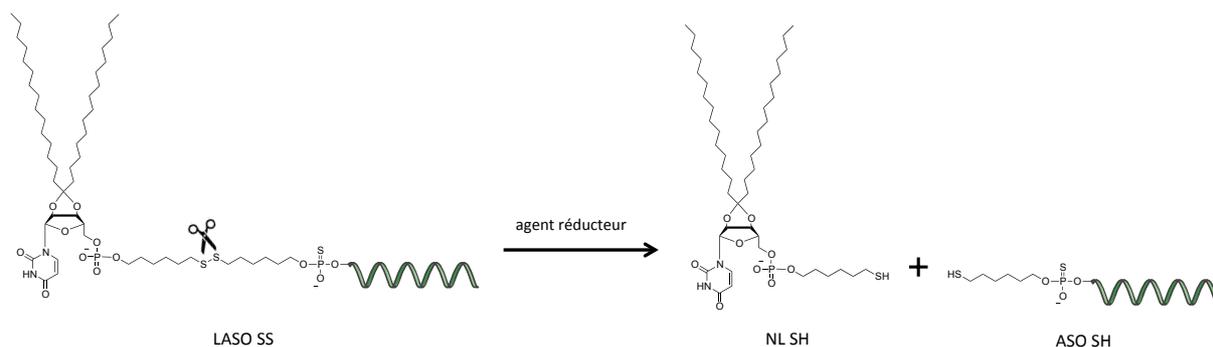


Figure 25 : Réduction du pont disulfure du LASO SS

Le LASO SS est clivé en condition réductrice pour libérer le ASO SH et le nucléolipide NL SH.

La stabilité du LASO SS en présence de DTT est suivie et dosée par HPLC sur une colonne chromatographique permettant de séparer les oligonucléotides nus des oligonucléotides nucléolipidiques. Des exemples de chromatogramme sont présentés en figure 26.

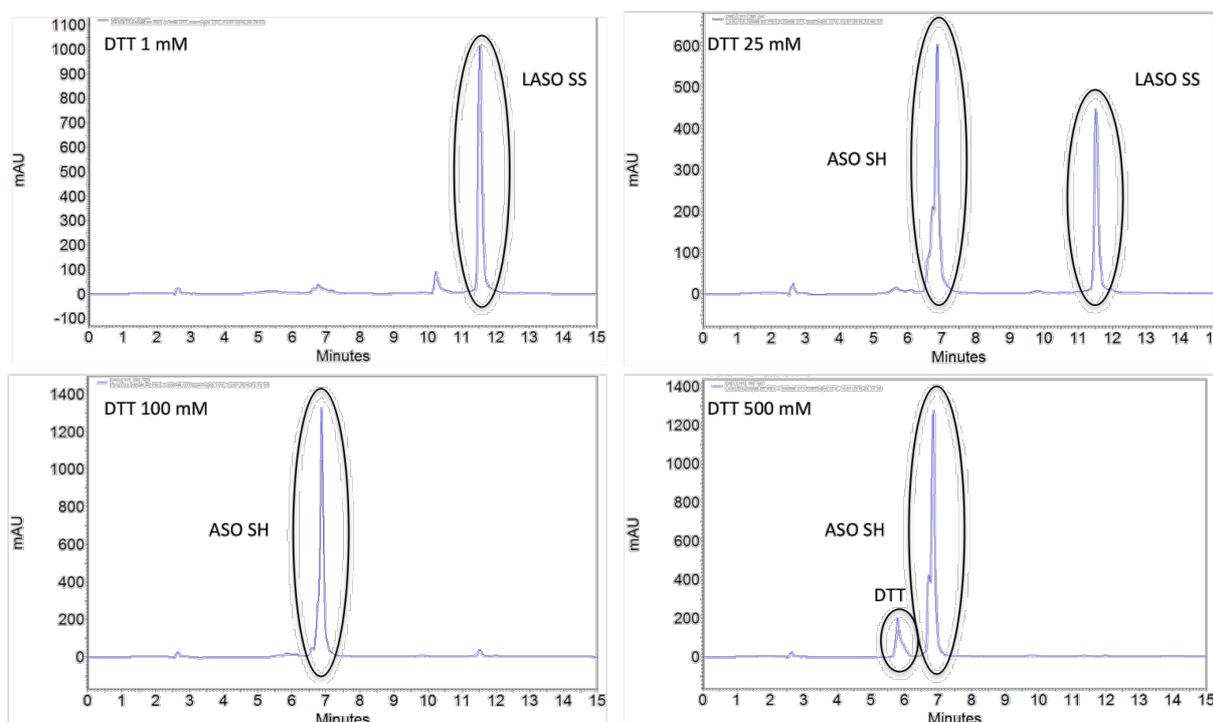


Figure 26 : Analyses HPLC de la stabilité du LASO SS en présence de DTT

L'analyse des molécules incubées 12 h à 37 °C est réalisée en HPLC sur une colonne analytique C₄. L'aire sous la courbe détermine la proportion de LASO SS pour les molécules avec un temps de rétention de 11,5 min et de 6,5 min pour les ASO SH.

La résolution de ces chromatogrammes est suffisante pour séparer le LASO SS et le ASO SH issu du clivage du pont disulfure par le DTT. L'aire sous la courbe étant proportionnelle à la quantité de matière de chaque molécule, la stabilité du LASO SS dans un milieu réducteur est mesurée par comparaison entre les proportions de ASO SH et de LASO SS. La compilation de ces données est représentée sur la figure 27.

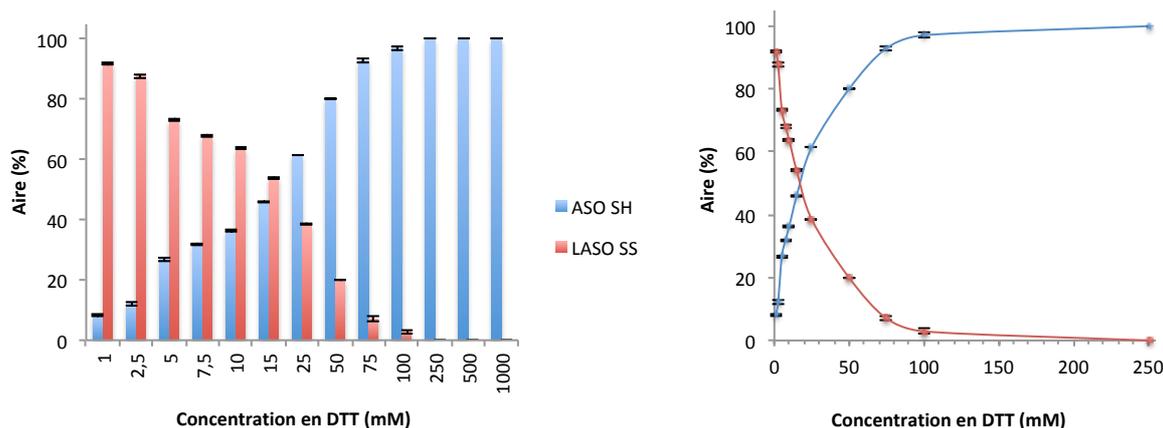


Figure 27 : Clivage du LASO SS en condition réductrice

Analyse de la stabilité chimique du LASO SS en présence de DTT à des concentrations de 1 à 1000 mM. Histogrammes présentant les résultats finaux du clivage du pont disulfure après une nuit à 37 °C (gauche). Influence de la concentration en DTT sur le clivage du LASO SS jusqu'à clivage complet de la molécule (droite).

Les graphiques représentés ci-dessus démontrent un clivage total du LASO SS après une période d'incubation de 12 h à 37 °C en présence d'une concentration supérieure ou égale à 250 mM de DTT. Ainsi, à des concentrations physiologiques d'agent réducteur de 1 à 10 mM, la molécule n'est clivée qu'entre 8 et 36 %. Étant donné qu'une concentration en agent réducteur de 10 mM est rarement retrouvée dans les conditions cellulaires, ceci suggère que moins de 36 % du LASO SS seraient exempt du nucléolipide. De plus, la modification de l'oligonucléotide par le pont disulfure a un impact non négligeable sur l'activité de la molécule ASO SH issue du clivage. En effet, le lien entre le phosphate et le thiol de la molécule clivée comporte une chaîne hydrophobe de 6 carbones pouvant engendrer une perte d'activité significative.

D. Comportement des conjugués nucléolipide-oligonucléotides en milieu aqueux

1. Détermination de la tensiométrie de surface

La tension de surface est un paramètre déterminant le caractère tensioactif des molécules. La tension superficielle entre deux fluides, ici l'eau et l'air, permet de déterminer la concentration saturante en molécules pour couvrir la totalité de l'interface avant de s'organiser en structure supramoléculaire. Il est ainsi possible de déterminer la concentration d'agrégation critique (CAC) qui correspond à la concentration à partir de laquelle la molécule amphiphile forme des assemblages supramoléculaires. Le LASO a été caractérisé dans l'eau distillée (Figure 28).

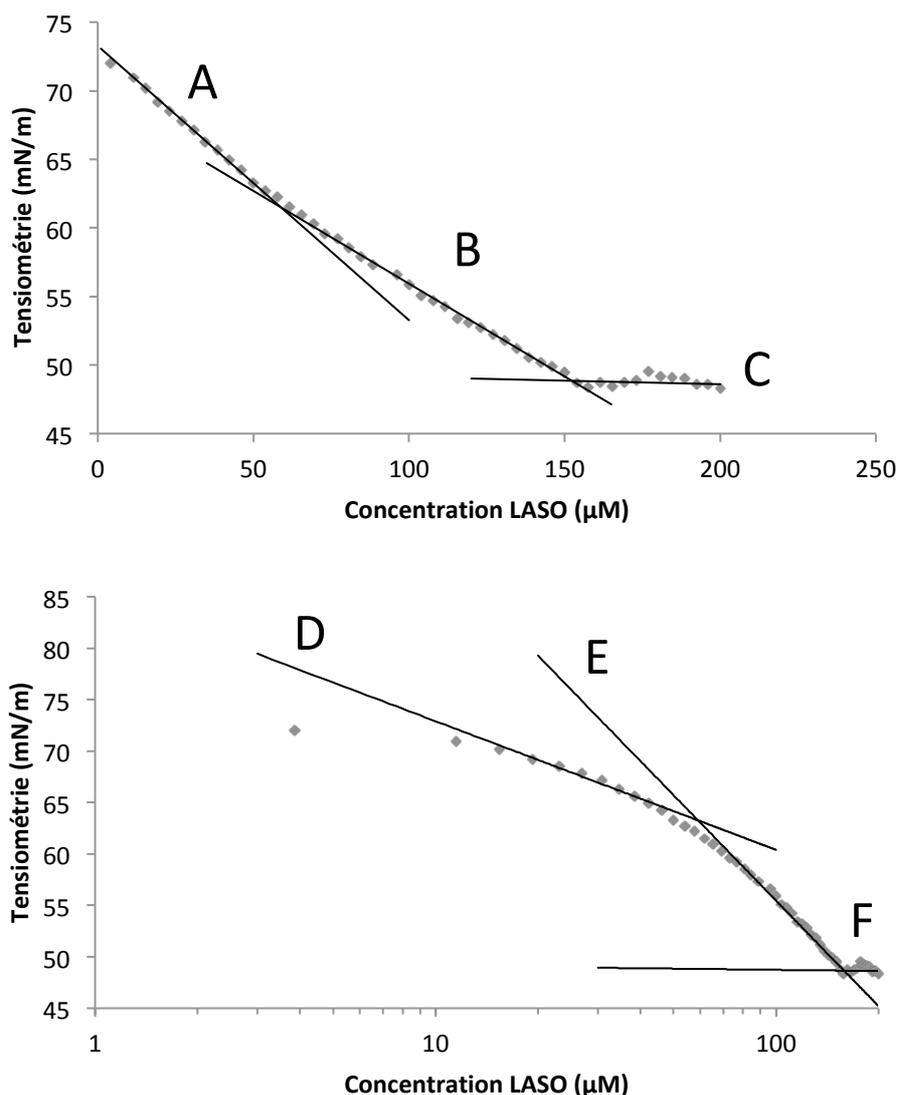


Figure 28 : Variation de la tension de surface des LASO dans l'eau distillée en fonction de leur concentration

Mesure de la tensiométrie par la méthode de Wilhelmy en fonction de la concentration en LASO solubilisé dans l'eau distillée. Après 10 s d'agitation et 30 s de repos, la mesure est effectuée avec une immersion de la lame de 3 mm. Le seuil est de 0,01 mN/m et chaque point représente la moyenne des 50 dernières mesures après stabilisation. Les résultats sont représentés sous un repère cartésien (haut) et sous une échelle semi-logarithmique (bas). Les équations des droites sont : A : $y = -0,2x + 73,27$; B : $y = -0,1353x + 69,463$; C : $y = -0,0052x + 49,642$; D : $y = 87,680x^{-0,080}$; E : $y = 172,747x^{-0,249}$; F : $y = 49,517x^{-0,003}$

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence de deux changements conformationnels d'assemblage supramoléculaire. La première rupture de pente est de l'ordre de 60 µM et la deuxième aux alentours de 150 µM. Cependant, ces molécules s'organisent en assemblage supramoléculaire à une concentration plus faible dans du tampon phosphate (PBS). La Figure 29 détermine l'influence des sels, mimant les concentrations salines physiologiques, sur la CAC.

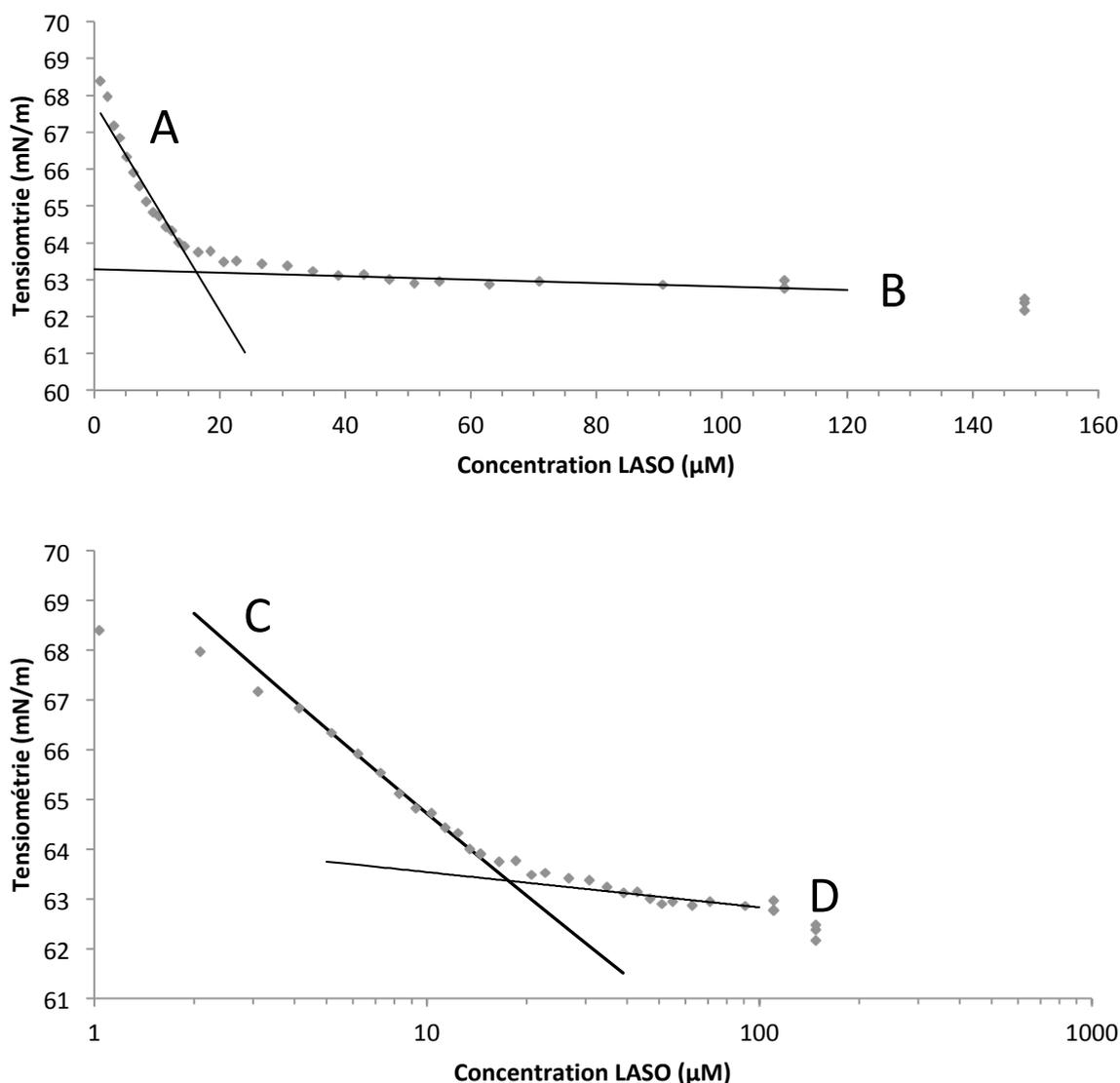


Figure 29 : Variation de la tension de surface des LASO dans le PBS

Mesure de la tensiométrie par la méthode de Wilhelmy en fonction de la concentration en LASO solubilisés dans le PBS. Après 10 s d'agitation et 30 s de repos, la mesure est effectuée avec une immersion de la lame de 3 mm. Le seuil est de 0,01 mN/m et chaque point représente la moyenne des 50 dernières mesures après stabilisation. Les résultats sont représentés sous un repère cartésien (haut) et sous une échelle semi-logarithmique (bas). Les équations de droites sont : A : $y = -0,282x + 67,796$; B : $y = -0,005x + 63,283$; C : $y = 70,541x^{-0,037}$; D : $y = 64,254x^{-0,005}$

Dans du PBS, la rupture de pente la plus visible est déterminée à 16 μM , ce qui est inférieur à la concentration déterminée dans l'eau distillée. Cependant, le deuxième changement n'est pas réellement observable sur ces courbes. La différence entre les valeurs de conductance avant et après la CAC en fonction de la surface est trop faible pour visualiser une autre rupture de pente. Il serait probable que la valeur obtenue à 16 μM soit équivalente à la seconde rupture de pente observée dans l'eau distillée. Cette différence représente également le caractère tensioactif de la molécule dans le PBS.

Ces résultats déterminent une forte dépendance de la formation des assemblages supramoléculaires vis-à-vis de la présence de sels à plus faible concentration.

Une expérience de conductimétrie a par la suite été réalisée pour confirmer ces résultats.

2. Analyse conductimétrique des LASO en milieu aqueux

Comme décrit précédemment, les conjugués nucléolipidiques sont des polyanions amphiphiles susceptibles de former des assemblages supramoléculaires. Avant la CAC, les molécules sont à l'état de monomère et sont soumises au mouvement brownien. Après la CAC, les micelles ou autres assemblages supramoléculaires se déplacent plus lentement dans le milieu car ils possèdent un diamètre hydrodynamique plus important, ce qui modifie la valeur de la conductance en fonction de la surface. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette technique réside dans l'impossibilité de l'utiliser en présence de sels à la concentration physiologique car la proportion d'ions masque le changement de conductance des molécules sous forme d'agrégats. Ainsi, seule l'expérience comportant les LASO dans l'eau distillée est exploitable.

La figure 30 représente l'évolution de la conductimétrie en fonction de la concentration en LASO.

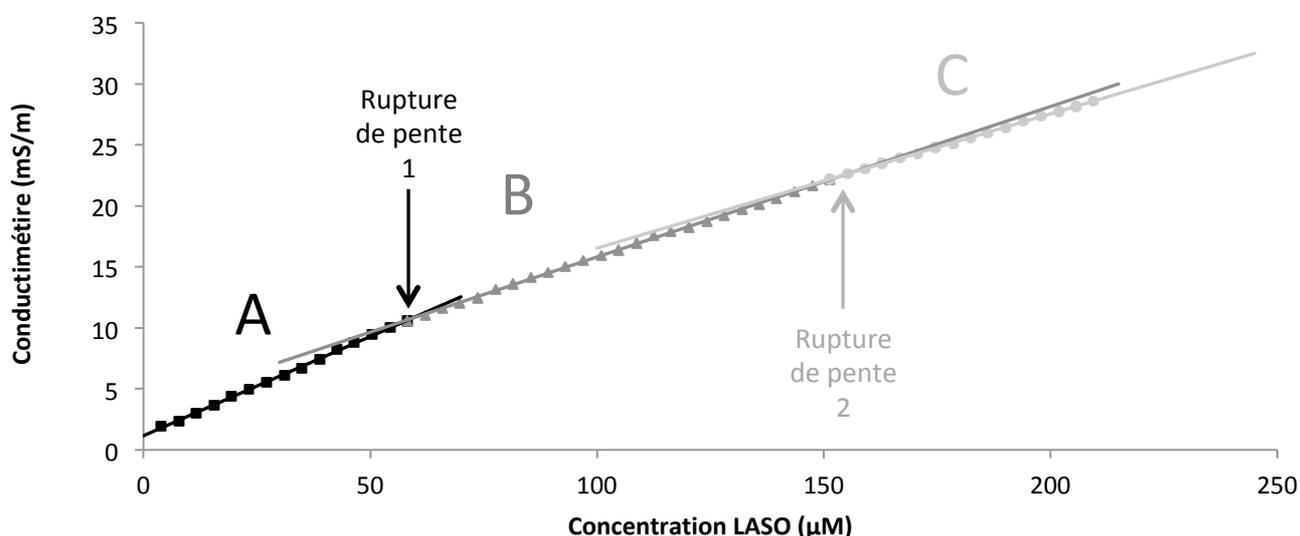


Figure 30 : Conductimétrie du LASO dans l'eau distillée

L'analyse conductimétrique est réalisée par ajout successif d'une solution de LASO concentré à 3,88 mM. La rupture de pente caractérisée au point 15 indique un changement de conformation aux alentours de 58,2 µM. Les équations des droites sont : A : $y = 0,1626x + 1,1622$ ($R^2 = 0,99911$) ; B : $y = 0,1233x + 3,4815$ ($R^2 = 0,99955$) ; C : $y = 0,1101x + 5,5252$ ($R^2 = 0,9997$).

Le test statistique de Chow a montré un point de rupture de pente significatif ($p < 0,001$) pour une concentration expérimentale en LASO de 58,2 µM. Ceci indique une valeur de

CAC bornée par les concentrations 54,3 et 62,1 μM . Les équations de droite de la première partie de la courbe ainsi que celle de la partie après le point à 58,2 μM confirment ce résultat avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,999. La CAC calculée à partir de ces données est de 59,0 μM . Il en est de même avec le deuxième point de rupture de pente ($p < 0,001$), la CAC calculée à partir des équations de droite B et C est de 154,8 μM . Ces résultats sont du même ordre de grandeur que les valeurs de CAC déterminées en tensiométrie de surface mesurées dans l'eau distillée.

E. Analyse de l'assemblage supramoléculaire des LASO

1. Analyse de diffraction dynamique de la lumière (DLS)

Les analyses de tension de surface et de conductimétrie sont des outils permettant de mettre en évidence la formation de nano-objets. Des expériences de diffraction dynamique de la lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering* en anglais) ont été réalisées pour déterminer la taille des objets formés par ces LASO à 30 μM (Figure 31).

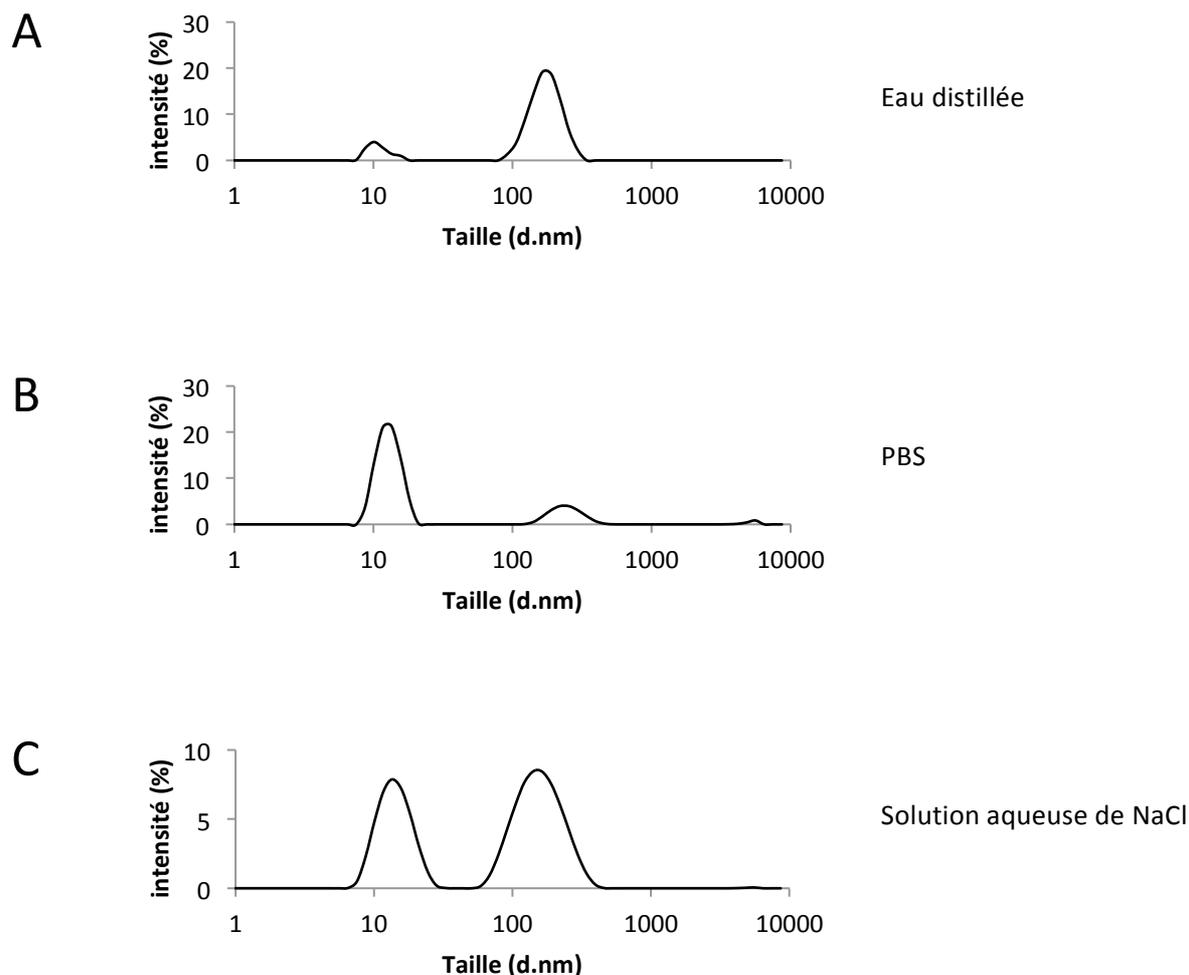


Figure 31 : Caractérisation des nano-objets formés par les LASO à 30 µM en DLS

Caractérisation des assemblages supramoléculaires des LASO par l'intensité lumineuse du signal en DLS. A : Les LASO solubilisés dans l'eau distillée forment deux populations de 11,1 et 176,6 nm avec des proportions de 11,9 % et 88,1 % d'intensité, respectivement. L'indice de polydispersité (PdI) est de 0,482. B : Lorsqu'ils sont solubilisés dans le PBS, les deux populations ont une taille moyenne de 13,8 (86,1 %) et 290,4 nm (13,9 %) avec un PdI de 0,249. C : Les tailles de ces deux populations passent à 14,5 (40,0 %) et 166,0 nm (60,0 %) avec un PdI de 0,640 lorsque les LASO sont solubilisés dans une solution aqueuse de NaCl à concentration physiologique (0,9 % en masse).

Ces résultats confirment que deux populations d'objets supramoléculaires sont formées à partir de ces conjugués LASO. La concentration et la nature des sels ont cependant une influence certaine sur la structuration de ces particules. La solution aqueuse de NaCl à 0,9 % en masse engendre deux populations d'intensité de signal presque similaire, tandis que dans le PBS, la population d'objet à 13,8 nm est prédominante. Cependant, en DLS, le signal en intensité n'est pas proportionnel à la concentration. En effet, les particules de taille supérieure diffractent plus la lumière que les objets de taille inférieure. Ainsi, dans ces deux cas, la population d'objets aux alentours de 14 nm est largement représentée. Cependant, l'analyse de DLS réalisée à 30 µM dans l'eau distillée reste à nuancer car les valeurs de CAC, déterminées par tensiométrie et conductimétrie, sont d'environ 60 µM.

Ceci peut s'expliquer par les valeurs basses de l'interception de la courbe de corrélation avec l'axe des ordonnées du corrélogramme en DLS. Cette donnée renseigne sur le bruit de fond du signal, et donc sur la qualité de la mesure effectuée. Plus l'interception est proche de 1, meilleur est le signal. Pour avoir des données exploitables, le constructeur préconise une valeur minimale de 0,6. Ici, les valeurs sont de 0,825 et 0,906 pour les données dans le PBS et la solution aqueuse de NaCl, et de 0,482 dans l'eau distillée. Afin de se placer dans des conditions plus favorables, une étude de DLS à 150 μM en LASO solubilisés dans l'eau distillée permet de confirmer la formation des objets à une concentration supérieure à la CAC déterminée précédemment (Figure 32). L'interception résultante étant de 0,716, les résultats obtenus sont de meilleure qualité et montrent effectivement une proportion d'objet de diamètre hydrodynamique moyen de 210,9 nm pour 67,9 % d'intensité et 13,3 nm pour 32,1 %.

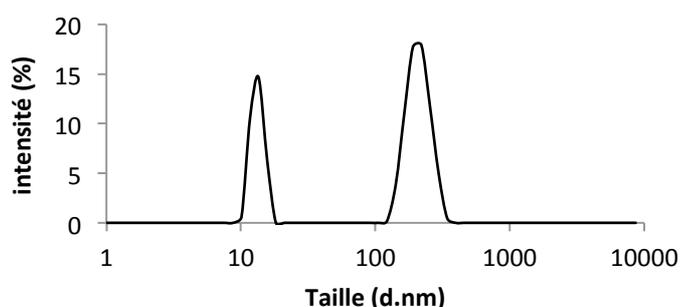


Figure 32 : Courbe de DLS du LASO solubilisé dans l'eau distillée à 150 μM

Deux populations d'assemblage supramoléculaire sont observées après solubilisation du LASO dans l'eau distillée à une concentration supérieure à la CAC déterminée par tensiométrie et conductimétrie. Les particules ont des tailles moyennes de 13,3 nm et 210,9 nm avec une interception à 0,716.

Ce résultat montre une meilleure précision des données après concentration de l'échantillon au-dessus de la CAC. Les ordres de grandeur des assemblages supramoléculaires correspondent aux particules retrouvées lorsque le LASO est solubilisé en présence de sels.

2. Visualisation des objets supramoléculaires en microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique d'observation permettant d'analyser des assemblages supramoléculaires avec une résolution théorique de l'ordre du nanomètre. Elle représente une méthode de choix pour la détermination de la morphologie d'assemblage de taille nanométrique. Cette technique consiste en un dépôt d'échantillon sur une grille qui interagit par la suite avec le faisceau d'électrons.

Les électrons sont alors transmis ou diffusés et collectés sur un écran ou sur un détecteur de type caméra CCD (*Charge Coupled Device*).

Une coloration négative a été réalisée par des sels d'uranyle. Cette méthode est non sélective mais augmente significativement le contraste et améliore la visualisation des objets d'intérêt. La figure 33 montre les clichés de MET observés après séchage d'une solution de LScr et de LASO à 30 μM dans une solution aqueuse de NaCl à 0,9 % en masse.

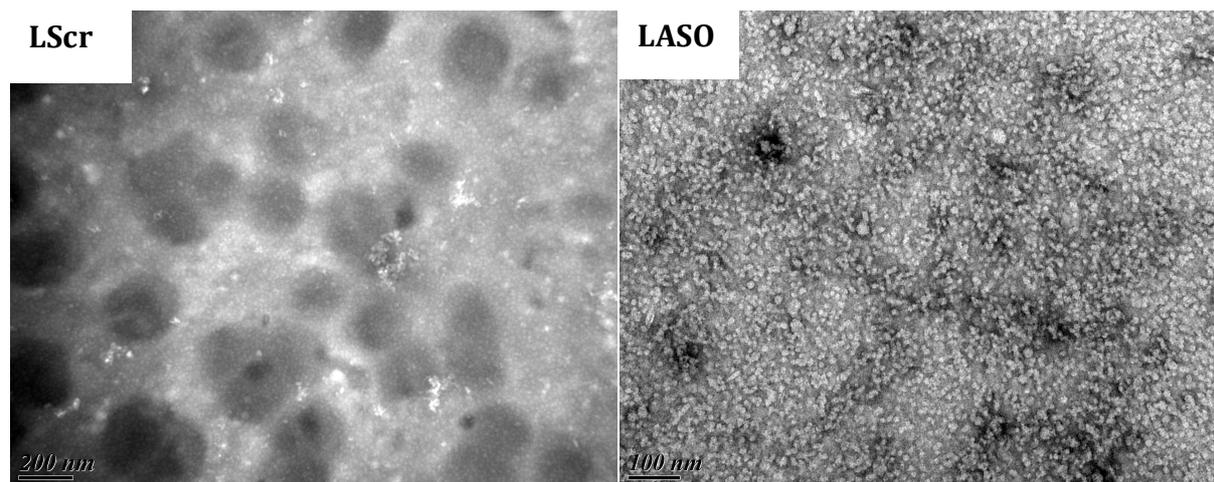


Figure 33 : Images de MET des solutions à 30 μM de LScr (gauche) et de LASO (droite) dans une solution aqueuse de 0,9 % en masse de NaCl

Solution de nucléolipide-oligonucléotides LASO et de contrôle LScr à 30 μM dans une solution aqueuse de 0,9 % en masse de NaCl séchée sur une grille de microscopie, contrastée à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 1 min avant élimination du surplus par capillarité. L'observation est réalisée à un grossissement $\times 80\,000$ pour le LScr et $\times 150\,000$ pour le LASO en mode haute résolution. Les barres d'échelles correspondent à 200 nm (gauche) et 100 nm (droite). Les taches sombres correspondent aux zones de séchage, ou le matériel a été concentré lors du séchage.

Un tapis d'objets sphériques de taille moyenne de 15 nm est visualisable sur la totalité des deux grilles. La nature de la séquence influe peu sur la taille et la morphologie des objets formés. Ces types de structure se retrouvent également dans les solutions de LASO solubilisés dans le PBS et l'eau distillée. L'observation d'objets supramoléculaires à une concentration inférieure à la CAC (30 μM) dans l'eau distillée est certainement due au protocole de préparation des grilles de microscopie. Après avoir déposé l'échantillon liquide, le surplus est absorbé par capillarité avec un papier filtre. Une fine couche de liquide est encore présente sur la grille contenant l'échantillon. Celui-ci est ensuite séché sous sorbonne avant introduction dans la colonne du microscope. Le séchage des quelques microlitres restant entraîne une concentration de l'échantillon. Cette concentration peut être responsable de l'auto-assemblage des LASO avant observation.

Les structures de diamètre supérieur à 150 nm sont également retrouvées à 30 μM dans les trois milieux (PBS, eau distillée et solution aqueuse de NaCl) en très faible proportion. Ces objets sont également observés après une coloration négative à l'acétate d'uranyle (Figure 34).



Figure 34 : Observation en MET d'une particule de LASO d'environ 200 nm après coloration à l'acétate d'uranyle

Solution de nucléolipide-oligonucléotides LASO à 30 μM dans l'eau distillée séchée sur une grille de microscopie, contrastée à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 1 min avant élimination du surplus par capillarité. L'observation est réalisée à un grossissement $\times 200\,000$ en mode haute résolution. La barre d'échelle correspond à 100 nm.

Afin d'être plus sélectif, une coloration au tétra-oxyde de ruthénium est réalisée. Cet agent de contraste est utilisé en MET pour réagir rapidement avec les doubles liaisons des molécules. Les pyrimidines ainsi que les purines réagissent avec le tétra oxyde de ruthénium et entraînent une forte densité aux électrons des assemblages supramoléculaires contenant les fragments d'acides nucléiques contrairement à l'acétate d'uranyle (Figure 35).

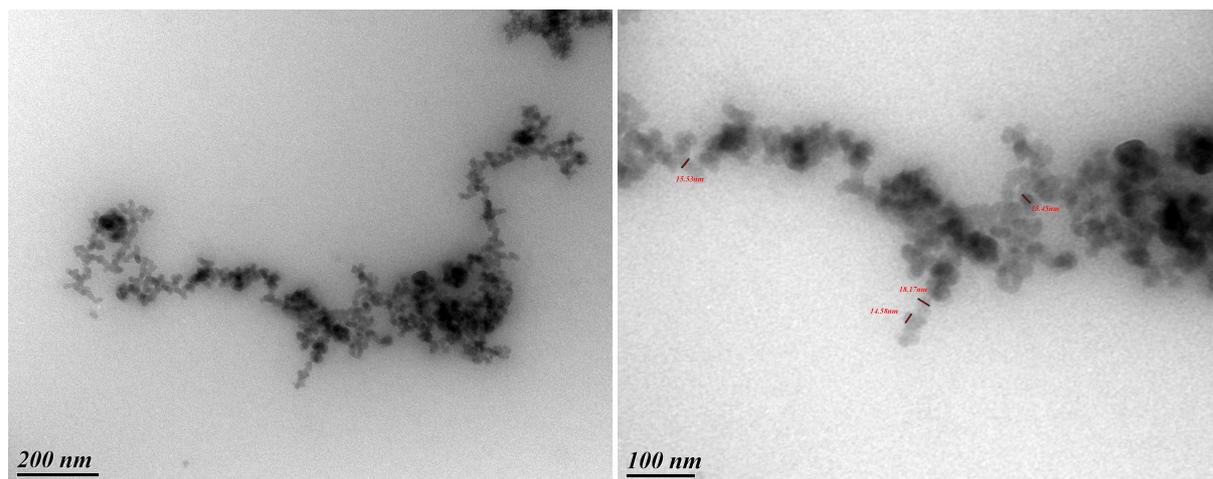


Figure 35 : Images de MET des assemblages supramoléculaires de LASO contrastés au tétra-oxyde de ruthénium

Solution de nucléolipide-oligonucléotides LASO à 30 μM dans l'eau distillée séchée sur une grille de microscopie, contrastée aux vapeurs de tétra oxyde de ruthénium à 0,5 % pendant 5 min. L'observation est réalisée à un grossissement $\times 120\ 000$ (gauche) et $\times 200\ 000$ (droite) en mode haute résolution. Les particules observées ont un diamètre moyen de 15 nm. Les barres d'échelle correspondent à 200 nm pour l'image de gauche et à 100 nm pour celle de droite.

Ces observations confirment la formation d'assemblages supramoléculaires en solution aqueuse et correspondent aux tailles moyennes déterminées en DLS.

En conclusion, ces nouveaux conjugués nucléolipide-oligonucléotides ont été synthétisés sur un système automatisé sur support solide, purifiés par HPLC et caractérisés par spectrométrie de masse. Le caractère amphiphile de ces molécules leur confère des propriétés d'auto-organisation en assemblage supramoléculaire déterminées par des techniques physico-chimiques avec des valeurs de CAC dépendantes de la nature et de la concentration en sels. Ces données déterminent deux seuils de coupures représentant une agrégation des molécules à partir de 60 μM dans l'eau distillée et de l'ordre de 16 μM en présence de sels. Les objets de tailles nanométriques sont évalués en DLS et visualisés en MET par coloration négative à l'acétate d'uranyle et par contraste aux vapeurs de tétra oxyde de ruthénium.

Ainsi, ces nouveaux conjugués se réorganisent en deux populations de particules de taille définie présentant des objets de plus grande taille dont le diamètre est compris entre 160 et 300 nm en fonction du milieu utilisé.

Avant d'étudier les propriétés biologiques des LASO, l'hybridation de la partie oligonucléotide à l'ARN complémentaire est évaluée par spectrophotométrie UV.

F. Influence de la modification nucléolipidique sur l'hybridation de l'oligonucléotide à sa séquence complémentaire

L'hybridation d'un oligonucléotide pour son complémentaire détermine la stabilité et la proportion de duplexe formé à 37°C. Une première série d'expérience a permis de mettre en évidence l'influence de la séquence et de la modification nucléolipidique pour son complémentaire ADN en série PTO. L'augmentation de l'absorption optique de la solution à 260 nm, par un phénomène d'hyperchromicité, en fonction de la température renseigne sur la dénaturation du duplexe ADN/ADN car cette augmentation d'absorbance est proportionnelle à la déshybridation du duplexe. La spectrophotométrie UV permet de suivre ce processus. La figure 36 récapitule les températures de fusion (T_m) mesurées après ajout du complémentaire des oligonucléotides en série ADN PTO.

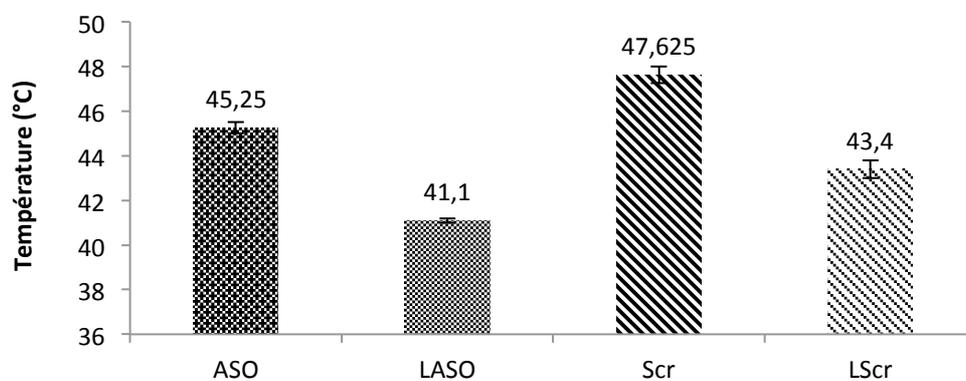


Figure 36 : Influence de la séquence et de la conjugaison nucléolipidique sur l'hybridation de l'oligonucléotide avec son complémentaire en série ADN PTO

PTO : phosphorothioate ; ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

Ces résultats montrent une hybridation plus forte avec le Scr qu'avec l'ASO, comportant 20 nucléotides. La constante d'association pour son complémentaire est plus faible qu'avec le contrôle ne possédant pourtant que 19 nucléotides. Cette différence d'approximativement 2,5 °C s'explique par la composition en base de la séquence. En effet, le pourcentage en guanine et cytosine est plus important dans le cas de l'oligonucléotide contrôle Scr (57,9 % pour le Scr et 45,0 % pour le ASO). Cette molécule possède une plus forte proportion de liaisons hydrogène.

D'autre part, le greffage du nucléolipide diminue de plus de 4 °C la T_m dans les cas des LASO et LScr. La polarité, l'encombrement stérique ainsi que l'assemblage supramoléculaire jouent certainement un rôle dans ce phénomène.

Une série d'expérience, avec la séquence active (ASO), a été réalisée en changeant le complémentaire par un brin d'ARN synthétique de 34 nucléotides, soit 7 bases supplémentaires à chaque extrémité du duplexe (ARN : 5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'). Ces extensions sont choisies par rapport à la cible naturelle biologique, les bases supplémentaires sont celles retrouvées dans la séquence de l'ARNm de la protéine TCTP. De plus, différentes séries de modifications chimiques des LASO et ASO sont réalisées afin d'évaluer l'effet de la nature chimique ainsi que la position de la substitution sur la T_m (Figure 37).

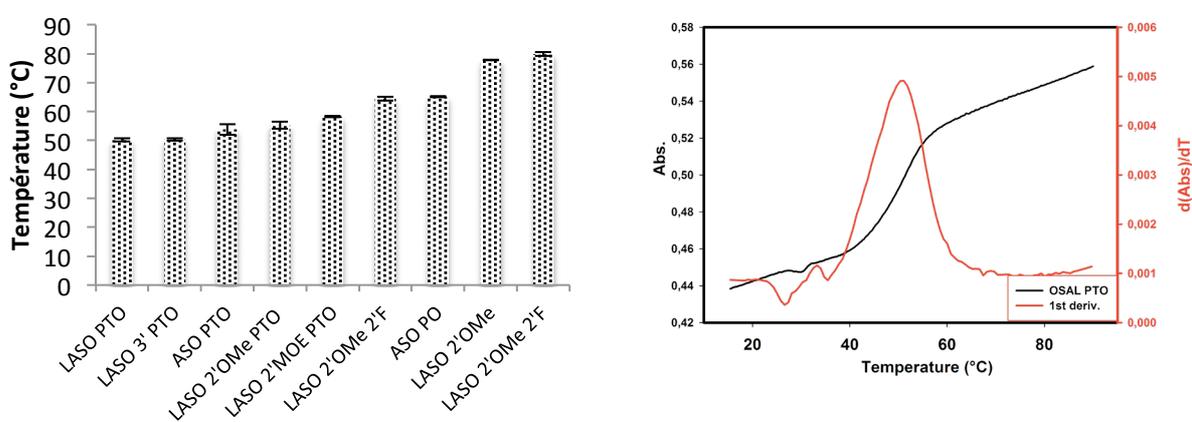


Figure 37 : Influence des modifications chimiques sur la température de fusion des oligonucléotides ASO et LASO (gauche) et exemple d'une cinétique de déshybridation du duplexe LASO 3' / ARN (droite)

La cinétique de déshybridation est suivie par absorbance à 260 nm. L'augmentation de la température est de 0,2 °C/min. Chaque condition représente trois expériences constituées de 2 cycles de montée et descente en température entre 15 et 95 °C.

PTO : phosphorothioate ; 2'-OMe : modification par ajout d'un groupement méthyle en position 2' ; 2'-O-MOE : modification par ajout d'un groupement méthoxyéthyle en position 2' ; 2'-F : modification de l'alcool secondaire en position 2' par un Fluor. ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

Cette expérience confirme l'influence de la présence du nucléolipide sur la T_m d'environ 4 °C (T_m ASO PTO / ARN = 53,8 °C ; T_m LASO PTO / ARN = 50,2 °C), contrairement à la position 5' ou 3' du greffage qui ne démontre aucun effet sur la T_m . La nature de la substitution (séries 2'-OMe, 2'-O-MOE et 2'-OMe/2'-F) augmente significativement la T_m . Enfin, la chimie PO permet une plus forte association pour son complémentaire ARN (T_m ASO PO / ARN = 65,1 °C ; T_m ASO PTO / ARN = 53,8 °C). La comparaison des figures 36 et 37 indique que l'hybridation d'un oligonucléotide en série PTO pour son complémentaire ARN est bien supérieure que pour son complémentaire en série PTO (T_m LASO PTO / ADN PTO = 41,1 °C ; T_m LASO PTO / ARN = 50,2 °C).

En conclusion, ces résultats indiquent que les conjugués nucléolipide-oligonucléotides s'auto-organisent en milieu aqueux et dépendent de la nature et de la concentration en sels. De plus, cette structuration s'oriente vers deux types d'objets de tailles différentes, avec une proportion beaucoup plus élevée pour des particules de taille micellaire à des concentrations physiologiques en sels. Les résultats de l'expérience sur l'hybridation à son complémentaire renseignent sur les capacités du LASO à interagir avec l'ARNm pathologique. La longueur de l'ARN utilisée pour ces manipulations ne permet pas de conclure sur l'hybridation totale du LASO étant donné l'absence de complémentarité du nucléolipide ainsi que l'encombrement stérique de ce même conjugué.

En regard du Chapitre I B, la série PTO est compatible avec les différents mécanismes d'inhibition connus. Les modifications chimiques de type 2'-OMe, 2'-O-MOE et 2'-OMe/2'-F ne permettent pas de faire intervenir la RNase H et pourront être utilisées dans un deuxième temps pour améliorer la stabilité dans un mécanisme bloqueur, ou par synthèse de chimère de type *gapmer*. La série ADN/PTO est alors privilégiée pour cette étude afin de ne pas exclure une potentielle activité inhibitrice.

III. Activités Biologiques

A. Utilisation des conjugués LASO dans le cancer de la prostate résistant à la castration

Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquents dans les pays développés chez l'homme. Lorsque cette pathologie est diagnostiquée au stade métastatique, le traitement de première instance est la suppression androgénique par castration. Cependant, une résistance peut apparaître après plusieurs mois entraînant une reprise évolutive de la pathologie. Le cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) a un pronostic plus sombre avec une survie médiane de seulement quelques mois malgré l'apparition sur le marché de nouveaux traitements de deuxième ligne.

La stratégie antisens est une voie exploratoire récemment développée dans le traitement du CRPC. Elle a pour but d'inhiber la production protéique responsable de cette résistance. La protéine Hsp27 est largement étudiée pour son activité anti-apoptotique. L'équipe du Dr P. Rocchi, au CRCM, a développé un inhibiteur de cette protéine par la stratégie antisens. Cette molécule inhibe de manière efficace la production de Hsp27 et est en phase 2 d'étude clinique aux Etats-Unis et au Canada par la société Oncogenex. Malheureusement, cette protéine est retrouvée dans la plupart des cellules humaines et son inhibition peut entraîner des effets biologiques non négligeables sur l'organisme.

Pour pallier ce problème d'ubiquité de la protéine Hsp27 pour le traitement de CRPC, le laboratoire du Dr P. Rocchi a étudié les différents partenaires protéiques d'Hsp27 et a montré l'implication de la protéine TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) dans le cas du CRPC (Acunzo *et al.*, 2014; Baylot *et al.*, 2012). En effet, cette protéine n'est que peu exprimée dans les tissus prostatiques sains et modérément dans les cellules prostatiques cancéreuses (18,5 %), alors qu'elle l'est fortement et uniformément dans les cellules cancéreuses de CRPC (75 %). Concevoir une séquence inhibitrice spécifique de TCTP est alors une stratégie prometteuse dans le traitement de CRPC.

La collaboration avec l'équipe du Dr P. Rocchi a permis d'étudier l'effet inhibiteur de plusieurs séquences oligonucléotidiques et de sélectionner la séquence anti-TCTP décrite précédemment (ASO : 5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'). Ce projet a permis de démontrer l'efficacité de cette séquence *in vitro* par vectorisation de l'ASO par un agent de transfection commercial qu'est l'oligofectamine™. Cette séquence a alors été utilisée pour

conjuguer le nucléolipide et synthétiser le LASO correspondant. La séquence contrôle Scr ainsi que son conjugué LScr sont utilisés comme contrôles négatifs *in vitro*. La séquence Scr n'étant pas complémentaire du génome humain, le Scr est utilisé comme contrôle négatif de séquence et le LScr comme contrôle de conjugaison. Ce conjugué permet de valider l'absence d'effet biologique dû au nucléolipide conjugué. L'ASO, utilisé sans oligofectamine™, est un contrôle négatif de transfection. Cependant, transfecté par l'oligofectamine™, l'ASO est utilisé comme contrôle positif. Ces quatre oligonucléotides (Scr, LScr, ASO et LASO) ont été couplés à un fluorophore (FITC) à l'extrémité 3' afin de visualiser l'internalisation cellulaire *in vitro*. Le mécanisme a été mis en évidence par inhibition des différentes voies envisageables. L'inhibition de l'expression de la protéine TCTP est visualisée et quantifiée par Western Blot. Le LASO a prouvé son efficacité *in vitro* avec et sans oligofectamine™, comparé aux contrôles. Enfin, l'inhibition de cette cible a été évaluée sur le modèle murin. Il a été montré qu'après 14 semaines de traitement, le LASO inhibe la prolifération tumorale de cellules PC-3 xénogreffées dans le flanc de l'animal après injection des oligonucléotides par voie intra-péritonéale. Ce travail est valorisé par l'article publié en 2017 dans *Journal of Controlled Release* ci-dessous.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel



Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-antisense in castration-resistant prostate cancer



Sara Karaki^{a,b,c,d}, Sebastien Benizri^{e,f,g}, Raquel Mejías^{a,b,c,d}, Virginie Baylot^{a,b,c,d},
Nicolas Branger^{a,b,c,d}, Tan Nguyen^{a,b,c,d}, Brune Vialet^{e,g,g}, Khalid Oumzil^{e,f},
Philippe Barthélémy^{e,f,g}, Palma Rocchi^{a,b,c,d,*}

^a Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM UMR1068, 27 Bd. Leï Roure BP30059, 13273 Marseille, France

^b Institut Paoli-Calmettes, 13273 Marseille, France

^c Aix-Marseille Université, 13284 Marseille, France

^d CNRS UMR7258, 13009 Marseille, France

^e ARNA Laboratory, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

^f INSERM U1212, F-33076, Bordeaux, France

^g UMR CNRS 5320, F-33076, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Antisense oligonucleotides
TCTP
Castration resistant prostate cancer
Lipid modification
Drug delivery

ABSTRACT

Translationally controlled tumor protein (TCTP) has been implicated in a plethora of important cellular processes related to cell growth, cell cycle progression, malignant transformation and inhibition of apoptosis. Therefore, TCTP is now recognized as a potential therapeutic target in several cancers including prostate, breast and lung cancers. We previously showed that TCTP is overexpressed in castration-resistant prostate cancer (CRPC), and it has been implicated in resistance to treatment. Recently, we developed TCTP antisense oligonucleotides (ASOs) to inhibit TCTP expression. However, the intracellular delivery and silencing activity of these oligonucleotides remains a challenge, and depend on the use of transfection agents and delivery systems. Here we show that lipid-modified ASO (LASOs) has improved penetration and efficiency in inhibiting TCTP expression in the absence of additional transfection agents, both *in vitro* and *in vivo*. Transfection with TCTP-LASO led to rapid and prolonged internalization *via* macropinocytosis, TCTP downregulation and significant decreased cell viability. We also show that lipid-modification led to delayed tumor progression in CRPC xenografts models, with no significant toxic effects observed.

1. Introduction

Prostate cancer (PC) is one of the main health concerns in Western countries, representing the most common type of cancer among men in the US, and the third in Europe [1,2]. Although at early stages PC is a hormone-dependent disease, most patients undergoing androgen deprivation therapy, by either pharmacological or surgical castration, progress to castration-resistant prostate cancer (CRPC) within 14–30 months [3]. CRPC presents poor prognosis, and therapeutic options are limited. Chemotherapy with docetaxel has demonstrated improved survival in men with CRPC in two different, large, phase III studies [4,5]. However, the increase in overall survival with docetaxel is very modest (2–3 months), and this treatment may affect not only tumor cells, but also healthy tissue, causing serious side effects [6]. For these reasons, in recent years great efforts have been made to develop new, more selective and efficient therapeutic modalities that enable

specific treatment of cancer cells, and restore castration- and chemotherapy sensitivity without affecting other tissues. One strategy to improve therapies in advanced PC involves targeting genes that are related to androgen deprivation, which may lead to delayed or absent emergence of the resistant phenotype [7].

Recent studies have proposed *tpt1*, encoding for translationally controlled tumor protein (TCTP) as an androgen-regulated gene implicated in PC [7–9], whose expression correlates with PC grading [10]. TCTP, also known as, histamine releasing factor (HFR), fortilin or p23, is a highly conserved multifunctional protein present in a wide variety of eukaryotic organisms. It is involved in many physiological processes, such as cell proliferation, development, cell cycle progression, stabilization of cytoarchitecture, and protein synthesis; and it shows protective effects against apoptosis and cell stress [11,12]. TCTP can also be secreted to the extracellular space, where it works as a mediator of the immune response by promoting histamine release from

* Corresponding author.

E-mail address: palma.rocchi@inserm.fr (P. Rocchi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.042>

Received 9 February 2017; Received in revised form 25 April 2017; Accepted 29 April 2017

Available online 01 May 2017

0168-3659/© 2017 inserm. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

basophils, and stimulating B-cell proliferation, and inducing the production of different cytokines and antibodies [13,14]. Although it has a widespread expression profile, TCTP expression is higher in tumors compared to their normal counterparts [15], which suggests a critical role in tumorigenesis. This observation, along with the fact that TCTP silencing may lead to tumor reversion [16,17], indicates that TCTP knockdown might be a very promising strategy for CRPC treatment.

Antisense oligonucleotides (ASOs) have been proven to be a useful tool in molecular biology and also as therapeutic agents, especially in cancer research. ASOs can be used to perform selective knockouts of mRNA functions either *in vitro* or *in vivo*. Oligonucleotides mediate their functions by base pairing, where the oligo single stranded DNA binds to its complementary strand of mRNA, making them highly specific. However, some practical obstacles remain unsolved in antisense pharmacology. ASOs, as all nucleic acid-based drugs, show insufficient stability as a result of degradation by nucleases, and poor intracellular delivery due to reduced cell uptake or difficulties in crossing biological membranes to reach the cytoplasm. Moreover, in many cases potential off-target effects and immunostimulation are also observed [18]. In order to reduce the limitations of oligonucleotide-based therapies, different chemical modifications have been developed [18–20]. One of the first modifications introduced in antisense therapy was the phosphorothioate (PS) modification, in which a sulfur atom replaces the non-bridging phosphate oxygen. This modification led to improved stability and extended circulation times in blood, although several toxic effects have been related to the use of this type of molecules. Several sugar modifications, such as 2′-O-Methyl (2′-O-Me), 2′-O-Methoxyethyl (2′-O-MOE), 2′-F-Arabinoside Nucleic Acid (2′-F-ANA) have been proved to increase the specificity of ASOs, reducing off-target effects. Locked Nucleic Acid (LNA) modifications, in which there is a methylene bridge between 2′ and 4′ positions ‘locking’ the sugar ring in an A-form conformation have shown increased affinity for complementary sequences. Backbone modifications, such as Morpholino (PMO) or Peptide Nucleic Acid (PNA) provide a neutral backbone and work as ribosome steric blockers, efficiently preventing protein translation. Grafting oligonucleotide to small hydrophobic molecules, such as cholesterol [21], lipids [22] or fluorinated chains [23,24], may increase stability and membrane permeation. However, despite all the advantages provided by these modifications, improved pharmacokinetics and cell uptake remain a challenge.

In this study we present a new lipid-modified ASO (LASO) that helps overcome the problems related to ASO administration and effectiveness, by increasing the cellular uptake and transfection efficiency, and improving downregulation of TCTP expression in absence of transfection agents in human PC-3 prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. We also analyzed the effects of TCTP downregulation on cell viability, and assessed *in vivo* toxicity of ASOs and LASOs, and their effects on tumor size and animal survival in a murine xenograft model of CRPC. Our results indicate that using lipid-modified TCTP ASOs (TCTP-LASO) can be an effective strategy for CRPC treatment.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of antisense oligonucleotides

Oligonucleotides were synthesized using an ABI Expedite 8909 synthesizer (1 μmol scale) and an AKTA OligoPilot 10 synthesizer (50 μmol scale). The oligonucleotide synthesis was achieved using conventional β-cyanoethyl phosphoramidite chemistry with the standard DNA protocol. Reagents were purchased from Link and Glen Research. HPLC purification was performed on a Hitachi LaChrom Elite HPLC System with gradient standard protocol. The HPLC columns (Nucleosil C4 4 × 250 mm 5 μm macherey, nagel) were equilibrated at a flow rate of 1.0 ml/min. A solution containing 100 mM Triethylammonium acetate (TEAA) and 5% acetonitrile at pH 7.0 was

Table 1

Elution gradient of solutions A and B, for purification of antisense oligonucleotides by HPLC.

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	0	100
12	0	100
14	100	0
15	100	0

used as solvent A and solvent B contained 20 mM TEAA and 80% acetonitrile. The elution gradient is reported in Table 1. The system was equilibrated for 5 min before the following run. Injection volume for samples was 25 μl. Oligonucleotides were detected at the wavelength of 260 nm. TCTP-ASO (5′ AACTTGTTCCTGCAGGTGA 3′) and control (5′ CGTGTAGGTACGGCAGATC 3′) were synthesized and purified conventionally. Same oligonucleotides were synthesized with a lipid conjugate (2′,3′-O-16-hentriacontanlylidene-uridine) attached to the 5′ extremity of the oligonucleotide (TCTP-LASO). In the case of labeled oligonucleotides, the fluorescein (3′-(6-FAM)-CPG-1-(4,4′-Dimethoxytrityloxy)-3-[O-(N-carboxy-(di-O-pivaloyl-fluorescein)-3-aminopropyl)]-propyl-2-O-succinoyl-l-aa-CPG; Linktech) was inserted at the 3′ extremity (control-ASO FITC, TCTP-ASO FITC, control-LASO FITC, TCTP-LASO FITC). All oligonucleotides were synthesized in phosphorothioate backbone (PS). All compounds were characterized by mass Spectrometry (Supplementary information) and required the use of a DCTB matrix (trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]-malononitrile) doped with Ag⁺ (or Na⁺), at «Centre de Génomique Fonctionnelle» UMR 5248 CBMN.

2.2. Physicochemical characterization of antisense oligonucleotides

ASOs and LASOs were analyzed by dynamic light scattering (DLS) using a Nanosizer ZS (Malvern Instruments, UK). Samples were denatured at 90 °C for 5 min, and allowed to cool down to 25 °C for nanoassembly. All the scattered photons were collected at a 173°-scattering angle. The scattering intensity data was processed using the instrumental software to obtain the hydrodynamic diameter (Dh) and the size distribution in each sample (400 μl, 25 °C).

2.3. Transmission electron microscopy (TEM)

Size and morphology of the nano-objects were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a Hitachi H7650 microscope. A drop of the nanomicelle suspension was placed on a formvar grid, and the solvent allowed to evaporate at RT. Counterstaining with uranyl acetate was performed twice (1 min/staining).

2.4. Cell culture

The androgen-independent prostatic cancer cell line PC-3 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured in Dulbecco's Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.5. Transfection with ASOs and LASOs

PC-3 cells were plated on p100 culture dishes (10⁶ cells/dish), and transfected twice (24 and 48 h after seeding) with 100 nM ASOs or LASOs. Unless otherwise indicated, transfection with ASOs was performed in free-serum OptiMEM, containing 3 mg/ml oligofectamine (both from Invitrogen), while LASOs were used in free-serum OptiMEM without oligofectamine. After 4-h of incubation, transfection media was replaced with complete culture medium.

2.6. Transfection efficiency analysis

To determine transfection efficiency we used fluorescein-labeled ASOs and LASOs. PC-3 cells were transfected with ASOs or LASOs with and without oligofectamine, and at different time points after transfection, cells were trypsinized and collected in flow cytometry tubes containing 0.5 ml complete culture medium. In each experiment 10^5 cells per condition were assayed in triplicate. Fluorescence intensity was determined in a flow cytometer (Canto Becton Dickinson) and data were analyzed using the FlowJo software.

2.7. Confocal microscopy

Intracellular distribution of ASOs and LASOs and transfection efficiency were also analyzed by confocal microscopy. One day before transfection, PC-3 cells (8×10^4 cells/well) were plated on 8-well Lab-Tek II chamber slides (Nunc-Thermo Scientific). Cells were then transfected with fluorescein-labeled ASOs or LASOs as described, and at different time points after transfection, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4 °C, and mounted in Prolong Gold mounting medium containing the nuclear counterstain DAPI (Life technologies). For visualization, we used a Zeiss LSM 510 META fluorescence microscope with 405-nm and 488-nm excitation filters.

2.8. Cell viability assay

Cell viability was determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay. PC-3 cells were plated in 12-well plates (3×10^4 cells/well) and transfected the day after with ASOs or LASOs as described. After 48 h, MTT was added to each well (1 mg/ml final concentration) and the plates were incubated for 2 h at 37 °C. Supernatants were then removed and formazan crystals were dissolved in DMSO. The absorbance (595 nm) was evaluated using a Sunrise microplate absorbance reader (Tecan). Cell viability was expressed as the percentage of absorbance of transfected cells compared to untreated cells.

2.9. Western blot

PC-3 cells, transfected with ASOs or LASOs 72 h before analysis, were lysed in lysis buffer (1% v/v Triton X-100, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 25 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 μ M ZnCl₂, 1 mM sodium orthovanadate) containing 4% v/v protease inhibitor cocktail (Roche) for 30 min at 4 °C. The lysate was centrifuged (60 min, 21,000 \times g) and protein content was quantified using the BCA protein assay kit (Pierce). 40 μ g of protein from each sample were mixed with Laemmli sample buffer and loaded on 12% SDS-polyacrylamide gels for electrophoresis. Proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore), which were blocked with 5% w/v nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS). For immunodetection, we used rabbit anti-TCTP polyclonal antibody and rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody (both from Abcam) diluted 1:2500 in 0.5% w/v nonfat milk in TBS, and the membranes were incubated overnight at 4 °C. After incubation with a horseradish-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz, 1:5000, 1 h, room temperature), specific protein bands were detected using an enhanced chemiluminescence (ECL) WB substrate (Pierce) and developed on Amersham Hyperfilm ECL films (GE Healthcare).

2.10. Mice

Four-week-old male Swiss nude mice (Nu/Nu; Charles River Laboratories) were maintained in the Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) animal facility. All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by French laws, following the European directives, and with appropriate institu-

tional certification.

2.11. In vivo treatment with ASO and LASO

PC-3 cells (10^7) in 100 μ l complete culture medium were injected subcutaneously in the right flank of mice ($n = 30$). After three weeks, developing tumors were visible and mice were randomly divided into 4 treatment groups: TCTP-ASO ($n = 8$), Control-ASO ($n = 7$), TCTP-LASO ($n = 8$) and Control-LASO ($n = 7$). Additional mice ($n = 5$) were added to each group to evaluate the oligonucleotide's effect on TCTP expression after one week of treatment. Each group received daily intraperitoneal injections of 10 mg/kg of the appropriate oligonucleotide for up to 11 weeks. All mice were routinely observed for signs of systemic toxicity, and body weights were recorded. Tumor size was measured weekly with a caliper in three perpendicular dimensions ($x =$ width, $y =$ length, $z =$ depth). Tumor volume (mm^3) was calculated as $(x \times y \times z)\pi/6$. At the end of the treatment, urine and blood samples were collected for analysis.

2.12. Blood and urine biochemical analysis

Blood samples were maintained at room temperature for 4 h, centrifuged (100 \times g, 30 min) and sera collected. Serum samples were analyzed for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatinine by an independent laboratory (Charles River). Urine samples were analyzed for protein, glucose, pH, leucocytes, nitrites, ketones and blood using Multistix 8 SG strips for urine (Siemens).

2.13. Statistical analysis

Gel bands densities were measured with ImageJ software (NIH). Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism program (GraphPad Software, San Diego, USA). All data are mean \pm SEM. Significance of differences was assessed by a two-tailed Student's *t*-test. * $P \leq 0.05$ was considered significant, with ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

3. Results

3.1. ASO and LASO synthesis

In order to downregulate TCTP expression, we chose the ASO strategy. Initially, 28 ASOs targeting TCTP mRNA were designed by gene walk. Among these, 12 were not tested due to high GC percentage or non-specificity to TCTP. Finally, the efficacy to downregulate TCTP of the other 16 ASOs was analyzed by qRT-PCR, and we chose the most efficient for future experiments (Supplementary Fig. S1). The amphipathic character of the lipid oligonucleotide was brought to the molecule using the di-C₁₅ ketal nucleolipid motif, which provides the hydrophobic driving effect for the self-assembly of the oligonucleotide conjugates [25,26]. No spacer was inserted between the ON head group and the hydrophobic nucleolipid, which is linked to the ON *via* a phosphodiester linkage. The synthesis of the LASOs used in this study was performed using classical phosphoramidite chemistry in the 3'–5' elongation. The hydrophobic nucleolipid phosphoramidite [27] used for the preparation of LON was attached in a head to head (5'–5') fashion when incorporated at the 5' extremity. In order to observe the impact of the ASO and LASO on biological activities, scramble oligonucleotides (Control-ASO and Control-LASO) were synthesized. All the ASOs and LASOs were purified by HPLC and later characterized by MALDI mass spectrometry (Supplementary Figs. S2–S3).

3.2. Physicochemical characterization

As amphiphiles, LASOs self-assemble in aqueous media, whereas

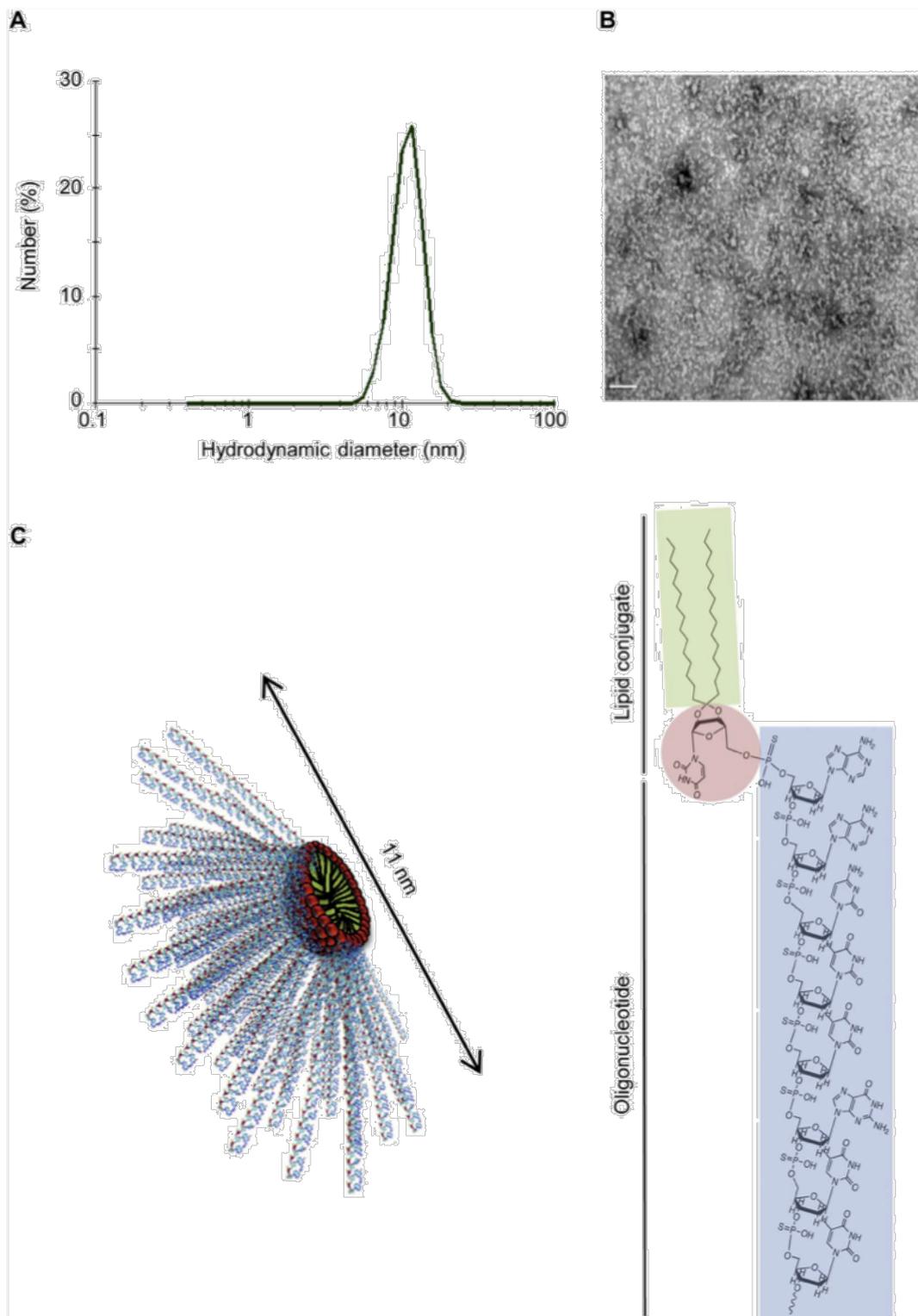


Fig. 1. Physicochemical characterization of LASO nanomicelles. A) Hydrodynamic diameter of the nanomicelles formed by LASO self-assembly, determined by DLS. B) Representative TEM image of LASO nanomicelles. Scale bar: 100 nm. C) Schematic organization of the nanomicelles obtained (left) and chemical structure of nucleolipid-conjugated antisense oligonucleotides used in this study (right).

ASOs don't, as revealed by DLS and TEM experiments. The LASOs yielded small spherical objects of ~11 nm in diameter (Fig. 1A, B). TEM images of LASO samples dissolved in aqueous media (0.9% NaCl) showed micellar aggregates (Fig. 1B). The architecture of these assemblies can be explained based upon the molecular dimensions of 20 nucleobase-long LASOs (Fig. 1C). LASO molecules are flexible, with cone shape structure and dimensions compatible with the self-assembly

into spherical micelles. Nevertheless, the oligonucleotide sequence was found to influence the aggregation behavior of LASO amphiphiles since Control-LASO led to the stabilization of bigger nano-objects featuring diameters higher than 100 nm. The impact of the ON sequences on the aggregation was previously reported for rich purine or pyrimidine sequences [27]. As expected, ζ -potential measurement revealed negative surface charge (~50 mV) of the nanomicelles (data not shown).

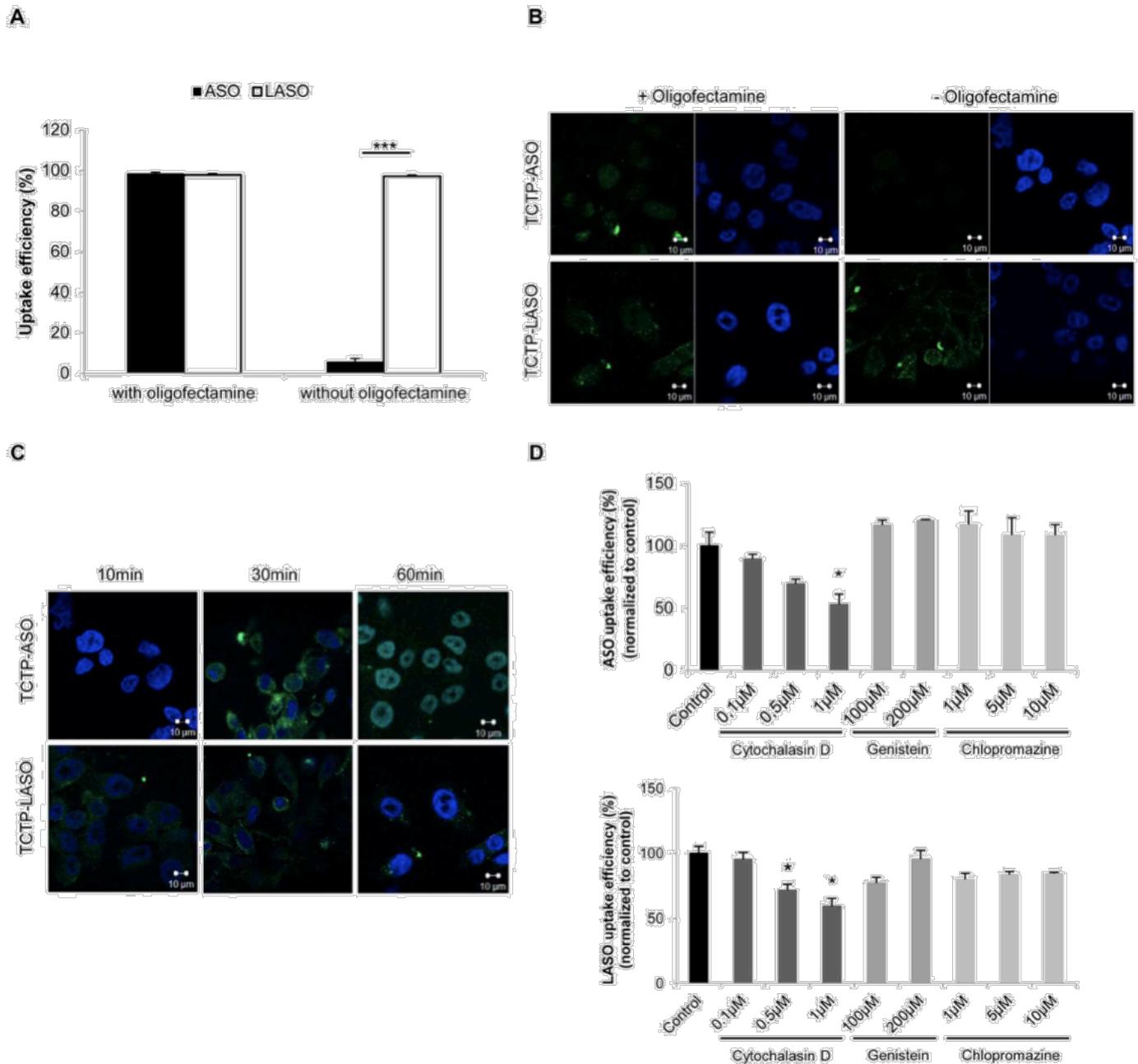


Fig. 2. TCTP antisense uptake by PC-3 cells. A) Flow cytometry was used to quantify the percentage of PC-3 cells transfected with the fluorescent oligonucleotide, 4 h after transfection with and without oligofectamine. Data were normalized to Control-ASO-treated cells, and are shown as mean \pm SEM for triplicate samples from a representative experiment of three performed. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test, ****p* \leq 0.001. B) Representative images of PC-3 transfected with FITC conjugated ASO or LASO, 1 h after transfection with and without oligofectamine, and counterstained with DAPI. C) Representative images of PC-3 cells transfected with FITC-conjugated ASO (with oligofectamine) or LASO (without oligofectamine) for 10, 30 and 60 min, and counterstained with DAPI. D) Flow cytometry was used to quantify the percentage of PC-3 cells transfected with the fluorescent oligonucleotide in the presence of specific inhibitors of macropinocytosis (cytochalasin D), caveolae-mediated endocytosis (genistein), and clathrin-mediated endocytosis (chlorpromazine). Data were normalized to control cells (transfected in the absence of inhibitors) and are shown as mean \pm SEM for triplicate samples from a representative experiment of three performed. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test, **p* \leq 0.05.

3.3. TCTP-LASO penetrates faster than ASO, and both are internalized via macropinocytosis

It has long been believed that oligonucleotides, can't be efficiently used as silencing tools for *in vitro* studies, in the absence of a transfection agent such as oligofectamine. Indeed, for effective protein downregulation, it is essential that the oligonucleotides cross the cell membrane, reach the mRNA and inhibit protein translation. The LASOs described in this work might be able to overcome the need to use transfection agents in PS ASO oligonucleotides.

In order to assess the uptake efficiency of each oligonucleotide, we

transfected PC-3 cells by oligonucleotides conjugated to fluorescein, and flow cytometry analysis was performed to evaluate the mean percentage of fluorescent cells. Data showed that, in presence of oligofectamine, both TCTP-ASO and TCTP-LASO penetrated approximately 100% of PC-3 cells. However, in the absence of transfection agents, < 10% of the cells were transfected with TCTP-ASO, whereas ~98% of PC-3 cells were successfully transfected with TCTP-LASO (Fig. 2A). Furthermore, confocal imaging experiments revealed the presence of TCTP-LASO inside the cell with or without oligofectamine, while TCTP-ASO was not observed inside the cell without oligofectamine (Fig. 2B). These results indicate that TCTP-LASO is able to cross

the cell membrane, without any transfection agent.

To evaluate the kinetics of TCTP-ASO and TCTP-LASO internalization, PC-3 cells were transfected with fluorescent TCTP-ASO (with oligofectamine) or TCTPO-LASO (without oligofectamine) for up to 10, 30 and 60 min. The uptake was then analyzed by confocal fluorescence microscopy. A significant cell staining appeared 10 min after transfection with TCTP-LASO, while intracellular TCTP-ASO was detected at 30 min (Fig. 2C).

Finally, we assessed the intracellular delivery pathway of TCTP-ASO and TCTP-LASO in PC-3 cells. Almost 100% internalization was attained within 30 min (Fig. 2D). Neither the clathrin-mediated endocytosis inhibitor (chlorpromazine) nor the caveolae-mediated endocytosis inhibitor (genistein) were able to influence the cellular uptake of TCTP-ASO or LASO oligonucleotides, whereas the macropinocytosis inhibitor (cytochalasin D) significantly decreased the internalization by 50% for TCTP-ASO, and 40% for TCTP-LASO (Fig. 2D), indicating that macropinocytosis might be involved in the uptake of these compounds.

3.4. TCTP-LASO downregulates TCTP expression and reduces cell viability, without additional transfection reagents

To assess the effect of TCTP-ASO and TCTP-LASO on TCTP expression *in vitro*, we transfected PC-3 cells with different concentrations of ASO and LASO, and Western blot analysis was performed. As shown in Fig. 3, decreased TCTP expression was observed starting at a concentration of 70 nM TCTP-ASO, combined with oligofectamine (Fig. 3A). However, TCTP-ASO produced no effect without oligofectamine

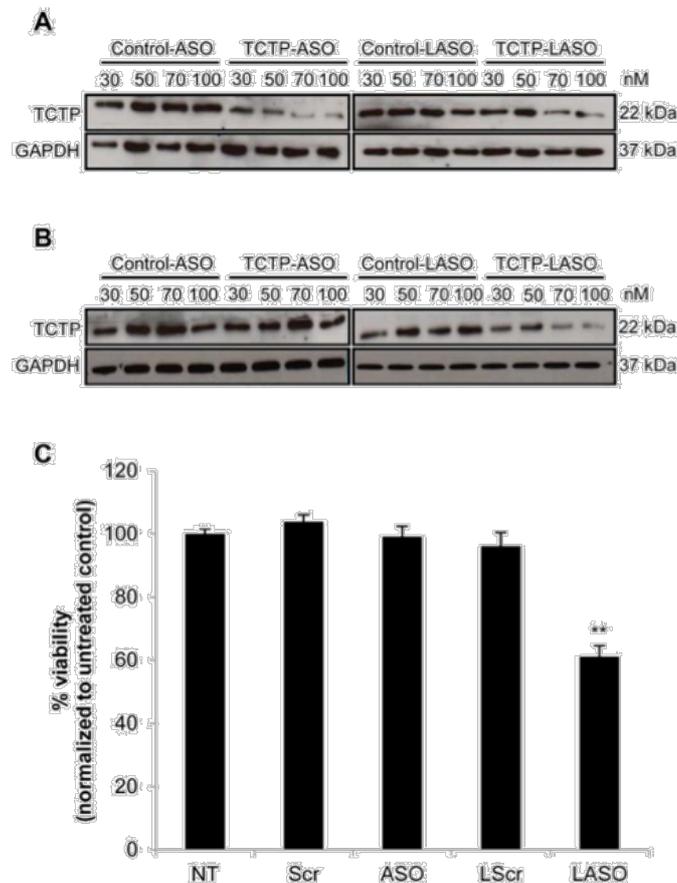
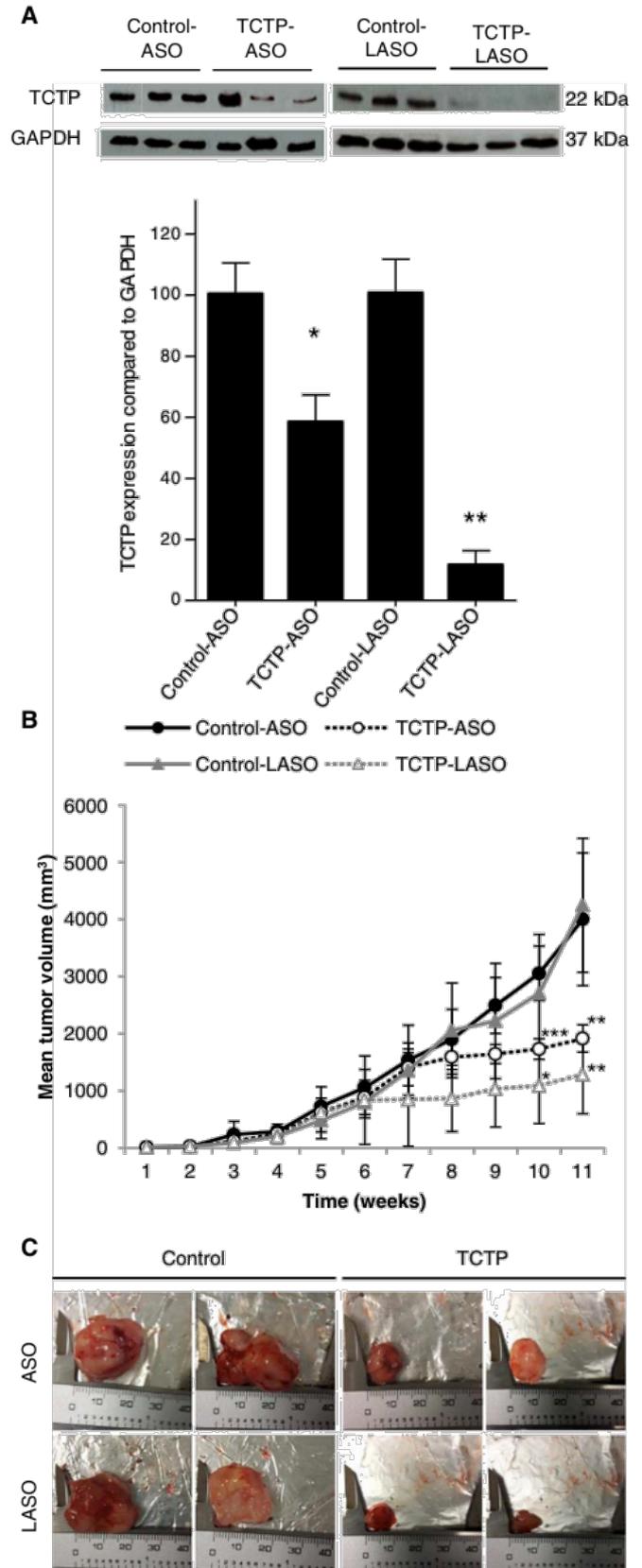


Fig. 3. Western blot analysis of TCTP expression in PC-3 cells treated with the indicated concentrations of Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO, with oligofectamine (A) or without oligofectamine (B). C) MTT viability assay of PC-3 cells untreated or transfected with Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO in the absence of oligofectamine. Data were normalized to untreated cells, and are shown as mean \pm SEM, $n = 3$. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test, $**p < 0.01$.



(caption on next page)

(Fig. 3B). In contrast, TCTP-LASO had an inhibitory effect on TCTP expression with or without oligofectamine starting at 70 nM (Fig. 3A, B). To further investigate the efficiency of TCTP-LASO in the absence of

Fig. 4. Effect of Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO and TCTP-LASO in PC-3 cell xenografts. A) Western blot analysis of TCTP expression in PC-3 xenografts after 7 days of treatment with Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO. Bands were quantified using image J. TCTP expression compared to GAPDH was normalized for TCTP-ASO compared to control-ASO and TCTP-LASO compared to control-LASO. B) Mean tumor volume during treatment with Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO. Data show mean \pm SEM. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test, **p* \leq 0.05, ***p* \leq 0.01, ****p* \leq 0.001. C) Representative images of tumors collected from mice treated with Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO after an 11-week treatment.

transfection agents, compared to TCTP-ASO, a MTT assay was performed (Fig. 3C). A significant decrease of \sim 40% of cell viability was obtained after transfection with TCTP-LASO. However, no effect was observed for Control-ASO, TCTP-ASO and Control-LASO.

3.5. Lipid modification does not reduce the efficiency of the antisense therapy in murine xenograft models of CRPC

To test TCTP-LASO efficiency *in vivo*, we used a murine xenograft model. To induce tumors, PC-3 cells were injected subcutaneously into athymic nude mice. PC-3-tumor-bearing mice were divided into 4 groups and treated by serial intraperitoneal injections of Control-ASO, TCTP-ASO, Control-LASO or TCTP-LASO. In order to determine if TCTP-LASO conserves its ability to downregulate TCTP expression *in vivo*, 5 mice from each group were sacrificed after 1 week of treatment, and their tumors were harvested, protein extracted and TCTP expression analyzed by Western blot. As shown in Fig. 4A, decreased TCTP expression was observed for both TCTP-ASO and TCTP-LASO, compared to their respective controls. Furthermore, TCTP-LASO produced more inhibition of TCTP expression compared to TCTP-ASO. Treatment was maintained for 11 weeks, and tumor volume was measured weekly. Fig. 4B shows that tumors from mice treated with TCTP-ASO or TCTP-LASO were significantly smaller at the end of the treatment. Mean tumor volume was \sim 2-fold higher in controls compared with TCTP-ASO- and TCTP-LASO-treated mice (Fig. 4B). Furthermore, tumors from animals treated with TCTP-LASO were smaller than those harvested from TCTP-ASO-treated mice (Fig. 4C), although no statistical significance was obtained. Taken together, these data suggest that lipid modification of TCTP-ASO does not affect its capacity to downregulate TCTP expression *in vivo*, leading to delayed tumor progression.

3.6. In vivo toxic effects of TCTP-ASO and LASO

One of the main needs for these *in vivo* studies is to test for possible toxic effects resulting from oligonucleotide administration. Mice were routinely observed for signs of systemic toxicity throughout the treatment period (gastrointestinal symptoms, irregular respiration, aggressiveness or immobility); no signs were detected (Table 2).

Mouse body weight was also monitored, showing no obvious changes (Fig. 5A). At the end of the experiment, we tested serum and urine for signs of *in vivo* toxicity. Analysis of serum from TCTP-ASO- or TCTP-LASO-injected mice compared to controls showed no significant differences in creatinine levels (Fig. 5B).

In TCTP-ASO-treated mice we found increased levels of alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), en-

Table 2
Analysis of mice behavior and signs of systemic toxicity during treatment. Symbols: +, normal; \pm , slightly reduced without affecting the ability to obtain food or water.

	Control ASO	TCTP ASO	Control LASO	TCTP LASO
Body weight	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrhea	Neg	Neg	Neg	Neg
Respiration	Normal	Normal	Normal	Normal
Aggressiveness	Neg	Neg	Neg	Neg
Mobility	\pm	+	\pm	+

zymes associated mainly with hepatic damage (Fig. 5C). However, these increases did not compromise mouse survival, and induced no signs of animal distress. Treatment with TCTP-LASO did not induced increased aminotransferase levels, suggesting reduced toxicity compared to TCTP-ASO (Fig. 5C). Biochemical analysis of urine showed normal results for all parameters analyzed (Table 3).

4. Discussion

While it is easy to confer stability to antisense agents by chemical modifications, the improvement of pharmacokinetic parameters, cellular uptake and bioavailability has proven to be much more challenging. As yet, very few oligonucleotides are on the market. In the present study we have tested a novel ASO lipid modification that might help overcome these limitations.

TCTP is abundantly expressed in many cancer types [28,29], including PC [30]. Although the role of TCTP in prostate cancer cells is not well understood, TCTP has been reported to cause resistance to androgen withdrawal and chemotherapy in PC [7,11]. Furthermore, a study showed that somatostatin, a growth inhibitory hormone, downregulates the expression of TCTP in LNCaP cells [31], suggesting that manipulating the expression of TCTP can be a useful strategy to control cell growth. We have previously shown that TCTP is overexpressed in CRPC, and p53 expression and function are lost in this type of cancer. Furthermore, we developed and patented a first generation ASO to target and inhibit TCTP expression. We choose the ASO strategy since ASOs can be used for human therapy by inhibiting specifically target genes, especially those difficult to target with small chemical inhibitors or neutralizing antibodies. We have shown that TCTP-ASO significantly inhibits CRPC progression in pre-clinical models and restores p53 expression and function [7]. In order to improve the delivery and bioavailability of TCTP-ASO, we developed novel ASOs, modified using a lipid conjugate attached to the 5' extremity of the oligonucleotide (Fig. 1). Numerous reports have demonstrated that naked oligonucleotides are internalized poorly by cells [32,33]. To improve cellular uptake and activity, a range of chemical modifications have been developed [18–20,22–24]. Indeed, free uptake of a 16-mer LNA PS gapmer ASO targeting bcl-2 was reported in several cell lines, unlike longer 20-mer PS ASO which is ineffectively internalized by cells [34]. Here we show that the addition of a lipid sequence at the 5' extremity of this type of ASOs enhances its penetration inside the cells, and its efficiency in absence of other transfection agents, since TCTP-LASO uptake was faster compared to TCTP-ASO in PC-3 cells (Fig. 2). Cellular uptake of oligonucleotides is usually achieved by adsorptive endocytosis [35,36]. There are several endocytic pathways that could be involved in ASO penetration inside the cell, such as macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, and caveolae-mediated endocytosis. Our results indicate that TCTP-ASO is internalized *via* macropinocytosis, confirming what has been described in literature. Indeed, Koller et al. show that unmodified oligonucleotides uptake pathway is endosomal, with the functional uptake pathway being clathrin and caveolin-independent in hepatocytes [37]. Furthermore, we show that lipid addition doesn't affect the internalization mode, since TCTP-LASO is also internalized by macropinocytosis (Fig. 2). Some studies conducted on siRNA delivery, show that diverse lipophilic conjugates, specifically cholesterol can mediate siRNA cellular uptake, through a common mechanism, leading to endogenous gene silencing *in vivo* [38,39]. The authors support the hypothesis that LDL and HDL particles mediate uptake of cholesterol-siRNA, by receptor-mediated internalization, in tissues [38]. Concerning siRNA formulated with lipoplexes and lipid nanoparticles, Wittrup et al. show by live-cell imaging that they are both taken up by endocytosis and accumulate in late endosomes and lysosomes. They show that siRNA release occurs from maturing endosomes [39]. Understanding the regulation of this release can improve cytosolic delivery of candidate nucleic acids.

In the present study we show that TCTP-ASO downregulates TCTP

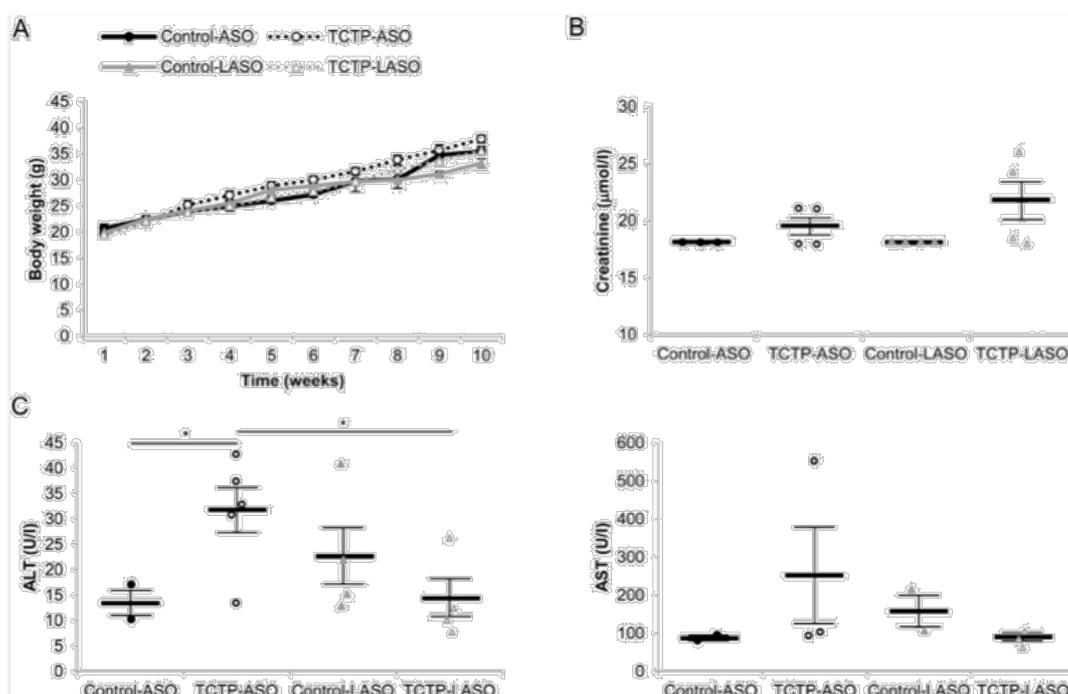


Fig. 5. *In vivo* toxicity of ASOs and LASOs. A) Body weight of Control-ASO-, TCTP-ASO-, Control-LASO- and TCTP-LASO-treated mice was monitored over the duration of the experiment. B, C) Biochemistry of blood samples collected from Control-ASO-, TCTP-ASO-, Control-LASO- and TCTP-LASO-treated mice at the end of the experiment. Serum concentrations of (B) creatinine, and (C) alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were analyzed. Data are shown as mean \pm SEM. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test, **p* \leq 0.05.

Table 3

Urine biochemical analysis results after treatment. Analysis performed using reactive test strips for urine. Symbols: –, negative; Tr, trace; \pm , 10 erythrocytes/ μ l.

	Control ASO	TCTP ASO	Control LASO	TCTP LASO
Leucocytes	–	–/Tr	–/Tr	–
Nitrite	–	–	–	–
Protein	–/Tr	–/Tr	–/Tr	–/Tr
pH	6.0	6.0	6.0	6.0
Blood	\pm	\pm	\pm	\pm
Ketone	–	–	–	–
Glucose	–	–	–	–

expression when transfection is performed in the presence of oligofectamine (Fig. 3). The lipid modification of ASO makes it possible to obtain the same effect without any transfection agent added. We also observed that reduced levels of TCTP correlate with decreased PC-3 cell viability *in vitro*, confirming TCTP major role in cell growth and survival [28,29,40,41]. These results confirm what has been described in previous studies, in which gene silencing of TCTP by siRNA caused growth suppression and apoptosis of PC cells [8].

TCTP-LASO efficiency was confirmed *in vivo*. Serial intraperitoneal injections of both TCTP-ASO and TCTP-LASO lead to delayed tumor progression in a murine xenograft model of CRPC (Fig. 4). TCTP expression was downregulated *in vivo* after 7 days of treatment in both TCTP-ASO and TCTP-LASO groups compared to their respective controls (Fig. 4). These results are consistent with our previous work, in which systemic administration of TCTP-ASO suppressed PC-3 and LNCaP tumor growth *in vivo*, and significantly enhanced docetaxel activity [7].

The high rate of disappointing results of clinical trials using ASOs is mainly due to toxicity. Previous clinical and preclinical studies reported adverse effects of ASOs injury on liver and kidneys, two primary organs of oligonucleotide accumulation, as well as local reactions at the injection site [42–44]. It seems that oligonucleotides as a chemical class are particularly associated with these types of toxicities. Here we

show that, under the experimental conditions used, TCTP-ASO induced an increase in transaminases (Fig. 5). However the levels detected were within the range of normal values for male Swiss nude (Nu/Nu) mice [45], except for AST levels in one TCTP-ASO-treated mouse. In contrast, TCTP-LASO showed no adverse effects, suggesting that the treatment did not cause systemic toxicity to animals.

5. Conclusions

In this study we present a novel lipid modification at the 5' extremity of ASO molecules. This lipid-modified antisense presents improved cell uptake and efficiency in the absence of additional transfection agents. Furthermore, we provided preclinical proof that the treatment with lipid-modified TCTP-ASO delays tumor progression in a murine xenograft model of PC, with reduced toxicity compared to TCTP-ASO.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.042>.

Competing financial interest

J.A., P.B., K.O. and P.R. are inventors on two patents filed by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France), entitled “Hydrophobically modified ASOs comprising a ketal group” (patent application number PCT/IB2013/001517) and “Hydrophobically modified antisense oligonucleotides comprising a triple alkyl chain” (patent application number PCT/EP2014/061762).

Acknowledgments

S.K. receives a doctoral contract from INSERM and AMU, RM holds a post-doctoral contract from the Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT) Sud Est. This work was supported by grants from the agence nationale de la recherche (ANR, ANR-11-EMMA-022-02), INSERM Transfert (RSE14046ASA), SATT (276-UAM2-SDV-11-INSE), ARTP (ARTP2014-01), AFU (AFU2015-NB), Vietnamese Government

Scholarship (844458G), ITMO (BioSysCall#A12171AS) and Amidex (AM14AVHRXX). Transmission electron microscopy experiments were performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of France-BioImaging, a national infrastructure for Biological Imaging.

References

- [1] M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio, T. Rosso, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri, European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias, *Ann. Oncol.* 27 (2016) 725–731.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2016, *CA Cancer J. Clin.* 66 (2016) 7–30.
- [3] A. Fusi, G. Procopio, S. Della Torre, R. Ricotta, G. Bianchini, R. Salvioni, L. Ferrari, A. Martinetti, G. Savelli, S. Villa, E. Bajetta, Treatment options in hormone-refractory metastatic prostate carcinoma, *Tumori* 90 (2004) 535–546.
- [4] D.P. Petrylak, C.M. Tangen, M.H. Hussain, P.N. Lara Jr., J.A. Jones, M.E. Taplin, P.A. Burch, D. Berry, C. Moynour, M. Kohli, M.C. Benson, E.J. Small, D. Raghavan, E.D. Crawford, Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1513–1520.
- [5] I.F. Tannock, R. de Wit, W.R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K.N. Chi, S. Oudard, C. Theodore, N.D. James, I. Turesson, M.A. Rosenthal, M.A. Eisenberger, Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1502–1512.
- [6] R.J. van Soest, E.S. de Morree, L. Shen, I.F. Tannock, M.A. Eisenberger, R. de Wit, Initial biopsy Gleason score as a predictive marker for survival benefit in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel: data from the TAX327 study, *Eur. Urol.* 66 (2014) 330–336.
- [7] V. Baylot, M. Katsogiannou, C. Andrieu, D. Taieb, J. Acunzo, S. Giusiano, L. Fazi, M. Gleave, C. Garrido, P. Rocchi, Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer, *Mol. Ther.* 20 (2012) 2244–2256.
- [8] M. Gnanasekar, S. Thirugnanam, G. Zheng, A. Chen, K. Ramaswamy, Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells, *Int. J. Oncol.* 34 (2009) 1241–1246.
- [9] M. Kaarbo, M.L. Storm, S. Qu, H. Waehre, B. Risberg, H.E. Danielsen, F. Saatcioglu, TCTP is an androgen-regulated gene implicated in prostate cancer, *PLoS One* 8 (2013) e69398.
- [10] B.J. Rocca, A. Ginori, A. Barone, C. Calandra, F. Crivelli, G. De Falco, S. Gazaneo, S. Tripodi, G. Cevenini, M.T. del Vecchio, M.R. Ambrosio, P. Tosi, Translationally controlled tumor protein in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and treatment-related changes, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 985950.
- [11] J. Acunzo, V. Baylot, A. So, P. Rocchi, TCTP as therapeutic target in cancers, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 760–769.
- [12] U.A. Bommer, B.J. Thiele, The translationally controlled tumour protein (TCTP), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 379–385.
- [13] S.M. Macdonald, Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy, *J. Asthma Allergy* 5 (2012) 51–59.
- [14] S.M. Macdonald, T. Rafnar, J. Langdon, L.M. Lichtenstein, Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor, *Science* 269 (1995) 688–690.
- [15] M. Nagano-Ito, S. Ichikawa, Biological effects of mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 204960.
- [16] R. Amson, S. Pece, J.C. Marine, P.P. Di Fiore, A. Telerman, TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming, *Trends Cell Biol.* 23 (2013) 37–46.
- [17] M. Tuynder, G. Fiucci, S. Prieur, A. Lespagnol, A. Geant, S. Beaucourt, D. Duflaut, S. Besse, L. Susini, J. Cavarelli, D. Moras, R. Amson, A. Telerman, Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15364–15369.
- [18] P.M. Moreno, A.P. Pego, Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic, *Front. Chem.* 2 (2014) 87.
- [19] J.K. Watts, D.R. Corey, Silencing disease genes in the laboratory and the clinic, *J. Pathol.* 226 (2012) 365–379.
- [20] J. Winkler, Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications, *Ther. Deliv.* 4 (2013) 791–809.
- [21] W.R. Epa, P. Rong, P.F. Bartlett, E.J. Coulson, G.L. Barrett, Enhanced down-regulation of the p75 nerve growth factor receptor by cholesteryl and bis-cholesteryl antisense oligonucleotides, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8 (1998) 489–498.
- [22] G. Godeau, C. Staedel, P. Barthélémy, Lipid-conjugated oligonucleotides via "click chemistry" efficiently inhibit hepatitis C virus translation, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 4374–4376.
- [23] S. Ellipilli, R. Murthy, K.N. Ganesh, Perfluoroalkylchain conjugation as a new tactic for enhancing cell permeability of peptide nucleic acids (PNAs) via reducing the nanoparticle size, *Chem. Commun.* 52 (2016) 521–524.
- [24] G. Godeau, H. Arnion, C. Brun, C. Staedel, P. Barthélémy, Fluorocarbon oligonucleotide conjugates for nucleic acids delivery, *Med. Chem. Commun.* 1 (2010) 76–78.
- [25] A. Aime, N. Bezsinna, A. Patwa, A. Pokolenko, I. Bestel, P. Barthelemy, Quantum dot lipid oligonucleotide bioconjugates: toward a new anti-microRNA nanoplat-form, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 1345–1355.
- [26] A. Gissot, C. Di Primo, I. Bestel, G. Giannone, H. Chapuis, P. Barthelemy, Sensitive liposomes encoded with oligonucleotide amphiphiles: a biocompatible switch, *Chem. Commun. (Camb.)* (2008) 5550–5552.
- [27] A. Pokolenko, A. Gissot, B. Vialat, K. Bathany, T. Alain, P. Barthélémy, Lipid oligonucleotide conjugates as responsive nanomaterials for drug delivery, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5329–5334.
- [28] F. Li, D. Zhang, K. Fujise, Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47542–47549.
- [29] M. Tuynder, L. Susini, S. Prieur, S. Besse, G. Fiucci, R. Amson, A. Telerman, Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 14976–14981.
- [30] F. Arcuri, S. Papa, A. Carducci, R. Romagnoli, S. Liberatori, M.G. Riparbelli, J.C. Sanchez, P. Tosi, M.T. del Vecchio, Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity, *Prostate* 60 (2004) 130–140.
- [31] Z. Liu, S. Bengtsson, M. Krogh, M. Marquez, S. Nilsson, P. James, A. Aliaya, A.R. Holmberg, Somatostatin effects on the proteome of the LNCaP cell-line, *Int. J. Oncol.* 30 (2007) 1173–1179.
- [32] C.F. Bennett, M.Y. Chiang, H. Chan, J.E. Shoemaker, C.K. Mirabelli, Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides, *Mol. Pharmacol.* 41 (1992) 1023–1033.
- [33] G.D. Gray, S. Basu, E. Wickstrom, Transformed and immortalized cellular uptake of oligodeoxynucleoside phosphorothioates, 3'-alkylamino oligodeoxynucleotides, 2'-O-methyl oligoribonucleotides, oligodeoxynucleoside methylphosphonates, and peptide nucleic acids, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1465–1476.
- [34] C.A. Stein, J.B. Hansen, J. Lai, S. Wu, A. Voskresenskiy, A. Hog, J. Worm, M. Hedtjarn, N. Souleimanian, P. Miller, H.S. Soifer, D. Castanotto, L. Benimetskaya, H. Orum, T. Koch, Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e3.
- [35] S.L. Loke, C.A. Stein, X.H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J.S. Cohen, L.M. Neckers, Characterization of oligonucleotide transport into living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 3474–3478.
- [36] L.A. Yakubov, E.A. Deeva, V.F. Zarytova, E.M. Ivanova, A.S. Rytte, L.V. Yurchenko, V.V. Vlassov, Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 6454–6458.
- [37] E. Koller, T.M. Vincent, A. Chappell, S. De, M. Manoharan, C.F. Bennett, Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 4795–4807.
- [38] C. Wolfrum, S. Shi, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R.K. Pandey, K.G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E.M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Kotliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1149–1157.
- [39] A. Wittrup, A. Ai, X. Liu, P. Hamar, R. Trifonova, K. Charisse, M. Manoharan, T. Kirchhausen, J. Lieberman, Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 870–876.
- [40] T.H. Chan, L. Chen, X.Y. Guan, Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 369384.
- [41] S.H. Chen, P.S. Wu, C.H. Chou, Y.T. Yan, H. Liu, S.Y. Weng, H.F. Yang-Yen, A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 2525–2532.
- [42] P.P. Seth, A. Siwkowski, C.R. Allerson, G. Vasquez, S. Lee, T.P. Prakash, E.V. Wanczewicz, D. Wittchell, E.E. Swayze, Short antisense oligonucleotides with novel 2'-4' conformationally restricted nucleoside analogues show improved potency without increased toxicity in animals, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 10–13.
- [43] R. Stanton, S. Sciabola, C. Salatto, Y. Weng, D. Moshinsky, J. Little, E. Walters, J. Kreeger, D. DiMattia, T. Chen, T. Clark, M. Liu, J. Qian, M. Roy, R. Dullea, Chemical modification study of antisense gapmers, *Nucleic Acid Ther.* 22 (2012) 344–359.
- [44] E.E. Swayze, A.M. Siwkowski, E.V. Wanczewicz, M.T. Migawa, T.K. Wyrzykiewicz, G. Hung, B.P. Monia, C.F. Bennett, Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 687–700.
- [45] Normal Blood Biochemistry Values for Nude Mice. Charles River Laboratories. http://www.criver.com/files/pdfs/rms/nunu/rm_rm_r_nunu_mouse_clinical_pathology_data.aspx (accessed 31.01.17).

Ce travail a mis en évidence l'activité inhibitrice de la séquence ASO sélectionnée, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'auto-vectorisation des oligonucléotides ASO conjugués avec le nucléolipide (LASO). Il est important de noter que la conjugaison de l'oligonucléotide avec le nucléolipide correspondant n'altère pas son activité inhibitrice envers la protéine TCTP. En conclusion, cette étude montre l'avantage d'utiliser les conjugués nucléolipidiques (LASO et LScr) pour la transfection d'oligonucléotides *in vitro* et *in vivo* sans modifier les paramètres physiologiques ni le comportement des animaux.

Cependant, dans cette étude les molécules d'intérêt sont injectées par voie intrapéritonéale et la biodistribution ainsi que la pharmacocinétique de la molécule n'ont pas été évaluées. De plus, le mécanisme d'inhibition du LASO n'a pas pu être élucidé. Cette expérience fait état de preuve de concept et constitue un premier pas dans l'utilisation de cette nouvelle technologie pour une approche thérapeutique des oligonucléotides.

B. Mécanisme d'action du LASO

Le LASO a été étudié en solution avec l'ARN complémentaire synthétique précédemment décrit (Chapitre II F) et la RNase H commerciale. Après 24 h d'incubation à 37°C, l'enzyme est dénaturé par chauffage à 65 °C et l'activité ribonucléase est observée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (Figure 38).

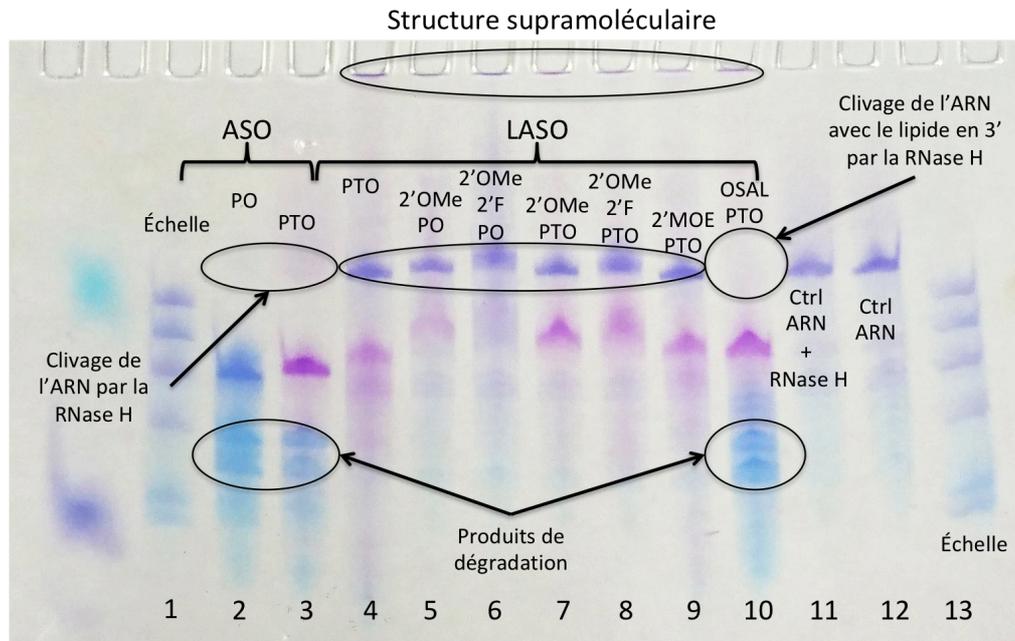


Figure 38 : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante des oligonucléotides inhibiteurs avec l'ARN complémentaire et la RNase H

Les pistes 1 et 13 correspondent à l'échelle moléculaire possédant des marqueurs de taille d'oligonucléotides de 30, 25, 20, 15, 10 et 8 nucléotides. Les pistes 2 et 3 représentent les contrôles positifs sans conjugaison ASO PO et PTO. Les pistes 4 à 10 correspondent à la visualisation des différentes séries conjuguées avec le nucléolipide, la dernière étant le LASO PTO conjugué à l'extrémité 3'. Les 2 dernières pistes (11 et 12) sont les contrôles sans oligonucléotides antisens. ASO : oligonucléotide antisens ; LASO : conjugué nucléolipidique ASO. PO : phosphodiester ; PTO : phosphorothioate ; 2'-OMe : modification par ajout d'un groupement méthyle en position 2' ; 2'-O-MOE : modification par ajout d'un groupement méthoxyéthyle en position 2' ; 2'-F : modification de l'alcool secondaire en position 2' par un Fluor.

Cette expérience permet d'observer le mécanisme de clivage de l'ARN par la RNase H. Les chimies PO et PTO engendrent une reconnaissance du duplexe oligonucléotides ADN/ARN et le clivage de l'ARN par l'enzyme (Pistes 2 et 3). Sur les pistes suivantes, aucune série ne permet le clivage de l'ARN, hormis lorsque la conjugaison du nucléolipide est effectuée à l'extrémité 3'. Ceci peut être expliqué par une reconnaissance du duplexe par l'extrémité 5' de l'oligonucléotide, empêchant donc le clivage lorsque le nucléolipide est conjugué à cette extrémité. Cependant, l'activité inhibitrice du LASO est conservée *in vitro* et *in vivo* comme cela a été démontré précédemment dans le Chapitre III A par le dosage de la protéine TCTP. Une hypothèse serait alors que cet oligonucléotide s'hybride suffisamment à son complémentaire pour

empêcher une traduction par encombrement stérique. De plus, les assemblages supramoléculaires des LASO sont observés pour toutes les conditions comportant des conjugués nucléolipidiques même en conditions dénaturantes.

Cette étude montre que le mécanisme d'inhibition de l'ASO transfecté est différent de celui du LASO comportant la conjugaison à l'extrémité 5'. Cette différence de mécanisme d'action par le greffage d'une molécule à l'extrémité 5' sur des siARN a déjà été observée dans l'étude de Chiu et Rana (Chiu and Rana, 2003). Cependant, afin de conserver la même activité, l'inhibition de l'expression protéique a été évaluée en présence du LASO conjugué à l'extrémité 3' qui présente un mécanisme d'inhibition par la RNase H.

C. Évaluation de l'activité inhibitrice *in vitro* des différents conjugués LASO

L'activité des différentes conjugaisons nucléolipidiques effectuées aux extrémités 5', 3' ou comportant le pont disulfure à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide, est évaluée après incubation en présence de cellules cancéreuses PC-3. Les études de Western blot permettent de visualiser le degré d'inhibition des différents conjugués par comparaison avec la séquence contrôle Scr correspondante (Figure 39).

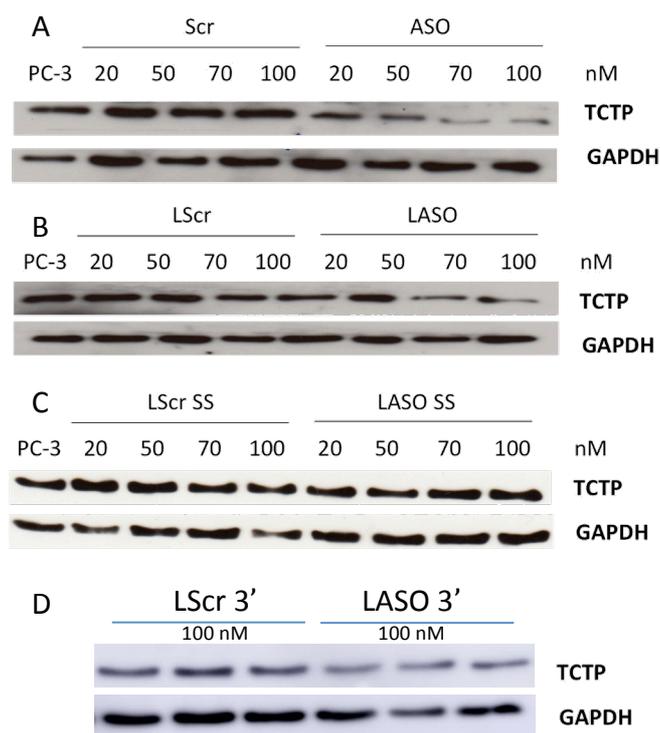


Figure 39 : Western Blot montrant l'effet inhibiteur des différentes conjugaisons LASO

Effet des modifications chimiques sur l'inhibition de la protéine TCTP dans les cellules PC-3. A : Le contrôle positif correspond à l'ASO transfecté par l'oligofectamine™. B : Effet inhibiteur du LASO conjugué à l'extrémité 5' sans oligofectamine™. C : Effet inhibiteur du LASO SS conjugué à l'extrémité 5' par un pont disulfure. D : Effet inhibiteur du LASO conjugué à l'extrémité 3' à 100 nM.

ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle, LScr : conjugué nucléolipidique Scr, LScr SS : séquence contrôle comportant un pont disulfure reliant le nucléolipide à l'extrémité 5', LASO SS : séquence ASO comportant un pont disulfure reliant le nucléolipide à l'extrémité 5', LScr 3' : séquence contrôle conjuguée par le nucléolipide à l'extrémité 3', LASO 3' : séquence ASO conjuguée par le nucléolipide à l'extrémité 3' ; TCTP : Protéine cible ; GAPDH : Protéine de ménage (contrôle).

La figure 39 A correspond au contrôle positif de l'inhibition de la protéine TCTP dans les cellules PC-3 par transfection de l'ASO par l'oligofectamine™. Les expériences montrent tout d'abord que le LASO conjugué à l'extrémité 5' non transfecté par un agent commercial présente une inhibition de la cible non négligeable (Figure 39 B). Cet effet est cependant plus faible qu'avec le contrôle positif ASO transfecté par l'oligofectamine™ mais l'absence d'agent de transfection fait de cette molécule un avantage certain pour

une application thérapeutique. Le conjugué clivable LASO SS ne présente aucune activité inhibitrice (Figure 39 C) et le LASO conjugué à l'extrémité 3' utilise un mécanisme RNase H montré au Chapitre III B mais n'améliore pas l'activité inhibitrice en regard du LASO conjugué à l'extrémité 5' (Figure 39 D).

Les résultats de ces études biologiques confirment la pertinence d'utiliser les conjugaisons nucléolipidiques pour l'inhibition de la protéine TCTP dans le traitement de CRPC. Dans ce travail, il a été montré que le greffage permet une auto-internalisation cellulaire de l'oligonucléotide, tout en conservant son activité inhibitrice. Le mécanisme d'inhibition est cependant différent entre le contrôle ASO transfecté et la conjugaison du nucléolipide à l'extrémité 5'. Lorsque le greffage est réalisé à l'extrémité 3', l'oligonucléotide conserve son mécanisme d'inhibition de la protéine TCTP par la RNase H, tout comme l'ASO transfecté, tandis que lorsque le nucléolipide est conjugué à l'extrémité 5', l'activité inhibitrice est certes conservée mais par un mécanisme ne faisant pas intervenir cet enzyme.

De plus, l'optimisation par pont disulfure s'est avéré être un échec par l'absence de clivage mais également par l'absence d'inhibition de la cible.

L'étude réalisée sur la conjugaison à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide a confirmé son autosuffisance pour l'internalisation par macropinocytose. Les expériences de microscopie à fluorescence montrent cependant une accumulation dans le cytoplasme cellulaire. L'activité inhibitrice est conservée, *in vitro* et *in vivo*, avec une efficacité thérapeutique augmentée par rapport à l'oligonucléotide nu.

IV. Formulation d'agents thérapeutiques

Les NL sont des molécules étudiées au laboratoire pour de nombreuses applications, notamment l'encapsulation et la vectorisation de substances actives ou d'acides nucléiques. L'utilisation de ces bioconjugués nucléolipidiques offre des propriétés d'auto-assemblages efficaces pour la formulation.

Les structures et les propriétés amphiphiles de cette famille de molécule sont intéressantes pour la formulation. Leur organisation en assemblage supramoléculaire permet la formation de zones hydrophobes ainsi qu'une couronne hydrophile dans un milieu aqueux. De plus, la charge de ces molécules peut être anionique, cationique, neutre ou zwitterionique. Dans cette étude, des NL cationique (DOTAU) et anionique (DiC₁₆dT), synthétisés au laboratoire ChemBioPharm, ont été utilisés en tant que vecteur d'encapsulation. En fonction de la substance active à encapsuler, la nature du NL est adaptée afin d'obtenir le meilleur rapport de charge pour l'encapsulation.

A. Formulation d'un nouveau composé dérivé de phénazine

Les phénazines sont des molécules tricycliques constituées d'un noyau pyrazine et de deux cycles benzéniques. Cette famille de composés est régulièrement utilisée comme colorant ou teinture dans l'industrie, par exemple le colorant rouge neutre (Figure 40).

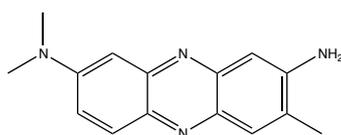


Figure 40 : Structure moléculaire d'une phénazine utilisée comme colorant, le rouge neutre

En 2007, une étude scientifique met en lumière les propriétés anticancéreuses générées par des dérivés de phénazine (Lewis *et al.*, 2007). L'équipe du Dr M. Camplo, du Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille, en collaboration avec le Dr P. Rocchi du CRCM, s'intéresse à la synthèse et aux propriétés de dérivés de phénazine comme agent anticancéreux. Le 2,3-Dialkoxyphénazine a montré des effets antiprolifératifs sur le cancer du pancréas avec des effets similaires à l'anticancéreux de référence, le gemcitabine. L'avantage réside dans la dose administrée *in vivo* dix fois inférieure au gemcitabine pour obtenir la même inhibition (Moris *et al.*, 2015).

Un autre dérivé, appelé Ph 14 et synthétisé par l'équipe du Dr M. Camplo, a récemment montré des propriétés anticancéreuses dans le cancer de la prostate. Cette nouvelle molécule (Figure 41), portant des chaînes apolaires, est insoluble dans l'eau. Ce composé est solubilisé en présence de DMSO pour son étude dans le cancer de la prostate. Ce solvant est bien entendu non compatible avec le vivant, limitant donc une activité thérapeutique.

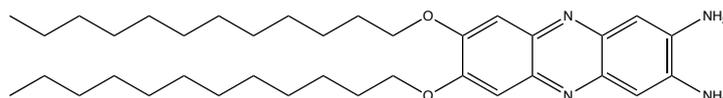


Figure 41 : Structure moléculaire du dérivé phénazine (Ph 14)

L'article publié dans *Oncotarget* (Ziouziou *et al.*, 2017) démontre le mécanisme d'inhibition de ce composé dans le cas du traitement de CRPC. Cette molécule inhibe spécifiquement l'interaction entre la protéine Hsp27 et le facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF4E (pour *eukaryotic translation Initiation Factor 4E en anglais*). Le dérivé de phénazine, appelé Ph 14, entraîne une inhibition de la prolifération des cellules indépendantes aux androgènes *in vitro* et *in vivo*. De plus, elle restaure la sensibilité au docétaxel des cellules résistantes au traitement. Cette étude montre l'intérêt de Ph 14 pour restaurer les hormono- ou chimio-thérapies dans le traitement de cancers ne présentant aucune autres alternatives thérapeutiques (Ziouziou *et al.*, 2017).

L'encapsulation de Ph 14 par des vecteurs a été étudiée afin d'améliorer sa solubilité dans une phase aqueuse et sa biodisponibilité. Les études en cours ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser les NL dans ce sens pour augmenter la biodisponibilité de Ph 14 et d'augmenter l'effet inhibiteur d'interaction entre Hsp27 et eIF4E (thèse de doctorat H. Ziouziou, 2017).

De plus, l'utilisation du LASO anti-TCTP, présentant un nucléolipide couplé à la séquence d'oligonucléotides inhibitrice de la protéine TCTP (Chapitre III C), comme agent de formulation a été étudiée. Les chaînes hydrophobes de Ph 14 peuvent interagir avec le NL conjugué au LASO afin de générer des effets hydrophobes et donc de protéger la substance active. Cette encapsulation est réalisée par réhydratation d'un film de Ph 14 avec une solution de LASO dans l'eau distillée.

1. Caractérisation des complexes LASO / Ph 14

Les objets formés sont caractérisés en DLS et présentent une taille moyenne monodisperse de 195 nm après formulation (Figure 42).

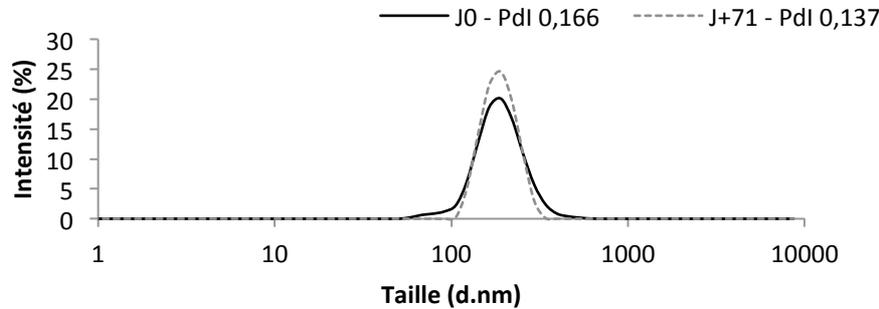


Figure 42 : Mesure du diamètre hydrodynamique de la formulation LASO / Ph 14

Diamètre hydrodynamique moyen de la formulation fraîche (J0) et après 71 jours à 4°C (J+71) mesuré en DLS par rapport à l'intensité de signal.

La méthode de formulation par réhydratation d'un film hydrophobe de Ph 14 est efficace pour ce composé. La taille des objets formulés est monodisperse. La réhydratation est effectuée avec une solution de LASO solubilisés dans l'eau distillée. Les objets de taille micellaire formés à partir d'une solution de LASO précédemment décrite dans le Chapitre II E ne sont pas retrouvés dans cette formulation, ce qui laisse penser que toutes les molécules de LASO sont impliquées dans la formulation LASO / Ph 14.

Le potentiel zêta de ces complexes est mesuré à -60,3 mV. Les oligonucléotides étant des molécules polyanioniques (20 charges négatives par molécule de LASO), cette valeur peut être expliquée par la présence des parties oligonucléotidiques en surface (Figure 43).

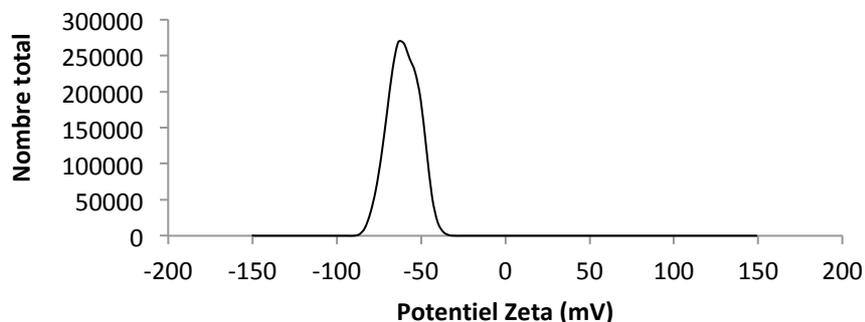


Figure 43 : Mesure de la charge globale de surface des particules de Ph 14 formulées avec le LASO

Cette charge globale négative entraîne une forte répulsion électrostatiques des objets entre eux et de ce fait, empêche une agglomération des particules. La stabilité à 4° C est évaluée pendant plus de 70 jours avec une variation de la taille de 2,5 % et de polydispersité de 17,5 % en faveur de la monodispersité égale à 0,137 (Figure 44). Les interceptions de la courbe de corrélation avec l'axe des ordonnées du corrélogramme sont de 0,933 à J0 et de 0,945 à J+71 ce qui indique une plus grande précision des mesures lors de cette mesure de stabilité colloïdale.

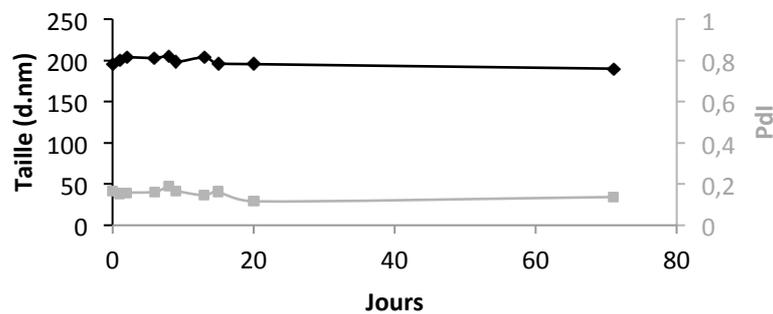


Figure 44 : Stabilité colloïdale de la formulation LASO / Ph 14 conservée à 4 °C

Les diamètres hydrodynamiques mesurés sont représentés en noir, les Pdl en gris.

Ces objets ont été visualisés en MET après coloration négative à l'acétate d'uranyle. Les tailles observées sont du même ordre de grandeur qu'en DLS puisque des tailles prédominantes d'environ 150 nm ont pu être évaluées (Figure 45).

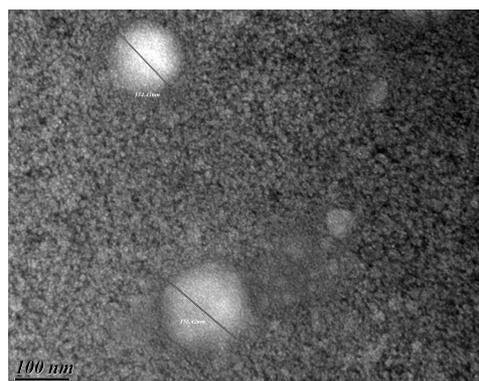


Figure 45 : Observation microscopique à un grossissement x 200.000 des formulations LASO / Ph 14

La barre d'échelle correspond à 100 nm.

Ces formulations sont dosées par absorbance et ont montré un taux de chargement de 15 % en masse avec des concentrations de Ph 14 de l'ordre de 400 μ M ce qui améliore considérablement la solubilité de cette nouvelle molécule anticancéreuse, jusqu'alors insoluble dans l'eau. De plus, l'agent de formulation, ici le LASO, est une molécule active

à part entière ce qui pourrait permettre une double activité pour le traitement de CRPC. Cependant, la taille de ces objets est dix fois supérieure à celle de ceux formés uniquement avec le LASO (150 nm contre 15 nm). Les mécanismes d'internalisation et de vectorisation de ces nouveaux objets peuvent donc être différents. Afin de tester cette hypothèse, une étude biologique a été réalisée avec l'équipe du Dr P. Rocchi au CRCM sur l'activité de ces complexes LASO / Ph 14.

2. Activité *in vitro* des complexes LASO / Ph 14

La cytotoxicité de ces nano-objets a été comparée aux résultats obtenus sur la viabilité cellulaire des cellules PC-3 *in vitro*. Une étude de dose réponse a été réalisée en comparant Ph 14 solubilisé dans le DMSO, le DMSO seul ainsi que la formulation LASO / Ph 14 (Figure 46).

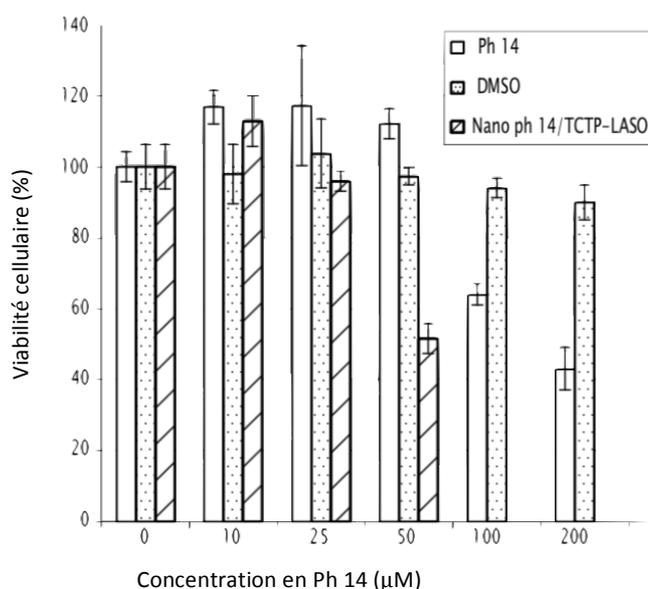


Figure 46 : Dose réponse de Ph 14 non encapsulé (Ph 14), du DMSO (DMSO) et des nanoparticules LASO / Ph 14 (Nano ph 14/ TCTP-LASO) sur une culture de cellules PC-3

Ces résultats démontrent une plus grande toxicité cellulaire en présence des composés formulés qu'en présence de Ph 14 seul. Les cellules ne sont pas affectées par Ph 14 seul à 50 µM, tandis que la formulation LASO / Ph 14 présente une toxicité de 50 %. Ceci peut s'expliquer par un effet synergique du LASO avec Ph 14 pour la toxicité cellulaire cancéreuse. Une expérience préliminaire a comparé les effets de Ph 14, des complexes LASO / Ph 14 ainsi que les deux composés (LASO et Ph 14) injectés simultanément sans avoir été formulés. Ces trois conditions sont réalisées à 50 µM en Ph 14 et à 32 µM en

LASO pour mimer la formulation. Ph 14 encapsulé montre une toxicité cellulaire plus importante que les autres conditions. Une hypothèse serait que Ph 14 non encapsulé n'est pas soumis à l'internalisation cellulaire et donc ne peut pas exercer son action thérapeutique sur l'interaction des protéines Hsp27 / eIF4E.

Cette étude montre l'intérêt d'utiliser les molécules d'oligonucléotides amphiphiles pour l'internalisation d'agents thérapeutiques. Il est possible de générer des objets de tailles nanométriques par effets hydrophobes entre une molécule apolaire et les oligonucléotides conjugués aux NL (LASO). L'utilisation d'une séquence active dans la pathologie entraîne un double effet thérapeutique par inhibition de la cible ainsi que par effet thérapeutique de l'anticancéreux, ici l'inhibition de l'interaction protéique Hsp27 / eIF4E. En perspective, une formulation LScr / Ph 14 sera réalisée afin de vérifier que le changement d'activité de la formulation LASO / Ph 14, comparé aux deux molécules seules, est due à l'internalisation de Ph 14. Cette nouvelle formulation pourrait confirmer l'utilisation de conjugués nucléolipide-oligonucléotides en tant qu'agent de formulation. De plus, une nouvelle formulation à plus grande échelle est en cours de synthèse afin de tester ce système sur le modèle murin.

Une autre étude a été réalisée afin de complexer cette même molécule LASO avec un anticancéreux cationique. En effet, l'utilisation d'une molécule polyanionique qui s'auto-assemble pourrait générer une agrégation par appariement de charges avec une molécule cationique. Ce travail a été réalisé comme preuve de concept avec une anthracycline régulièrement utilisée dans le traitement des carcinomes mammaires, la doxorubicine.

B. Formulation de la doxorubicine par les LASO

La doxorubicine est une molécule utilisée en chimiothérapie dans le traitement des carcinomes du sein, des os mais également dans les leucémies, les cancers du poumon, de la vessie, de l'ovaire ou encore de l'estomac. Cette molécule est un intercalant de l'ADN, qui agit également sur des enzymes (topoisomérases de type II) impliquées dans le maintien de la structure tridimensionnelle de l'ADN lors des phénomènes de transcription et de réplication. La structure moléculaire de la doxorubicine (Figure 47) présente un groupe amine primaire chargé positivement en position C_{3'} en condition légèrement acide (Priebe and Perez-Soler, 1993). La formulation implique donc des interactions électrostatiques entre cette amine et les charges négatives des phosphates de l'oligonucléotide.

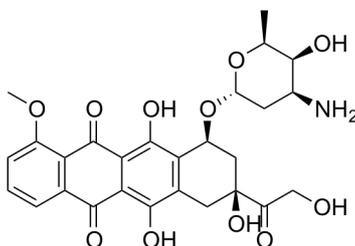


Figure 47 : Structure moléculaire de la doxorubicine

La technique de formulation utilisée de type SNALP (pour *Stable Nucleic Acid-Lipid Particles* en anglais) est réalisée par ajout simultané de doxorubicine dissoute dans le méthanol et de LASO solubilisés dans une phase aqueuse. Cette complexation est caractérisée par DLS et présente un diamètre hydrodynamique moyen de 131 nm avec une charge de surface de -48,6 mV. L'observation en MET est en accord avec les objets caractérisés en DLS (Figure 48).

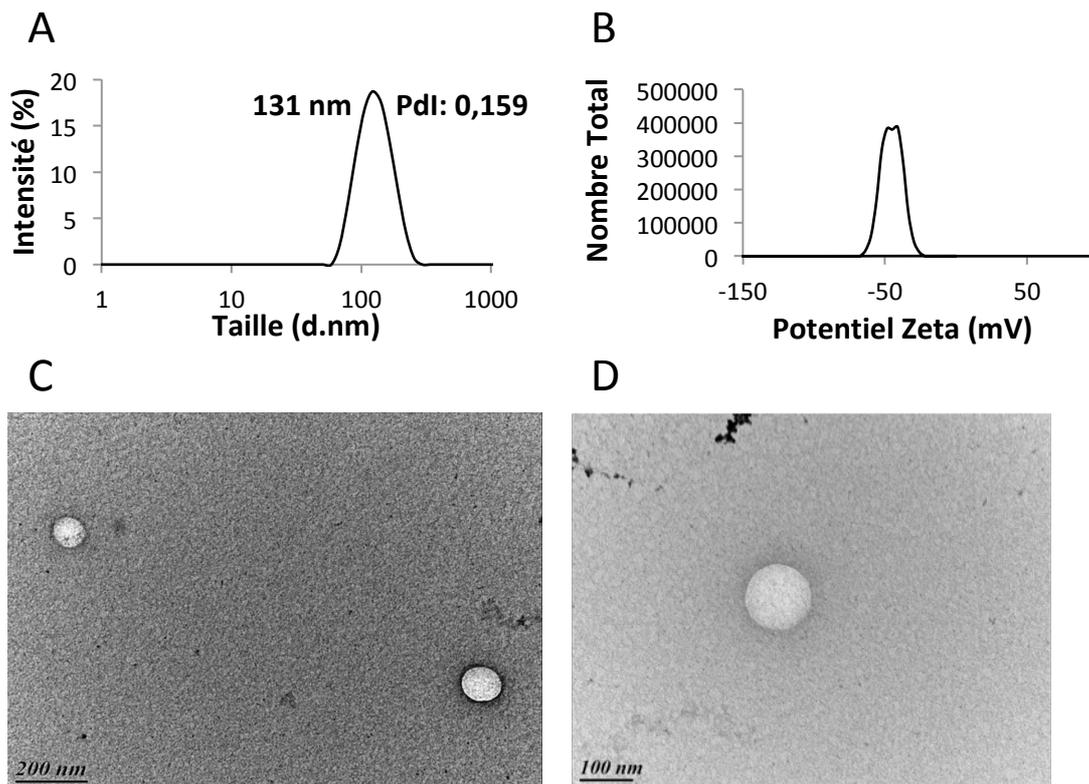


Figure 48 : Caractérisation des nano-objets de LASO / Doxorubicine formulés par SNALP

A : DLS de la formulation LASO / Doxorubicine, le diamètre hydrodynamique moyen est de 131 nm avec une monodispersité de 0,159. B : La charge de surface moyenne est mesurée à -48,3 mV. C et D : L'observation en MET expose des objets sphériques de taille correspondante à celle déterminée en DLS. Les barres d'échelles correspondent à 200 nm pour la figure C et 100 nm pour la figure D.

Cette formulation est en cours d'évaluation biologique mais montre la possibilité de former des nanoparticules de doxorubicine dans un assemblage supramoléculaire de LASO. Il en résulte des nano-objets permettant un double effet thérapeutique potentiel pour l'inhibition d'une cible d'intérêt en modulant la séquence oligonucléotidique ainsi que l'utilisation de la doxorubicine en chimiothérapie.

Cette preuve de concept indique qu'il est possible d'encapsuler aussi bien les composés hydrophobes que les molécules cationiques. Ceci ouvre un panel de possibilités important pour la vectorisation de molécules non seulement pour la thérapie anticancéreuse mais également pour d'autres applications comme les agents d'imagerie ou le théranostique.

Un autre anticancéreux peu soluble dans les milieux aqueux a été étudié par cette approche dans le but, comme précédemment, d'augmenter sa solubilité et sa biodisponibilité.

C. Formulation de sorafénib par des nucléolipides

Le sorafénib est un médicament anticancéreux commercialisé par Bayer sous le nom de Nexavar®. Il est utilisé en France pour le traitement des carcinomes hépatocellulaires mais aussi pour le cancer du rein métastatique. C'est un inhibiteur de tyrosine kinase ayant un double mécanisme d'action en inhibant la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogénèse. Plusieurs protéines sont impactées par cette substance active tel que les récepteurs VEGF, les protéines C-Raf et B-Raf, mais aussi les récepteurs de facteur plaquettaire PDGFβ. La toxicité de cette molécule étant importante, ce médicament n'est utilisé qu'après échec d'un traitement préalable à base d'interféron alfa ou d'interleukine 2. Ce médicament n'est pas prescrit en première intention. Le caractère hydrophobe de cette molécule (Figure 49) entraîne une solubilité dans les milieux aqueux de l'ordre du mg/L. Cette limitation génère une posologie très élevée entraînant de ce fait une toxicité accrue. La prescription usuelle est alors de 4 comprimés de 200 mg par jour en *per os*.

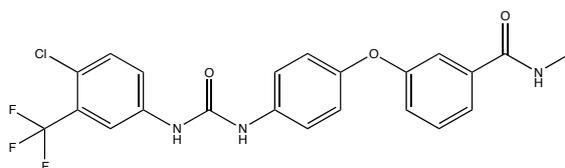


Figure 49 : Structure moléculaire du sorafénib, substance active du Nexavar®

Cette étude a porté sur l'encapsulation du sorafénib par des molécules amphiphiles de type NL afin d'améliorer la solubilité de ce médicament dans les liquides biologiques. Cette approche est développée à la suite d'une publication de Khiati *et al.* (Khiati *et al.*, 2011) permettant l'encapsulation d'anticancéreux (cisplatine) mais également à la suite de la formation de nanoparticules de nucléolipides et de PGI₂, un lipide de la famille des eicosanoïdes. Cette dernière formulation, nommée SLN (pour *Solid Lipid Nanoparticles* en anglais), a montré les capacités d'encapsulation des nucléolipides pour un agent d'imagerie (ici des nanoparticules d'oxydes de fer) ainsi qu'une substance active. Ces complexes ont été utilisés à des fins théranostiques en inhibant l'agrégation plaquettaire pour le traitement de l'athérosclérose tout en étant suivi par Imagerie par Résonance Magnétique. Le pouvoir magnétique de ces objets a donné un signal 2,6 fois plus intense que le Féridex®, un agent de contraste utilisé en clinique. L'activité thérapeutique est quant à elle efficace entre 25 et 50 ng/mL de PGI₂ (Oumzil *et al.*, 2016).

Ces résultats encourageants ont orienté nos recherches sur l'amélioration de la solubilité du sorafénib par des SLN de même nature, à partir des NL DOTAU et DiC₁₆dT. Cette étude est développée dans l'article publié en 2018 dans *Nanoscale Research Letter* ci-dessous.

NANO EXPRESS

Open Access



Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery

Sebastien Benizri^{1,2,3}, Ludivine Ferey^{1,2,3}, Bruno Alies^{1,2,3}, Naila Mebarek^{1,2,3}, Gaelle Vacher^{1,2,3}, Ananda Appavoo^{1,2}, Cathy Staedel^{1,2,3}, Karen Gaudin^{1,2,3} and Philippe Barthélémy^{1,2,3,4*} 

Abstract

Although the application of sorafenib, a small inhibitor of tyrosine protein kinases, to cancer treatments remains a worldwide option in chemotherapy, novel strategies are needed to address the low water solubility ($< 5 \mu\text{M}$), toxicity, and side effects issues of this drug. In this context, the use of nanocarriers is currently investigated in order to overcome these drawbacks. In this contribution, we report a new type of sorafenib-based nanoparticles stabilized by hybrid nucleoside-lipids. The solid lipid nanoparticles (SLNs) showed negative or positive zeta potential values depending on the nucleoside-lipid charge. Transmission electron microscopy of sorafenib-loaded SLNs revealed parallelepiped nanoparticles of about 200 nm. Biological studies achieved on four different cell lines, including liver and breast cancers, revealed enhanced anticancer activities of Sorafenib-based SLNs compared to the free drug. Importantly, contrast phase microscopy images recorded after incubation of cancer cells in the presence of SLNs at high concentration in sorafenib ($> 80 \mu\text{M}$) revealed a total cancer cell death in all cases. These results highlight the potential of nucleoside-lipid-based SLNs as drug delivery systems.

Keywords: Sorafenib, Solid lipid nanoparticles, Nucleolipids, Hepatocarcinoma, Breast carcinoma, Luminal B

Background

Sorafenib commercialized under the name of Nexavar[™] is a hydrophobic drug kinase inhibitor [1] approved for the treatment of different human cancers, including advanced renal cell carcinoma (RCC) [2], hepatocellular carcinoma (HCC) [3], and advanced thyroid carcinoma. Sorafenib has multiple known protein kinase targets, including transmembrane receptors and intracellular tyrosine and serine-threonine kinases, and has also been shown to induce apoptosis. In terms of mechanism of action, sorafenib is reported to inhibit tumor growth via multi targets, acting directly on the tumor and/or on tumor angiogenesis (through inhibition of VEGFR and PDGFR signaling) [4, 5]. Its efficacy in inhibiting malignant cells growth has been demonstrated in many histological cancer types such as melanoma [6], thyroid [7], pancreatic [5], hepatocellular carcinoma, and leukemia [8], for example. However, the low water solubility, the toxicity, and side effects limit the use of sorafenib in many clinical

applications. To address these issues, several sorafenib formulations are currently under investigation [9, 10], including liquid crystalline nanoparticles [11], nanoemulsion [12], cyclodextrin-modified porous silicon nanoparticles [13], drug-eluting nanocomposites [14], polyelectrolyte-based nanoparticles [15], or curcumin self-assembled nanoparticles [16]. However, lipid nanoparticles (LNs) loaded with sorafenib have been poorly investigated [17, 18].

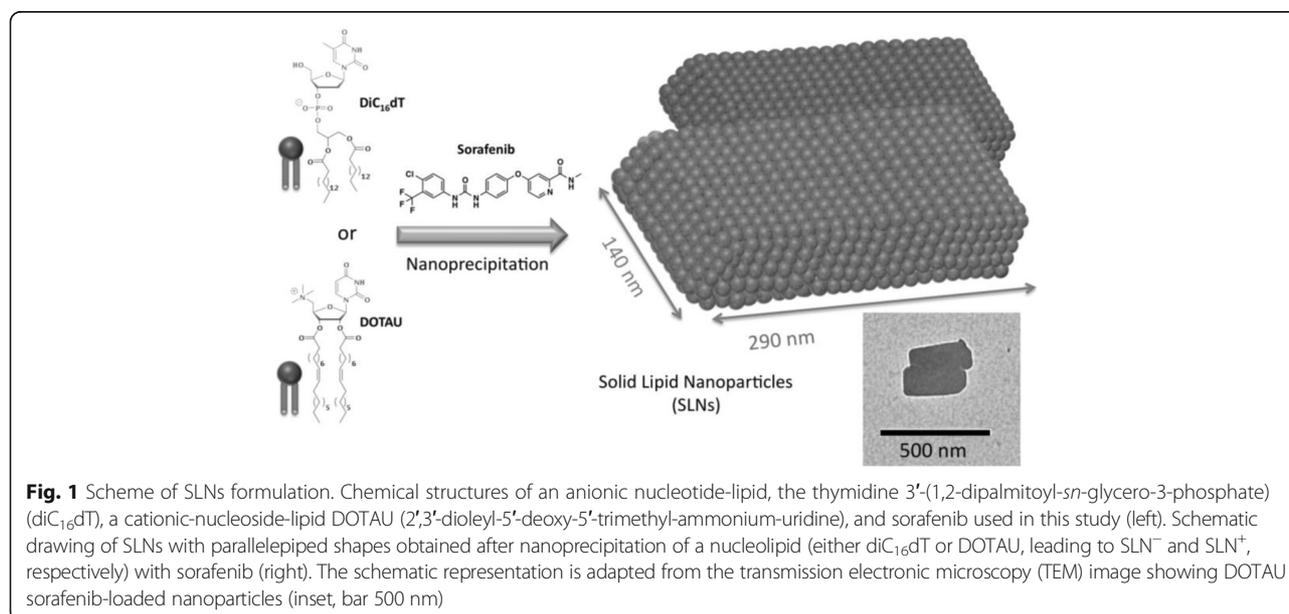
Herein, we report the first example of sorafenib-based solid lipid nanoparticles (SLNs) [19] stabilized by nucleoside-lipids [20–22]. Chromatographic studies achieved on positively and negatively charged nucleolipids (DOTAU and diC₁₆dT, respectively) indicate that these amphiphiles possess the requested stability and purity for their use within the frame of drug delivery applications [23, 24]. A simple nanoprecipitation procedure allows the formation of SLNs featuring either positive (SLN⁺) or negative charges (SLN⁻) (Fig. 1). It is worth noting that all the investigated SLNs enhanced the cytotoxic effect of sorafenib on different human carcinoma, demonstrating that SLNs can overcome the limitations of sorafenib in terms of aqueous solubility and anticancer activities.

* Correspondence: philippe.barthelemy@inserm.fr

¹University of Bordeaux, ARNA laboratory, F-33000 Bordeaux, France

²INSERM, U1212, ARNA laboratory, F-33000 Bordeaux, France

Full list of author information is available at the end of the article



Methods

Chemicals and Reagents

Methanol (MeOH), formic acid (FA), and ammonium formate (AFNH₄) were purchased from VWR Chemicals (France) and were all HPLC (high-performance liquid chromatography) grade. HPLC grade water (minimum resistivity of 18.2 MΩ) was produced in-house by ELGA Millipore system (France). DOTAU (CAS Number: 868226-06-6) and diC₁₆dT (CAS Number: 1160002-70-9) were synthesized in the lab according to the protocol reported in References [23–25]. Sorafenib, 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-*N*-methyl-pyridine-2-carboxamide (CAS number: 284461-73-0) was purchased from SynVec <http://synvec.fr> (Ref# D114250414).

Chromatography Studies

A reversed-phase UHPLC (ultra high-performance liquid chromatography) method was developed for nucleolipid (DOTAU and diC₁₆dT) and sorafenib quantitation in SLNs. Before injection in HPLC, aqueous solutions of nanoparticles were diluted with ethanol by factors 5 and 10, to quantify nucleolipids and Sorafenib, respectively.

A chromatographic system UHPLC UltiMate 3000 from Dionex-Thermo Scientific (USA), composed of a pump with a quaternary valve system for column selection, a thermostated auto-sampler, and a thermostated column compartment, was used. The separation was carried out with the column Synchronis C18 50 × 2.1 mm, 1.7 μm. The mobile phase consisted of 70/30 MeOH/25 mM ammonium acetate (pH = 7.4) (A) and 26.5 mM ammonium acetate in MeOH (pH = 7.9) (B). A flow rate of 0.2 mL/min was used, and the gradient profile was 0–2 min, 0–100% B;

2–20 min, 100% B. The column temperature was set at 25 °C. The detection was performed at 267 nm for sorafenib and diC₁₆dT and 257 nm for DOTAU. The injected volume was 1 μL leading to quantitation limits of 0.6 ng for sorafenib and 15 ng for both nucleolipids and DOTAU and diC₁₆dT.

Standard curves for sorafenib, DOTAU, and diC₁₆dT in ethanol are shown in Additional file 1: Figures S11, S12, and S13, respectively.

Preparation of Sorafenib Nanoparticles

Ten milligrams of sorafenib was dissolved in 1 mL of ethanol, and 10 mg of NLs (either diC₁₆dT or DOTAU) was solubilized in 1 mL of ethanol. One hundred microliters of NLs, 100 μL of sorafenib solutions, and 800 μL of ethanol were mixed together at room temperature and added dropwise into 10 mL of distilled water under magnetic stirring. The solution was placed in ultrasonic bath for 90 min at 25 °C. Ethanol was removed under vacuum at 30 °C, and the volume was adjusted at 1 mL. This solution was sonicated twice by using an ultrasonic probe of 6 mm (Vibracell 75186) for 10 min at 100% of amplitude with pulse of 2 sec every 5 sec. One milliliter was dialyzed against 30 mL of distilled water for 3 × 15 min. This volume is adjusted at 2 mL and conserved for characterization quantification and stability studies. Also, control experiments were realized with the same protocol in the absence of nucleolipids.

Transmission Electronic Microscopy (TEM and EDX)

Nanoparticles were visualized by negative staining microscopy. Ten microliters of nanoparticles was transferred to a carbon-coated copper grid for 10 min. The sample was

then dried and stained with 2.5% (*w/w*) of uranyl acetate in water for 2 min. The specimens were observed with a Hitachi H 7650 electron microscope. Energy-dispersive X-ray spectroscopy was performed using a TECNAI transmission electron microscope coupled with Quantax-X-Flash SVE 6.

Particle Size and Zeta Determination

Particle zeta and size were determined using a Zetasizer NanoZS, Malvern. Experiments were realized with 40 μL of the nanoparticles diluted in 400 μL of water, and measurements were performed at 25 °C.

Cytotoxicity Analysis

HuH7 and HepG2 were grown in monolayer in DMEM-Glutamax supplemented with 10% fetal calf serum. MDA-MB-134 and T-47D were grown in monolayer in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (for T-47D only, nonessential AA 1X, glucose 0.45%, insulin 10 mg L⁻¹, and sodium pyruvate 1X). All culture reagents were from Invitrogen. 10⁴ cells/well in 90 μL of complete culture medium were plated in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, before adding 10 μL of either SLN or sorafenib in the culture medium. Sorafenib (CAS number: 284461-73-0) was dissolved in culture medium with 0.1% DMSO. Note that in these conditions, the maximum concentration of sorafenib without precipitation was 5 μM , whereas for SLNs loaded with Sorafenib, the maximum concentration tested was 120 μM without DMSO. After 4 days of incubation, cell viability was assessed with the formazan-based proliferation assay (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit, Promega), by adding 20 μL /well of reagent solution. After a 30-min incubation at 37 °C, 5% CO₂, the absorbance of each well was measured at a wavelength of 492 nm using a Berthold spectrophotometer. Results are expressed as the percentage of $\frac{\text{OD}_{492} \text{ of treated cells} - \text{OD}_{492} \text{ of blank}}{\text{OD}_{492} \text{ of untreated cells} - \text{OD}_{492} \text{ of blank}}$.

Cell Viability Studies

HuH7 were grown as previously described in the "Cytotoxicity Analysis" section. The cell viability was performed after 4 days of incubation with SLN⁺ loaded with sorafenib at different concentrations (0, 1, 5, 10, 25, 50, and 100 μM) using live/dead cell viability assay (Invitrogen). Briefly, the culture medium was removed, and adherent cells were washed once with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Two hundred microliters of HBSS containing 2 μM calcein acetoxymethyl ester and 4 μM ethidium homodimer-1 was added to each well and incubated for 45 min at 37 °C and 5% CO₂. After staining, the cells were washed once with HBSS and microscopically imaged on an inverted fluorescence microscope. The percentage of dead cells was assessed by fluorescence-activated cell sorting

(FACS) analysis. After staining with 4 μM of ethidium homodimer-1 solution, cells were treated with trypsin and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation at 1000 rpm for 5 min. Data were acquired on LSRFortessa flow cytometer from Becton Dickinson, and the results were analyzed using DIVA software. A sample of dead cells was prepared using 70% methanol and used as a control.

Results and Discussion

Synthesis and Characterization of SLNs

The non-toxicity and the self-assembly properties of the nucleolipids render them ideal amphiphilic adjuvants for encapsulating hydrophobic drugs such as sorafenib. In this study, a simple nanoprecipitation procedure was developed to address the low water solubility properties of sorafenib and enhance its anticancer activity, which limits in many cases its clinical use. Regarding the water solubility, we hypothesized that the hydrophobic character, the heterocycles, and hydrogen bonding functions of sorafenib would favor the interactions with nucleolipids and the formation of nanoobjects. Also, it was expected that SLNs loaded with sorafenib should increase the antitumor activities by enhancing the cellular uptake of sorafenib. Indeed, in one of our previous study achieved on cisplatin nanoparticles, we demonstrated that the enhancement of antitumor activities of cisplatin was due to an increased amount of drug internalized into cancer cells [23] [1]. Our nanoprecipitation process involves three steps: (i) the solubilization of sorafenib in ethanol at 40 °C (10 mg/mL of sorafenib, 100 μL) and addition of one equivalent of nucleolipid (either an anionic nucleotide-lipid, the diC₁₆-3'-dT [thymidine 3'-(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate)] or a cationic nucleoside-lipid DOTAU [23] [2',3'-dioleoyl-5'-deoxy-5'-trimethylammonium-uridine], 100 μL of a solution at 10 mg/mL in ethanol; (ii) 1 mL of the ethanol solution are added dropwise at room temperature to 10 mL of distilled water; and (iii) the resulting suspension was evaporated to remove the excess of ethanol and sonicated.

Chromatographic Studies

To evaluate the drug loading capabilities of the novel formulations, a reversed-phase UHPLC method was developed. Using this HPLC method, the simultaneous separation of sorafenib and nucleolipids was achieved in 12 min, allowing the individual quantization of compounds in SLNs (Additional file 1: Figure S11–4).

Loading ratios (mass ratios of sorafenib/nucleolipids in nanoparticles) of 50 and 80% and encapsulation yields of sorafenib around 55 and 75% were obtained for formulations composed of sorafenib/DOTAU (SLN⁺) and sorafenib/diC₁₆dT (SLN⁻), respectively. During the control experiment performed in the absence of nucleolipid, about 90% of

sorafenib was lost during the different steps of the formulation probably due to the low solubility of sorafenib in water. This result demonstrates that nucleolipids are necessary to solubilize sorafenib and stabilize the SLNs.

Physicochemical Studies

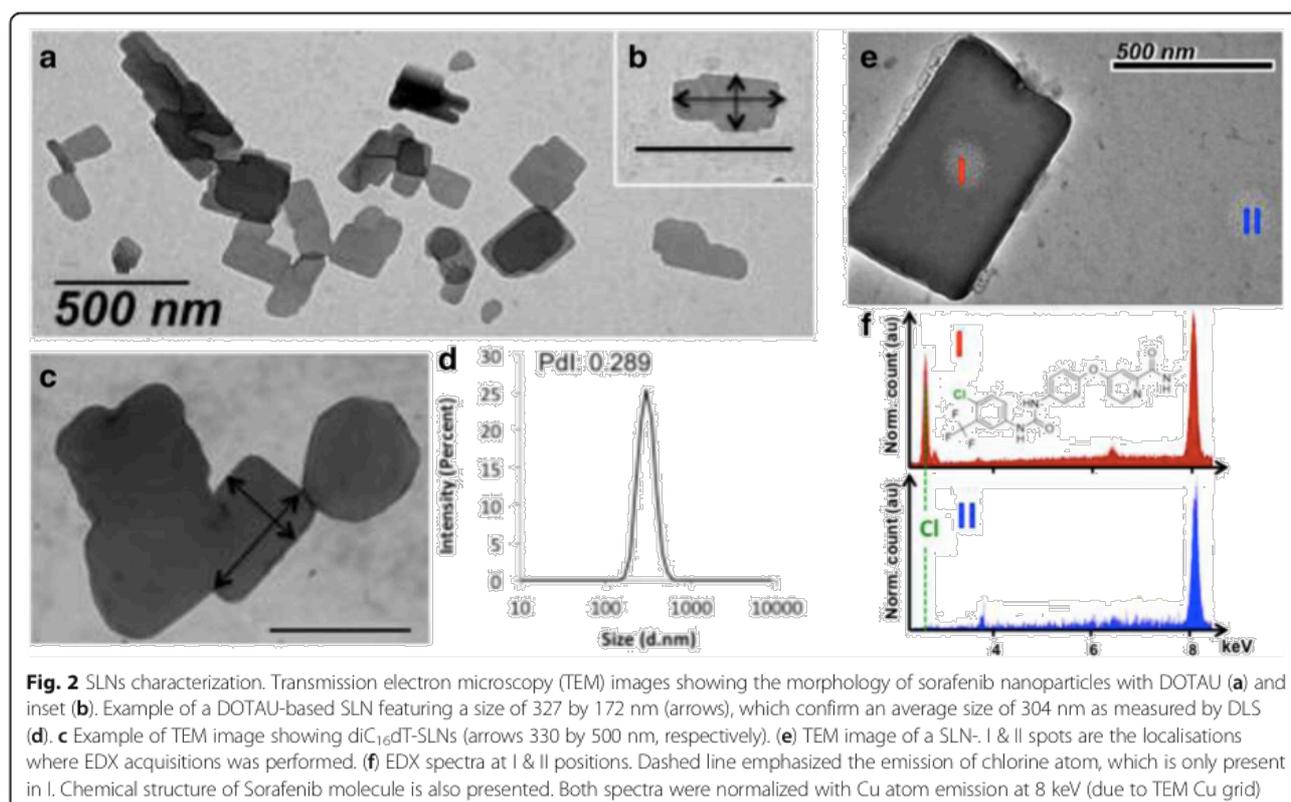
Dynamic light scattering (DLS) experiments were carried out to characterize the formation of SLNs. Both negative and positive nucleolipids (diC₁₆dT and DOTAU) form similar non-spherical nanoparticles with parallelepiped shapes in aqueous solution with a monodispersity (polydispersity index, PDI = 0.202 and 0.289; size = 335.2 and 304.4 nm, respectively, Fig. 2 and Additional file 1: Figure SI7). As expected, the zeta potentials of SLN-based objects depend on the nucleolipid polar heads ($\zeta = +59.1$ and -54.9 mV for SLN⁺ and SLN⁻, see Additional file 1: Figure SI10). The presence of sorafenib in the NP was validated by TEM imaging and EDX acquisitions of a SLN⁻ were realized with EDX acquisitions. Fig. 2e, f shows I and II spots. Spot I in Fig. 2f exhibits the emission of chlorine atom (spot I, Fig. 2e, f) indicating the presence of the sorafenib (see chemical structure Fig. 2f). Note that chlorine is present only in spot I and not in spot II (Fig. 2f).

Importantly, in control experiments, the nanoprecipitation of sorafenib in the absence of nucleolipid did not give rise to any nanoobject, demonstrating that the nucleolipids allow the formation and stabilization of the SLNs.

Stability Studies

Colloidal stabilities of SLN⁺ and SLN⁻ were measured by DLS and zeta potential at two temperatures (Fig. 3a and Additional file 1: Figure SI10). In the case of diC₁₆dT-based formulations, the size of SLN⁻ was not modified after 30 days at both 4 and 37 °C indicating a high stability of those nanoparticles (Additional file 1: Figure SI9). Such stability can be explained by the nature of the interactions (involving H-bonds, π - π stacking, charge/charge interaction) occurring between the diC₁₆dT and sorafenib. However, for DOTAU-based formulations, SLN⁺ were stable only at 4 °C for 30 days as revealed by DLS studies (Fig. 3a), whereas at 37 °C, an increase of both size and PDI was observed (Fig. 3a). This relative instability observed at 37 °C in the case of SLN⁺ could be explained by repulsive coulombic interactions occurring between the positive charges of both sorafenib and DOTAU. Interestingly, the colloidal stability studies indicate that it is possible to modulate the stability, hence the delivery of sorafenib from the SLNs to the physiological environment, depending on the nucleolipid used for the stabilization of the SLNs. The stability modulation could be attractive depending on the kinetic of release needed.

In parallel to colloidal stability, the chemical stability of sorafenib, DOTAU, and diC₁₆dT in the SLN-based formulations was investigated as a function of time at 4 and 37 °C using a new chromatographic method



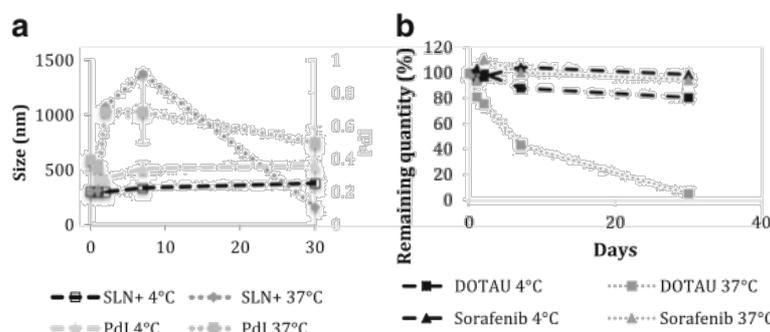


Fig. 3 Stability studies of SLNs. Colloidal stability of SLN⁺ (a) and chemical stability of sorafenib and DOTAU in SLN⁺ versus time at 4 and 37 °C (b). PDI, polydispersity index

(see Additional file 1: Figure SI4). Kinetic studies at both temperatures are shown in Fig. 3b and Additional file 1: SI5 for DOTAU-SLNs and diC₁₆dT-SLNs, respectively. The results show that sorafenib and diC₁₆dT molecules in formulations remain stable over at least 1 month, indicating a long-term chemical stability at both temperatures in the case of SLN⁺. However, a decrease of DOTAU during the time was observed in the SLN⁺ formulations. First, at 4 °C, losses of about 12% over 7 days and 20% over 30 days were measured. When increasing the temperature, DOTAU stability was decreased with a loss

of 55% over 7 days and until 95% over 30 days at 37 °C. Such differences in chemical stability between nucleolipids were already evidenced during previous stability studies (see Additional file 1: Figure SI6).

Biological Studies

SLN cytotoxicity was evaluated by metabolism activities and morphologies of cells. MTT assay allowed comparing free sorafenib (in 0.1% of DMSO) and SLNs loaded with the drug (Fig. 4) on four cell lines including two hepatocarcinomas (HuH7 and HepG2) and two luminal breast

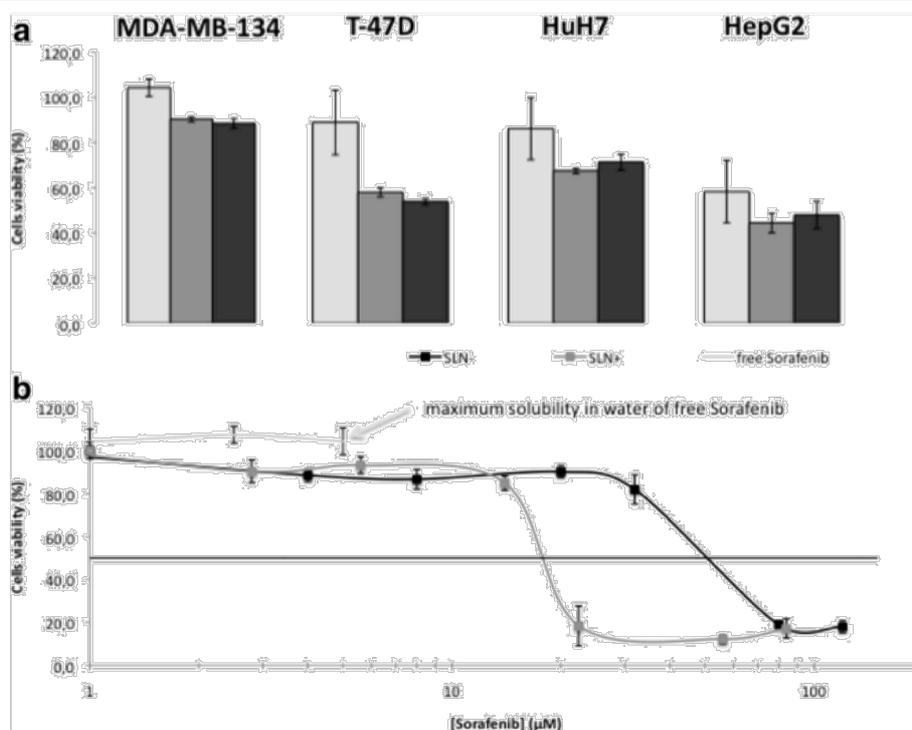


Fig. 4 Cytotoxicity effect of sorafenib or SLNs. a) Comparison of the cytotoxicity with free Sorafenib or SLNs of Sorafenib in 4 cells lines (2 luminal B breast cancer and 2 hepatocarcinomas) after quantification with MTS assay on 3 wells at 5 µM of free Sorafenib, 2.8 µM of NPs Sorafenib/DOTAU (SLN+) and 4 µM of NPs Sorafenib/diC₁₆dT (SLN-). b) Cell viability assay (MDA-MB-134 cells) in the presence of free sorafenib (limited of solubility), SLN+ (grey) or SLN- (black)

cancers (MDA-MB-134 and T-47D). First, at concentrations close to the maximum solubility of free sorafenib (5 μM of sorafenib in 0.1% of DMSO, 2.8 μM for sorafenib/DOTAU, and 4 μM for sorafenib/diC₁₆dT nanoparticles), both SLNs inhibited cell viability better than free sorafenib. As shown in Fig. 4b, a cell viability study realized on MDA-MB-134 cells indicated that the activity of free sorafenib is limited by its water solubility (100% of cell viability at [sorafenib] = 5 μM), whereas IC₅₀ values of 15 and 50 μM were observed for SLN⁺ and SLN⁻, respectively (Fig. 4b). In a FACS study achieved on HuH7, an IC₅₀ of roughly 50 μM was obtained (Additional file 1: Figures SI12 and SI13). Images of phase contrast microscopy show indeed a reduced density of the cell layers treated with either SLN⁻ and SLN⁺ compared to untreated or sorafenib-treated cells with no alteration of the cell morphology (Additional file 1: Figure SI11). Second, similar experiments were realized at higher concentrations of SLNs ([sorafenib] = 120 and at 84 μM for SLN⁻ and

SLN⁺, respectively) and compared to free sorafenib at its limit of solubility (concentration of 5 μM). In these conditions, both SLNs exhibit a strong cytotoxic effect on the four cancer cell lines as shown in Fig. 5. As revealed on the phase contrast microscopy images, cell debris was observed for both SLN⁻ (Fig. 5C1–4) and SLN⁺ (Fig. 5D1–4) attesting cell death, whereas cells remain alive in the case of free sorafenib (Fig. 5B1–4). It is worth noting that strong cytotoxic effects for both SLNs were observed in the case of luminal B breast cancer cells (Fig. 5C1–2 and D1–2). Such an antitumoral effect, which was not reported so before, open new possible therapeutic application of sorafenib thanks to the SLNs.

Conclusion

We report a novel approach based on nucleolipids allowing the efficient encapsulation and delivery of sorafenib. Our investigations demonstrate the formation of two types of solid lipid nanoparticles (SLNs) highly loaded

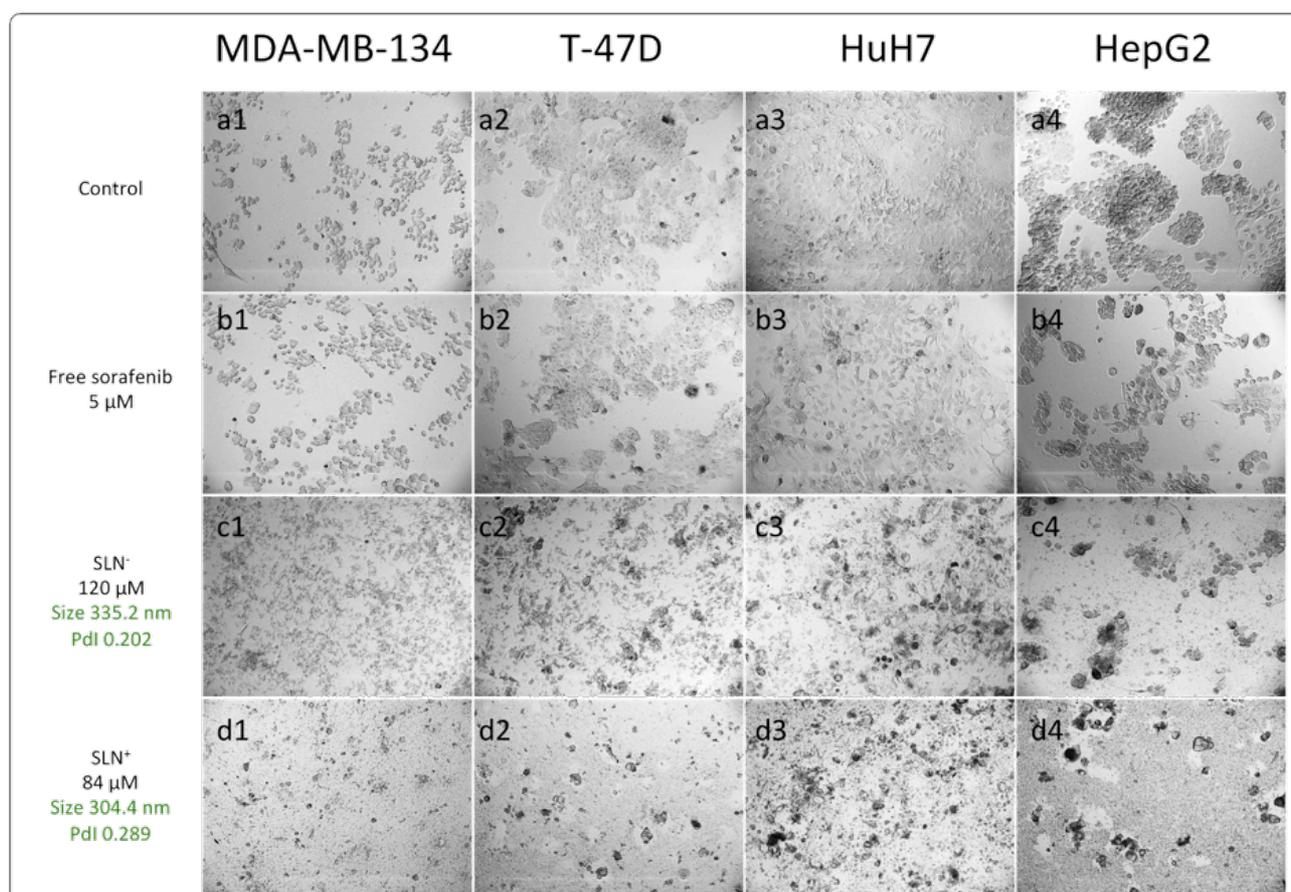


Fig. 5 Comparison of cells morphologies between control, free sorafenib, or SLNs. Phase contrast microscopy images showing cytotoxicity in different conditions on four human carcinoma cell lines (the hepatocarcinomas, HuH7, HepG2, and the luminal breast carcinoma MDA-MB-134, T-47D). A) In the absence of sorafenib (control experiments, **A1–A4** for MDA-MB-134, T-47D, HuH7, HepG2, cell lines, respectively). B) Cells were incubated for 4 days in the presence of 5 μM of free sorafenib. C and D) cells incubated in the presence of SLN⁻ and SLN⁺ at 84 and 120 μM in concentration of sorafenib, respectively

with sorafenib. These SLNs, which show either negative or positive zeta potentials values, feature parallelepiped shapes. As revealed by the DLS and HPLC studies, the stability of the SLNs can be modulated depending on the nucleolipid used. Importantly, both SLN^+ and SLN^- formulations are able to enhance dramatically the water solubility of sorafenib (concentrations higher than 120 μM). Such SLNs exhibit better antitumoral activities on four cancer cell lines (liver and breast cancers) compared to free sorafenib, which is limited due to its lack of solubility in water. Contrast phase microscopy images, recorded on the four cancer cell lines, exhibit a drastically cell mortality when incubated with 120 μM of SLN^- or 84 μM of SLN^+ . Hence, this drug could be used as the new therapeutic options in the case of liver cancers (use of sorafenib in intra-arterial chemotherapy, for example) or breast cancers. To our knowledge, this report is the first example of a study using sorafenib against luminal B breast cancers demonstrating the usefulness of the SLN approach. Altogether, the results reported in this contribution highlight the potential of nucleoside-lipid-based SLNs as drug delivery systems.

Additional file

Additional file 1: DLS data, zeta potentials, phase contrast microscopy, and TEM of SLNs synthesized in different experimental conditions, UHPLC dosages. (PDF 14710 kb)

Abbreviations

AFNH₄: Ammonium formate; DLS: Dynamic light scattering; FA: Formic acid; HCC: Hepatocellular carcinoma; HPLC: High-performance liquid chromatography; LNs: Lipid nanoparticles; MeOH: Methanol; PDI: Polydispersity index; RCC: Renal cell carcinoma; SLNs: Solid lipid nanoparticles; UHPLC: Ultra high-performance liquid chromatography

Acknowledgements

The authors thank the Bordeaux Imaging Centre (BIC) for the technical assistance during TEM observations.

Funding

Aquitain Science Transfert (AST) and INSERM Transfert have supported this work.

Availability of data and materials

Not applicable

Authors' contributions

The idea is from PB. The manuscript was mainly written by PB, SB, LF, and SB. GV, NM, and BA realized FACS and TEM-EDX experiments. All authors read and approved the final manuscript. Culture cells were realized by SB and CS. HPLC dosages were mainly done by LF and KG. Sorafenib formulation was done by SB and AA. All authors have approved the final version.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹University of Bordeaux, ARNA laboratory, F-33000 Bordeaux, France. ²INSERM, U1212, ARNA laboratory, F-33000 Bordeaux, France. ³CNRS, UMR 5320, ARNA laboratory, F-33000 Bordeaux, France. ⁴ARNA Laboratory, team ChemBioPharm, U1212 INSERM-UMR 5320 CNRS, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Received: 26 June 2017 Accepted: 19 December 2017

Published online: 11 January 2018

References

1. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7(10):3129–3140
2. Jäger D, Ma JH, Mardiak J, Ye DW, Korbenfeld E, Zemanova M et al (2015) Sorafenib treatment of advanced renal cell carcinoma patients in daily practice: the large international PREDICT study. *Clin Genitourin Cancer* 13(2): 156–164.e1
3. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359(4):378–390
4. Malarvizhi GL, Retnakumari AP, Nair S, Koyakutty M (2014) Transferrin targeted core-shell nanomedicine for combinatorial delivery of doxorubicin and sorafenib against hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 10(8):1649–1659
5. Wilhelm SM (2004 Oct 1) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19):7099–7109
6. Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F et al (2004 Aug 19) B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 23(37):6292–6298
7. Salvatore G, De Falco V, Salerno P, Nappi TC, Pepe S, Troncone G et al (2006) BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 12(5):1623–1629
8. Auclair D, Miller D, Yatsula V, Pickett W, Carter C, Chang Y et al (2007) Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia* 21(3):439–445
9. Wang X, Fan J, Liu Y, Zhao B, Jia Z, Zhang Q (2011) Bioavailability and pharmacokinetics of sorafenib suspension, nanoparticles and nanomatrix for oral administration to rat. *Int J Pharm* 419(1):339–346
10. Kim DH, Kim M-D, Choi C-W, Chung C-W, Ha SH, Kim CH et al (2012) Antitumor activity of sorafenib-incorporated nanoparticles of dextran/poly(dl-lactide-co-glycolide) block copolymer. *Nanoscale Res Lett* 7(11):91
11. Thapa RK, Choi JY, Poudel BK, Hiep TT, Pathak S, Gupta B et al (2015) Multilayer-coated liquid crystalline nanoparticles for effective sorafenib delivery to hepatocellular carcinoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 7(36): 20360–20368
12. Izadiyan Z, Basri M, Fard Masoumi HR, Abedi Karjiban R, Salim N, Shameli K. Modeling and optimization of nanoemulsion containing sorafenib for cancer treatment by response surface methodology. *Chem Cent J* [Internet]. 2017;11(1). Available from: <http://ccj.springeropen.com/articles/10.1186/s13065-017-0248-6> [cited 2017 Mar 24]
13. Correia A, Shahbazi M-A, Mäkilä E, Almeida S, Salonen J, Hirvonen J et al (2015) Cyclodextrin-modified porous silicon nanoparticles for efficient sustained drug delivery and proliferation inhibition of breast cancer cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 7(41):23197–23204
14. Park W, Chen J, Cho S, Park S, Larson AC, Na K et al (2016) Acidic pH-triggered drug-eluting nanocomposites for magnetic resonance imaging-monitored intra-arterial drug delivery to hepatocellular carcinoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 8(20):12711–12719
15. Poojari R, Kini S, Srivastava R, Panda D (2016) Intracellular interactions of electrostatically mediated layer-by-layer assembled polyelectrolytes based sorafenib nanoparticles in oral cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 143:131–138
16. Cao H, Wang Y, He X, Zhang Z, Yin Q, Chen Y et al (2015) Codelivery of sorafenib and curcumin by directed self-assembled nanoparticles enhances therapeutic effect on hepatocellular carcinoma. *Mol Pharm* 12(3):922–931

17. Bondi ML, Botto C, Amore E, Emma MR, Augello G, Craparo EF et al (2015) Lipid nanocarriers containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells. *Int J Pharm* 493(1–2):75–85
18. Zhang H, Zhang F-M, Yan S-J (2012) Preparation, in vitro release, and pharmacokinetics in rabbits of lyophilized injection of sorafenib solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7:2901–2910
19. Oumzil K, Ramin MA, Lorenzato C, Hémadou A, Laroche J, Jacobin-Valat MJ et al (2016) Solid lipid nanoparticles for image-guided therapy of atherosclerosis. *Bioconjug Chem* 27(3):569–575
20. Aimé A, Beztsinna N, Patwa A, Pokolenko A, Bestel I, Barthélémy P (2013) Quantum dot lipid oligonucleotide bioconjugates: toward a new anti-MicroRNA nanoplatform. *Bioconjug Chem* 24(8):1345–1355
21. Luvino D, Khiati S, Oumzil K, Rocchi P, Camplo M, Barthélémy P (2013) Efficient delivery of therapeutic small nucleic acids to prostate cancer cells using ketal nucleoside lipid nanoparticles. *J Control Release Off J Control Release Soc* 172(3):954–961
22. Barthélémy P (2009) Nucleoside-based lipids at work: from supramolecular assemblies to biological applications. *Comptes Rendus Chim - C R CHIM* 12(1):171–179
23. Khiati S, Luvino D, Oumzil K, Chauffert B, Camplo M, Barthélémy P (2011) Nucleoside–lipid-based nanoparticles for cisplatin delivery. *ACS Nano* 5(11):8649–8655
24. Chabaud P, Camplo M, Payet D, Serin G, Moreau L, Barthélémy P et al (2006) Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug Chem* 17(2):466–472
25. Khiati S, Pierre N, Andriamanarivo S, Grinstaff MW, Arazam N, Nallet F et al (2009) Anionic nucleotide–lipids for in vitro DNA transfection. *Bioconjug Chem* 20(9):1765–1772

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

Cette étude modèle de formulation de type SLN a montré la possibilité d'améliorer la solubilité du sorafénib par la formulation avec les NL tout en conservant l'activité anticancéreuse sur des hépatocarcinomes. Les taux de chargement sont de 50 % pour la formulation avec le DOTAU et de 80 % avec la DiC₁₆dT. Le transfert de méthode et l'utilisation d'un nouveau LASO sont en cours de réalisation au laboratoire en modifiant la séquence oligonucléotidique. La nouvelle séquence cible le microARN 10-b surexprimé dans les gliomes. Ainsi, la perspective de ce projet est d'encapsuler une substance anticancéreuse multi-cible comme le sorafénib avec des LASO pour la vectorisation efficace de la substance active tout en générant un effet inhibiteur par l'agent de formulation, à savoir l'oligonucléotide conjugué.

D. Hydrogel à partir de LASO

Les propriétés physico-chimiques des LASO ont été évaluées précédemment (Chapitre II D et E) à des concentrations comprises entre 30 μ M à 200 μ M. À des concentrations plus élevées, le LASO adopte une nouvelle structure macroscopique de type gel à 25 % en masse (34,8 mM) dans l'eau distillée. Comparativement aux autres séquences d'oligonucléotides nucléolipidique ou non, le conjugué LASO supporte son propre poids lorsque le tube est retourné (Figure 50).

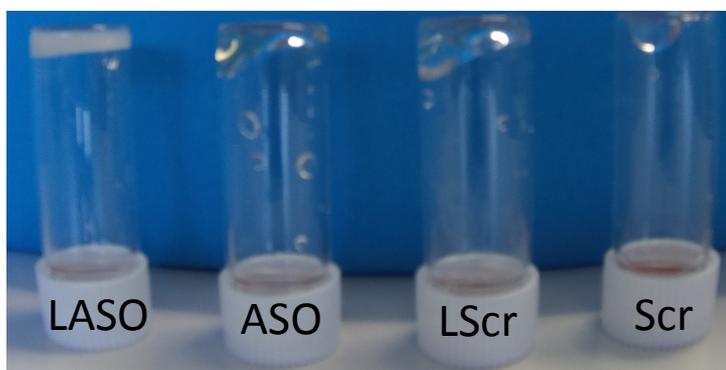


Figure 50 : Comportement macroscopique des oligonucléotides à 25 % (m/m) dans l'eau distillée

Le LASO, la séquence contrôle conjuguée nucléolipidique LScr ainsi que les contrôles ASO et Scr sont solubilisés dans l'eau distillée. Seul le LASO forme une structure opaque et dense.

ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

Les résultats montrent la formation d'un gel macroscopique uniquement dans le cas spécifique du LASO. Deux particularités structurales semblent ici jouer un rôle primordial dans la gélification. En effet, le caractère amphiphile de la molécule apporté

par les chaînes lipidiques (LASO *versus* ASO / Scr) mais également la spécificité de la séquence d'oligonucléotides (LASO *versus* LScr) participent à la formation de l'hydrogel.

De plus, il a été possible de noter précédemment que le comportement du LASO est dépendant de la concentration en sels dans le milieu. En effet, dans le Chapitre II D1 il a été montré que la présence de sels dans le milieu permettait de favoriser la formation d'assemblages à plus faible concentration. Afin de vérifier ces résultats expérimentaux, la formulation des 4 oligonucléotides LASO, ASO, Scr et LScr a été réalisée dans le PBS en diminuant la concentration massique des différents composés à 10 % (m/m). Il a été possible de constater que, similairement à l'eau distillée, seul le LASO présente un comportement de type gel pour une concentration nettement inférieure à celle utilisée dans l'eau distillée (Figure 51). De plus, à cette même concentration de 10 % (m/m), le comportement de type gel du LASO n'est pas observé dans l'eau distillée. Ces expériences confirment donc l'effet favorable des sels sur ce phénomène de gélification.

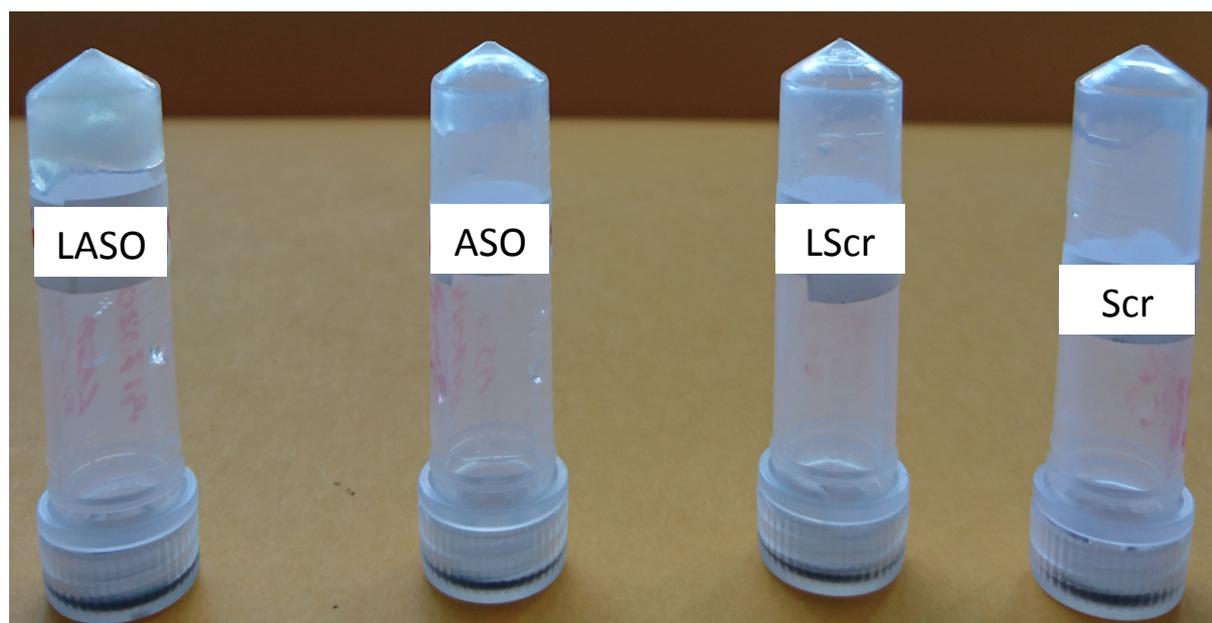


Figure 51 : Comportement macroscopique des oligonucléotides en présence de PBS

Le LASO, la séquence contrôle conjuguée nucléolipidique LScr ainsi que les contrôles ASO et Scr sont solubilisés dans le PBS à 13,9 mM. Seul le LASO forme une structure de type gel.
ASO : oligonucléotide antisens, LASO : conjugué nucléolipidique ASO, Scr : séquence contrôle et LScr : conjugué nucléolipidique Scr.

La morphologie des objets résultant de l'auto-assemblage a été caractérisée par MET après dépôt et séchage de l'échantillon sur la grille (Figure 52).

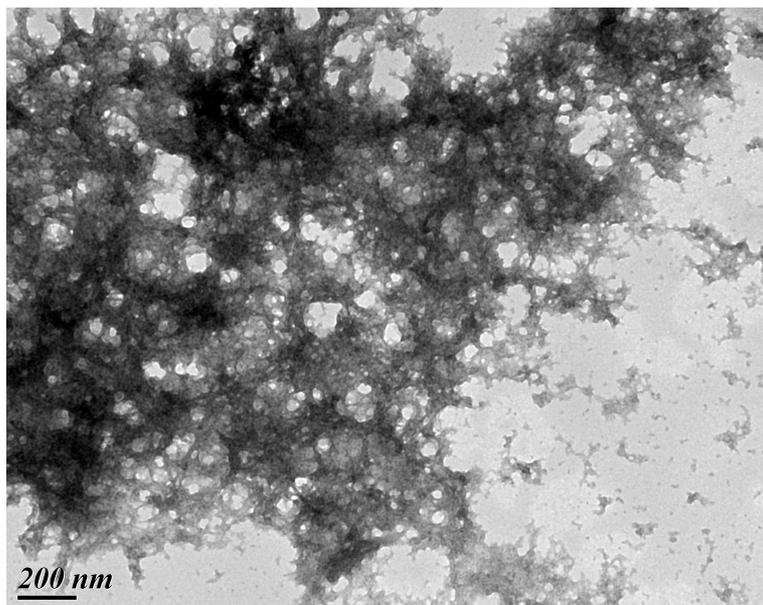


Figure 52 : Comportement du LASO à 10 % (m/m) dans le PBS observé en MET

Solution de LASO à 10 % (m/m) dans le PBS séchée sur une grille de microscopie sans coloration. L'observation est réalisée à un grossissement x 70 000 en mode haute résolution. La barre d'échelle correspond à 200 nm.

D'un point de vue microscopique, le LASO à 10 % (m/m) dans le PBS présente une structuration sub-micrométrique très dense aux électrons probablement à l'origine de la gélification.

Les propriétés visco-élastiques de cet hydrogel a été étudiée par rhéologie. Cette technique permet d'étudier les propriétés d'écoulement de la matière sous une contrainte appliquée. Chaque matériau possède un comportement qui lui est propre et qui est déterminé par la mesure de deux modules rhéologiques. Le module élastique G' traduit un comportement solide tandis que le module visqueux G'' représente un comportement liquide. Les matériaux de type gel présente un comportement dit visco-élastique c'est-à-dire qu'ils présentent à la fois un comportement élastique et visqueux en fonction de la déformation ou contrainte qui lui est appliquée.

Afin de caractériser l'hydrogel LASO à 10 % (m/m) dans le PBS, la première étape consiste à déterminer son domaine de visco-élasticité ou LVER (pour *Linear ViscoElastic Region* en anglais). Tous les matériaux visco-élastiques présentent un domaine de déformation dans lequel les structures macroscopique et microscopique demeurent intactes. Le LVER permet entre autres d'évaluer l'élasticité du matériau sous l'action d'une déformation. Ainsi, plus le LVER est grand plus le matériau peut subir des déformations importantes. A l'inverse, plus il est faible plus le matériau est cassant. L'étude du LVER à 37 °C de l'hydrogel montre un point de rupture à 25,2 % en

déformation à partir du lequel une inversion des modules est observée ($G'' > G'$; Figure 53). Le LVER du matériau peut être estimé à 3,2 % en déformation.

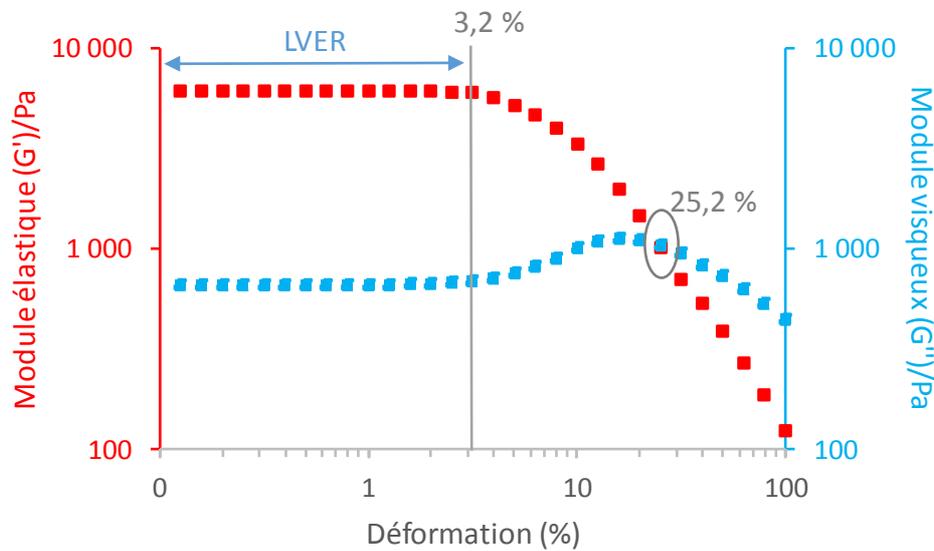


Figure 53 : Détermination du LVER du gel formé par le LASO à 10 % (m/m) dans le PBS

Expérience réalisée à 37 °C, contrainte de déformation de 0,01 % à 100 %.

Afin de s'assurer de l'intégrité de la structure du matériau, les modules rhéologiques ont été déterminés dans le LVER à un pourcentage de déformation de 0,03 %. Les balayages en fréquence réalisés à 25, 37 et 70 °C ont permis de mesurer la force du gel. L'évolution des modules G' et G'' en fonction de la température est résumée sur la figure 54.

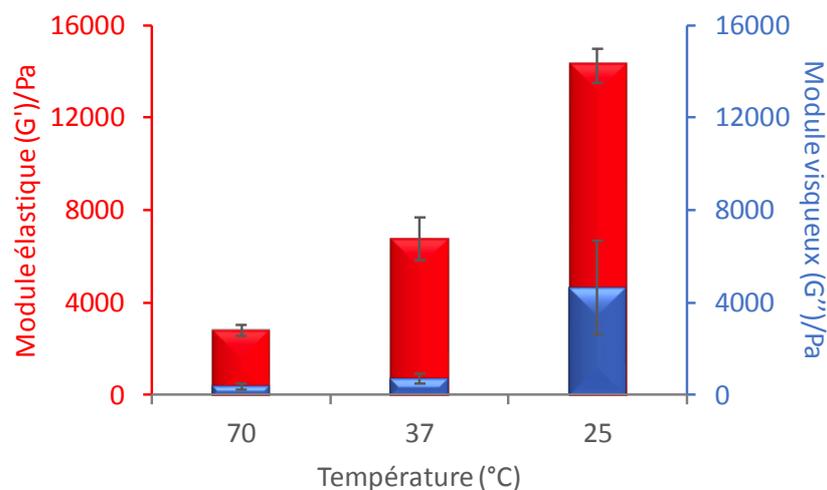


Figure 54 : Modules élastique G' et visqueux G'' de l'hydrogel formé par le LASO à 10 % (m/m) dans le PBS en fonction de la température

Les résultats montrent un module G' largement supérieur au module G'' à 25 °C traduisant un comportement solide prédominant. De plus, il est possible de noter que plus la température augmente, plus les modules G' et G'' diminuent traduisant un affaiblissement du gel.

Certains gels présentent de plus des propriétés d'injectabilité très intéressantes pour des applications biomédicales. En effet, ces matériaux peuvent se liquéfier sous l'action d'une contrainte et retrouver leur forme de gel au repos. Ils peuvent ainsi être prélevés à l'aide d'une seringue, injectés *in vivo* par voie sous-cutanée par exemple et se reformer rapidement à l'endroit de l'injection. Cette propriété, appelée thixotropie, a été testée par rhéologie sur l'hydrogel de LASO à 10 % (m/m) dans le PBS (Figure 55).

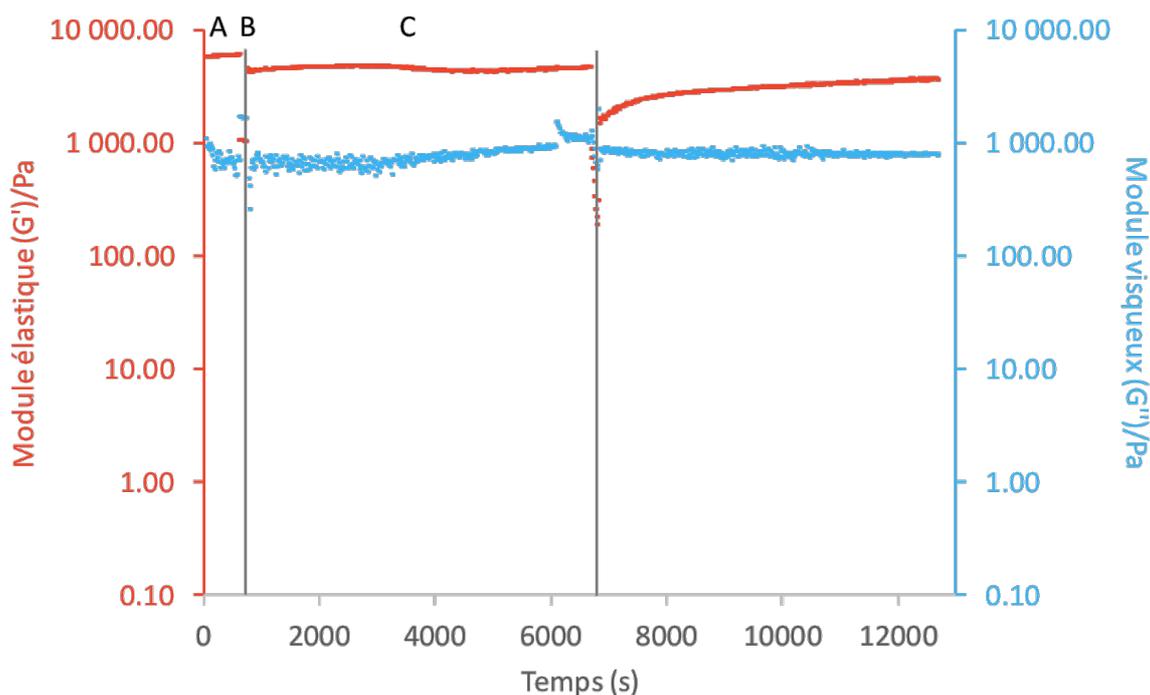


Figure 55 : Etude de thixotropie de l'hydrogel LASO à 10 % (m/m) dans le PBS

Un cycle de thixotropie correspond à A : Déformation de 0,03 % pendant 10 min (dans le LVER), B : Déformation de 30 % pendant 2 min (en dehors du LVER), C : Déformation de 0,03 % pendant 90 min (dans le LVER). Le cycle est ici répété deux fois.

Les résultats montrent que lorsqu'une déformation importante est appliquée (en dehors du LVER, Figure 55B), les modules rhéologiques s'inversent ($G'' > G'$), ce qui correspond à la déstructuration de l'hydrogel et donc un comportement de type liquide. Lorsque cette forte contrainte est stoppée et qu'une déformation située à l'intérieur du LVER est appliquée (Figure 55C), l'échantillon reprend un comportement de type solide et donc une forme de gel ($G' > G''$). La répétition de ces cycles de fortes / faibles contraintes mettent en évidence une reformation très rapide du gel avec néanmoins une diminution du module élastique G' marquée après le deuxième cycle.

Cet hydrogel singulier présente une propriété thixotrope et donc une possible injectabilité à travers une seringue. Ce comportement est très intéressant et peut être mis à profit pour des applications biomédicales. En effet, la séquence d'oligonucléotides du LASO présente à elle seule une activité inhibitrice envers la protéine TCTP dans le cas de CRPC. Cette molécule constitue donc un biomatériau « autosuffisant » pour sa délivrance ainsi que pour son action thérapeutique. A notre connaissance, aucun biomatériau de type gel thixotrope composé d'oligonucléotides amphiphiles n'a à ce jour été décrit dans la littérature.

Un autre biomatériau a été caractérisé à partir de biomolécules thérapeutiques, le Lanréotide. Ces molécules sont des cyclopeptides analogues de la somatostatine utilisés en tant que substances actives à action prolongée (Salvatori *et al.*, 2014). Ce médicament est commercialisé par le groupe pharmaceutique Ipsen sous le nom de Somatuline® depuis Août 2007 et est utilisé dans les cas d'acromégalie⁸. Deux produits sont développés à partir de cette molécule suivant le mode d'administration, par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée. Ce cyclopeptide s'auto-assemble sous forme d'hydrogel et présente une structure tubulaire en MET (Wolin *et al.*, 2016). La formation de ce système est de plus dépendante de la présence en sels dans le milieu. La dégradation de la structure sous forme de monomère au cours du temps permet un relargage continu de la substance active pour une action prolongée (Valéry *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces propriétés de structuration du biomatériau, de délivrance et d'action thérapeutique est similaire aux analyses préliminaires effectuées sur l'hydrogel de LASO à 10 % (m/m), ce qui laisse suggérer une potentielle voie d'administration du LASO pour une action prolongée.

E. Conclusion de la formulation

Dans les expériences exposées dans ce chapitre, les nucléolipide-oligonucléotides ont montré des propriétés d'agent de formulation efficaces pour différents types de molécules. Un dérivé de phénazine (Ph 14) développé par le Dr M. Camplo (Ziouziou *et al.*, 2017) a été encapsulé avec succès dans des nanoparticules composées de LASO anti-TCTP. Ces objets ont montré un effet synergique (LASO / Ph 14) sur le cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) avec une cytotoxicité de 50 % sur des cellules PC-3 à 50 µM de Ph 14. Cette étude est d'ailleurs valorisée par un brevet international (EP18305260.4) déposé en mars 2018. Des expériences complémentaires permettraient de mettre en évidence le mécanisme d'action de ces formulations, et d'évaluer l'inhibition de la protéine TCTP par le LASO ainsi que l'inhibition de l'interaction entre les protéines Hsp27 et eIF4E par Ph 14.

⁸ https://ipfen.com/websites/IPFENCOM-PROD/wp-content/uploads/sites/22/2017/08/10175238/BE_Somatuline_Autogel_60_90_120_SmPC_2017MAY6_FR.pdf
Consulté le 18/05/2018

Le LASO peut également être utilisé pour la formulation d'agent cationique par interaction de charges électrostatiques. L'encapsulation de doxorubicine en est ici la preuve de concept. Il serait intéressant de combiner les deux principes de formulations démontrés dans ce chapitre, par interactions de charge et par effets hydrophobes, afin de créer une plateforme fonctionnelle pour des applications théranostiques. Il serait alors possible de formuler simultanément une substance active hydrophobe avec un agent d'imagerie cationique ou inversement.

Les NL ont démontré depuis plusieurs années, à travers des publications et des propriétés intellectuelles, leurs capacités à s'organiser en structure supramoléculaire. L'étude publiée en 2018 dans *Nanoscale research letter* confirme l'utilisation de deux NL pour l'encapsulation de sorafénib (Benizri *et al.*, 2018). Un LASO a été synthétisé dans le cadre de ce projet pour la formulation de cet anticancéreux avec une séquence oligonucléotidique ciblant le microARN 10-b.

En conclusion, l'utilisation de LASO pour la formulation est une approche innovante et prometteuse. Ces études montrent un double effet thérapeutique par la molécule encapsulée mais également par l'effet inhibiteur conservé de la séquence oligonucléotidique.

Enfin, la formation d'hydrogel à des concentrations supérieures en LASO engendre une nouvelle voie d'application dans la recherche biomédicale. L'injectabilité ainsi que la force du gel pourrait permettre une délivrance de la molécule thérapeutique de manière prolongée après une seule injection. Des études de cinétique de relargage du LASO sont actuellement en cours de réalisation pour évaluer la faisabilité de l'application. En parallèle, différentes questions restent à ce jour non élucidées, notamment le mécanisme d'assemblage des LASO dans le PBS ainsi que les interactions mises en jeu. Plusieurs expériences devront être menées pour caractériser de manière complète ce biomatériau original.

V. Conclusion et perspectives

Depuis leur découverte en 1978 par Zamecnik et Stephenson, les oligonucléotides sont de plus en plus utilisés dans les recherches scientifiques de par leur activité prometteuse dans le traitement de plusieurs pathologies. Leur propriété de modification de la traduction est largement utilisée en biologie moléculaire par transfection et en thérapie par voie d'administration locale. Malgré ce fort potentiel thérapeutique, seuls quelques médicaments à base d'oligonucléotides sont à ce jour commercialisés dans le cadre d'un traitement systémique.

Toutes les protéines sont régies par le code génétique et donc par la séquence de l'ARNm codant. L'utilisation des oligonucléotides antisens permettrait théoriquement de bloquer cette traduction par l'utilisation de la séquence complémentaire. Cependant, la structure tridimensionnelle de l'ARN empêche l'hybridation de certaines séquences et altère l'activité engendrée par l'ASO. En plus des difficultés liées à l'ARN, les oligonucléotides peuvent générer des interactions intramoléculaires, comme les G-quadruplex (liaisons hydrogène entre quatre guanines), empêchant une complémentarité efficace vis-à-vis de l'ARN ciblé. La structure de l'oligonucléotide ainsi que celle de la cible est cruciale pour permettre une efficacité biologique.

Les oligonucléotides exogènes sont également soumis à une dégradation par les nucléases de l'organisme. Pour cela, de nombreuses modifications chimiques sur les oligonucléotides ont été développées dans le but d'améliorer leur faible demi-vie plasmatique. Le développement de ces séries de modifications chimiques mène à différents effets biologiques par des mécanismes variés discutés dans le Chapitre I.

Le caractère hydrophile des oligonucléotides entraîne une faible biodisponibilité intracellulaire engendrée par la barrière phospholipidique. Un grand nombre de formulations sont décrites dans la littérature en vue d'augmenter l'internalisation de ces molécules et d'améliorer l'efficacité des effets biologiques associés.

Aussi, de nombreuses modifications chimiques par conjugaison avec des biomolécules sont réalisées dans le but d'augmenter la biodisponibilité des oligonucléotides. Les liaisons développées entre la molécule conjuguée et l'oligonucléotide sont diverses et variées, par chimie « click » ou encore des liaisons clivables sensibles au pH, à

l'environnement réducteur ou encore à la lumière. Ces conjugaisons permettent de créer un ciblage actif, un second effet thérapeutique ou encore générer une source d'imagerie.

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'utilisation de séquences d'oligonucléotides conjuguées à un nouveau composé de type nucléolipide pour l'internalisation cellulaire. L'utilisation de cette copule lipidique modifie la polarité des oligonucléotides donnant lieu à des assemblages supramoléculaires pour des concentrations de l'ordre du micromolaire. La caractérisation de ces assemblages expose une concentration critique d'agrégation dépendante en sels dans les milieux aqueux vérifiée par différentes techniques de physico-chimie (DLS, MET, tensiométrie).

L'activité inhibitrice de ces nouveaux conjugués LASO a été évaluée en présence de RNase H et du brin complémentaire ARN de la séquence d'intérêt. Les expériences ont montré une activité différente par rapport au contrôle ASO transfecté par l'oligofectamine™. La position du greffage du nucléolipide est importante pour conserver l'activité RNase H. La conjugaison à l'extrémité 3' montre une inhibition par activation de l'enzyme comme avec l'ASO nu contrairement au greffage à l'extrémité 5'. Cependant, le greffage à cette extrémité montre une inhibition efficace *in vitro* et *in vivo*. Ce conjugué LASO pénètre dans les cellules *via* un mécanisme de macropinocytose et entraîne une inhibition efficace de la traduction de la protéine d'intérêt. Cet effet est conservé *in vivo* sur des souris xénotreffées par des cellules PC-3 avec une prolifération tumorale diminuée d'un facteur quatre par rapport aux contrôles négatifs Scr et LScr et d'un facteur deux par rapport à la molécule thérapeutique non conjuguée ASO.

Ce travail de thèse a de plus montré l'utilisation de nucléolipides pour formuler des substances actives hydrophobes telles que le sorafénib et un dérivé de phénazine. Les particules formées sont de tailles et de formes différentes selon la molécule encapsulée. Cette preuve de concept, réalisée avec succès, nous a permis par la suite d'étudier les effets thérapeutiques combinés des formulations de dérivé de phénazine par des conjugués LASO. Les objets formulés sont monodisperses, de tailles avoisinant 200 nm et présentent des propriétés cytotoxiques sur les cellules PC-3 supérieures à l'oligonucléotide seul. Ces formulations sont stables à 4 °C et peuvent être conservées sans déstabilisation colloïdale. Cette étude a généré un brevet montrant l'intérêt de coupler les deux effets thérapeutiques du LASO et du dérivé phénazine dans la même

formulation dans le cadre du traitement du cancer de la prostate résistant à la castration.

Enfin, le caractère amphiphile et polyanionique de ces molécules a été mis à profit pour la complexation de molécules cationiques et/ou hydrophobes comme la doxorubicine. La faisabilité de cette étude préliminaire a été démontrée par la formulation de doxorubicine avec le LASO. Des études approfondies sur la stabilité colloïdale et l'activité anti-cancéreuse de ces formulations doivent être réalisées.

En parallèle à l'utilisation de LASO avec des substances actives, la molécule en elle-même est capable de former une structure macroscopique de type gel à forte concentration (10 % (m/m) dans le PBS). Le caractère thixotrope de ce nouveau biomatériau et donc son injectabilité ouvre des perspectives très intéressantes, notamment dans la libération prolongée d'oligonucléotides thérapeutiques. Cette propriété originale de gélification par un composé de type LASO n'est, à notre connaissance, pas reportée dans la littérature. Cependant, ce phénomène semble fortement lié à la séquence d'oligonucléotides utilisée étant donné l'absence de gélification avec le contrôle nucléolipidique LScr.

L'ensemble de ce travail montre la complexité d'étudier ces molécules conjuguées, par les différents assemblages générés de taille micellaire, liposomale et macroscopique. Le mécanisme d'activité biologique n'est pas encore élucidé, mais il permet l'auto-intériorisation cellulaire et l'inhibition de la protéine TCTP dans l'étude *in vitro* et *in vivo*. Cette molécule suffit même à elle seule d'inhiber la prolifération tumorale *in vivo*. Les propriétés prometteuses de ce nouveau conjugué ont débouché sur la formulation de substances actives déjà utilisées comme la doxorubicine et prochainement le sorafénib mais également de générer de nouvelles formulations avec les dérivés de phénazine. Cette dernière formulation a montré un effet synergique sur la cytotoxicité cellulaire sur un modèle de cancer de la prostate résistant à la castration.

Cette conjugaison nucléolipide-oligonucléotide est très prometteuse dans le monde des oligonucléotides thérapeutiques. Cette innovation génère actuellement treize collaborations nationales (Figure 56).



Figure 56 : Schéma récapitulatif des projets de recherche utilisant la technologie des nucléolipide-oligonucléotides en collaboration avec l'équipe ChemBioPharm

En perspective, des études complémentaires de physico-chimie permettraient de mieux comprendre le mécanisme des assemblages supramoléculaires dans des milieux simples ou complexes tels que les fluides biologiques. Ceci est essentiel pour l'étude de la biodistribution *in vivo* par voie intraveineuse, mais aussi sous forme de gel pour la libération prolongée par injection sous-cutanée.

Aussi, le mécanisme d'inhibition du LASO conjugué à l'extrémité 5' ne semble pas lié à l'activation de la RNase H, il serait intéressant d'optimiser les modifications chimiques, par exemple par des LNA ou des 2'-O-MOE sous forme de *gapmers* afin d'augmenter les températures de fusion et donc de favoriser l'hybridation à la cible.

Enfin, ces systèmes ont démontré des propriétés de formulation avec des molécules cationiques et hydrophobes. L'optimisation des formulations LASO / sorafénib et LASO / doxorubicine permettrait d'étudier la stabilité colloïdale et évaluer l'effet thérapeutique *in vitro* et *in vivo*. Le double effet thérapeutique du complexe LASO / dérivé de phénazine déterminé *in vitro* reste encore à confirmer *in vivo*.

VI. Matériels et méthodes

A. Synthèses des oligonucléotides et des nucléolipide-oligonucléotides

La synthèse des oligonucléotides est automatisée par un synthétiseur H8 (K&A Laborgeraete, Allemagne) pour des échelles de synthèse de 0,2 à 1 μmol et par un synthétiseur AKTA OligoPilot 10 (GE Healthcare, USA) pour des échelles de synthèse de 15 à 50 μmol .

La synthèse d'oligonucléotides est réalisée sur un support solide constitué de billes de verre (CPG pour *Controlled Pore Glass* en anglais) pour le synthétiseur H8 ou de polystyrène réticulé pour l'AKTA OP10, de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. La taille moyenne des billes de polystyrène est comprise entre 35 et 75 μm dans l'acétonitrile (ACN). La croissance de l'oligonucléotide fixé sur le support est réalisée par des réactions entre le groupement *N,N*-diisopropyle du phosphoramidite en solution dans l'ACN et l'alcool primaire en position 5' du dernier nucléotide de l'oligonucléotide. Lors de cette réaction de couplage, l'eau peut entrer en compétition avec les groupes hydroxyles présents sur les sucres. C'est pour cela qu'il est impératif de toujours utiliser des réactifs anhydres. L'utilisation de monomères (phosphoramidites) en excès permet de limiter l'effet compétitif des traces d'eau dans les solvants ; 4 équivalents de monomères par couplage ont été utilisés pour les synthèses présentées ici.

La synthèse s'effectue avec des étapes de protection/déprotection successives. Les groupements protecteurs utilisés permettent d'éviter des réactions secondaires non souhaitées. Ainsi, le 4,4'-DiMéthoxyTrityle (DMT) est utilisé pour protéger l'alcool primaire en position 5' présent sur les nucléotides. Les groupes protecteurs benzoyles protègent quant-à-eux les amines primaires des bases azotées (adénine et cytosine), les isobutyryles pour les guanines et les β -cyanoéthyles pour les phosphites.

Les phosphoramidites commerciaux possèdent une diisopropylamine liée au phosphore. Cette amine est activée avant le couplage, en condition faiblement acide sous forme de tétrazolide en présence de 5-(Éthylethio)-1H-tétrazole (ETT).

Le cycle de synthèse est constitué principalement des étapes de détritulation, couplage, oxydation et *capping* (Figure 57).

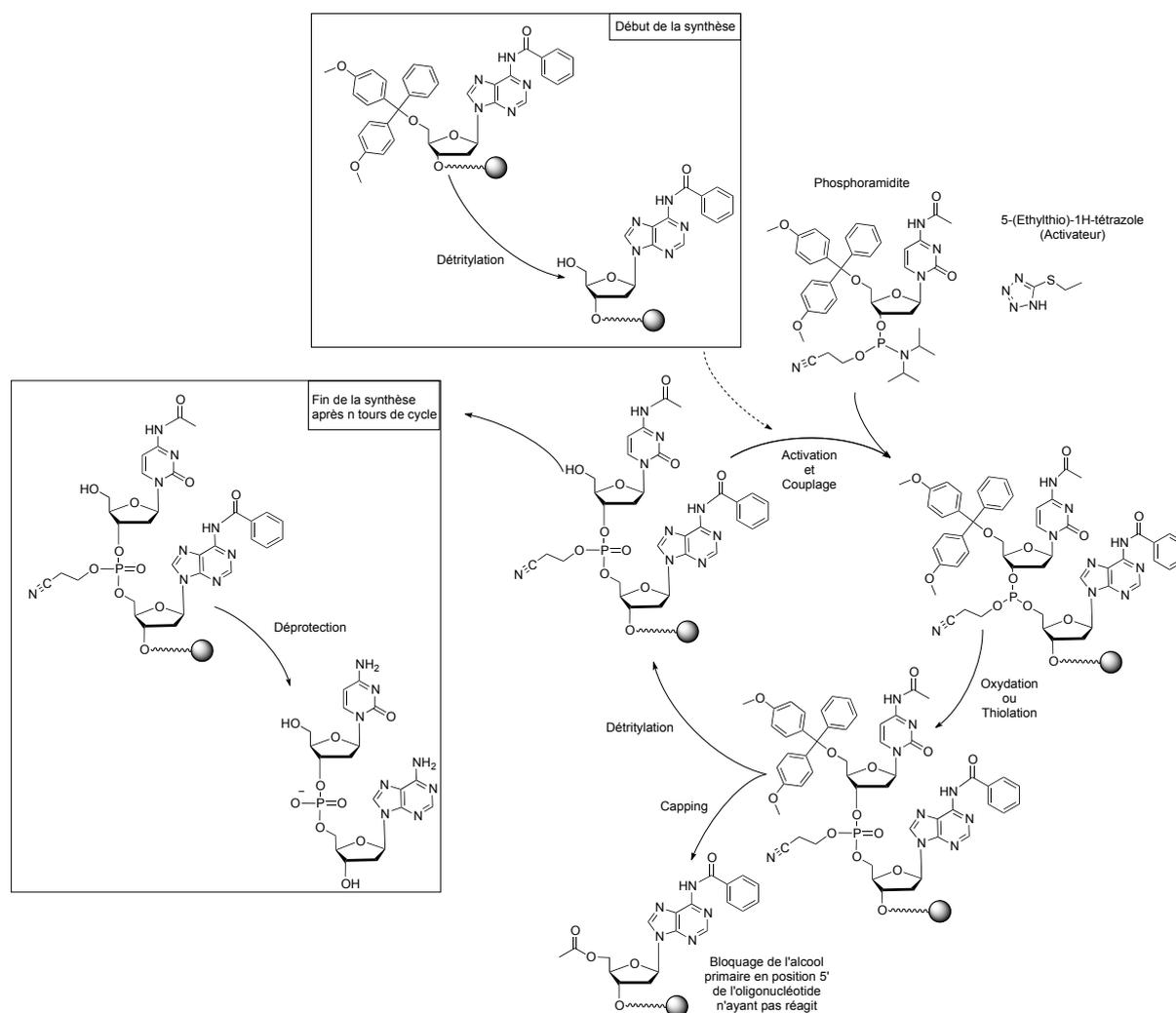


Figure 57 : Cycle de synthèse automatisée d'oligonucléotides sur support solide

La première étape est une détritylation et permet de déprotéger l'alcool primaire en position 5' du ribose afin de libérer cette position qui sera par la suite engagée avec l'amine tertiaire du phosphoramidite activé (Figure 58). Cette première étape de déprotection est réalisée à l'aide d'acide DiChloroAcétique (DCA) à 3 % (v/v) dans du Toluène. Le DMT libéré lors de la réaction sous forme ionique génère une couleur orangée avec un maximum d'absorbance à 495 nm. Le suivi de cette déprotection est effectuée par spectrophotométrie et est directement corrélée à la quantité du dernier nucléotide couplé et donc de l'oligonucléotide présent sur le support solide.

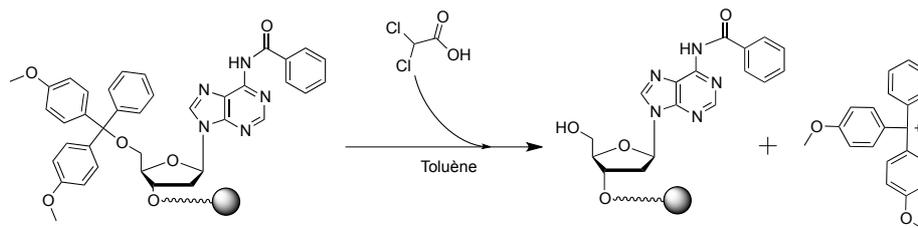


Figure 58 : Réaction de déprotection du DMT par le DCA

Avant de réaliser la deuxième étape de synthèse, à savoir le couplage entre deux nucléotides, le phosphoramidite en solution dans l'ACN est activé par l'ETT pour générer un dérivé tétrazole possédant un groupement phosphite hautement électrophile (Figure 59).

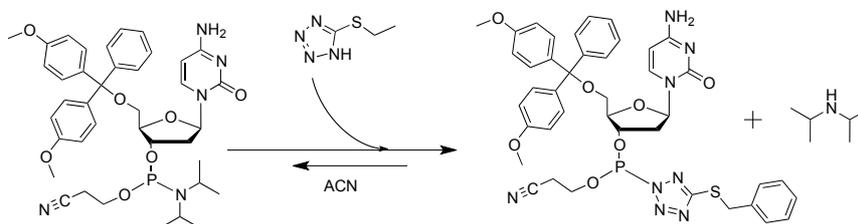


Figure 59 : Réaction d'activation de le phosphoramidite lors de la synthèse d'oligonucléotides

Dans ces conditions de synthèse, seul l'alcool primaire en position 5' de l'oligonucléotide sur support solide est donneur d'électrons (Figure 60). La réaction de couplage peut donc avoir lieu entre l'oligonucléotide et le phosphoramidite activé.

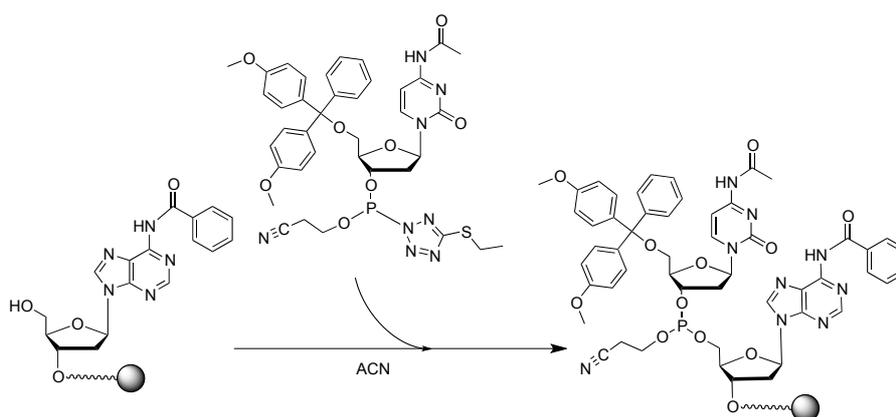


Figure 60 : Réaction de couplage du phosphoramidite sur l'alcool primaire en position 5'

Le groupement phosphite peut ensuite subir différentes réactions pour mener à des liens phosphodiester ou phosphorotioate. Il peut dans le premier cas être oxydé avec une solution d'iode à 0,05 M dans un mélange pyridine / eau (9/1) (Figure 61) et dans

un second cas thiolé par du DDTT (3-((*N,N*-diméthylaminométhylidène)amino)-3H-1,2,4-dithiazole-5-thione) à 0,05 M dans un mélange pyridine / ACN (6/4) (Figure 62).

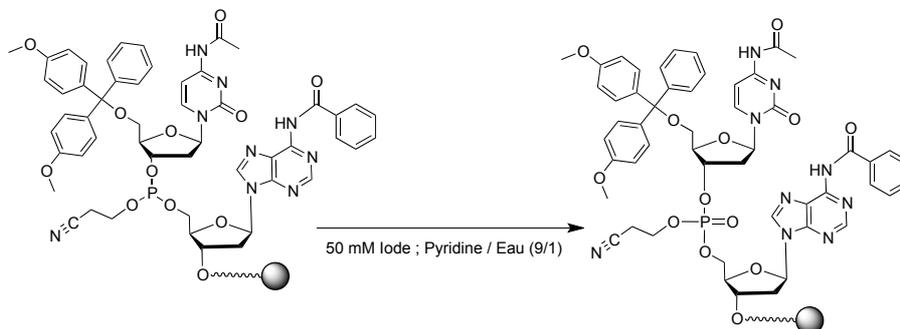


Figure 61 : Réaction d'oxydation du groupement phosphite en lien phosphodiester lors de la synthèse d'oligonucléotides

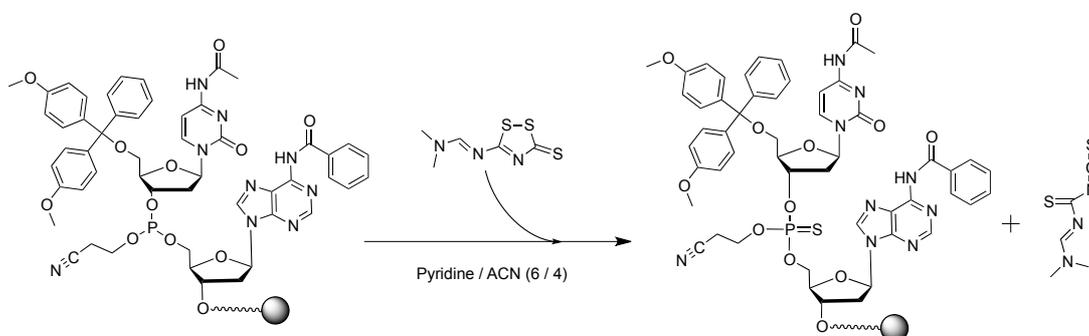


Figure 62 : Réaction de thiolation du groupement phosphite en lien phosphorothioate lors de la synthèse d'oligonucléotides

La troisième étape de synthèse ou *capping* consiste à protéger les oligonucléotides n'ayant pas réagi lors du couplage. En effet, cette protection permanente permet de tronquer la synthèse et ainsi d'éliminer facilement les avortons lors de la purification. Les groupements alcool primaire en position 5' sont acylés en présence d'anhydride acétique pour désactiver la position et empêcher le prochain couplage (Figure 63). Le réactif de *capping* A, jouant le rôle de catalyseur, contient 20 % (v/v) de *N*-méthylimidazole dans de l'ACN. Le réactif de *capping* B est constitué d'anhydride acétique à 20 % (v/v) dans du 2,6-lutidine à 30 % et de l'ACN à 50 %. Les deux réactifs de *capping* sont mélangés dans le réacteur contenant le support solide lors de cette étape.

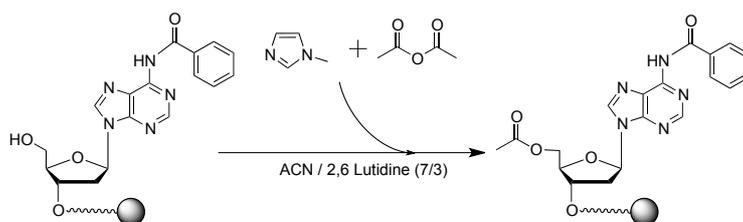


Figure 63 : Réaction de *capping* de l'oligonucléotide n'ayant pas réagi

Après la synthèse automatisée, la dernière étape consiste à retirer le réacteur contenant les oligonucléotides liés au support. Il est ensuite séché sous vide pendant 30 min puis traité avec une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium concentrée (30 % (v/v)) pendant 4 h à 55 °C. Les groupements protecteurs des bases azotées, les groupes β -cyanoéthyles liés au phosphate et l'oligonucléotide lié au support solide sont ainsi clivés (Figure 64).

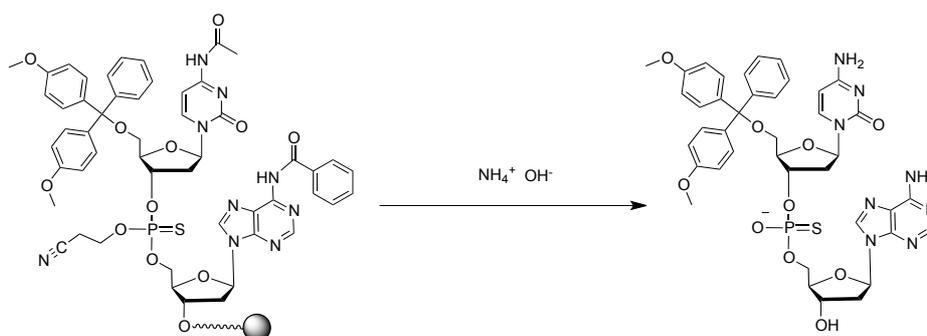


Figure 64 : Exemple de réaction de déprotection d'un oligonucléotide phosphorothioate

Cette déprotection à l'ammoniaque peut entraîner la formation d'adduits non désirés, notamment cyanoéthyliques sur les fonctions réactives des bases azotées (Figure 65).

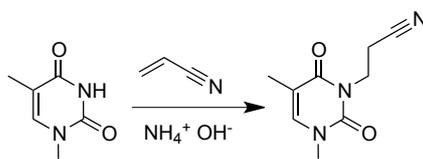


Figure 65 : Exemple de réaction secondaire de la formation d'adduit cyanoéthylé sur une base azotée de type thymidine

Pour limiter ce risque de réaction secondaire, une étape de déprotection des groupements β -cyanoéthyles par la diéthylamine à 20 % (v/v) dans l'ACN anhydre peut être programmée à la fin de la synthèse automatisée, en amont de la réaction de déprotection à l'ammoniaque. Cette étape consiste à incuber pendant 10 min

l'oligonucléotide fixé au support solide avec de la diéthylamine avant rinçage du réacteur pour éliminer les groupements β -cyanoéthyles.

La suspension obtenue contient le support solide et les oligonucléotides en solution. Cette suspension est séchée sous vide et reprise dans de l'eau distillée avant d'être filtrée à 1 μm pour s'affranchir du support solide.

Pour la synthèse des nucléolipide-oligonucléotides, un phosphoramidite amphiphile synthétisé au laboratoire a été utilisé pour le dernier couplage (Figure 66).

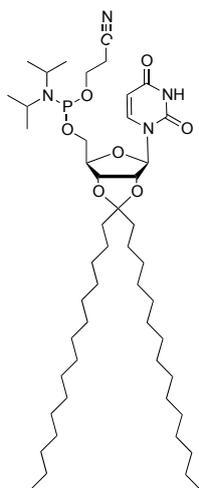


Figure 66 : Structure du phosphoramidite amphiphile synthétisé

La synthèse de l'oligonucléotide amphiphile est identique à celle présentée précédemment à l'exception d'un couplage supplémentaire en fin de synthèse dans un mélange DCM / ACN (8/2) (Figure 67).

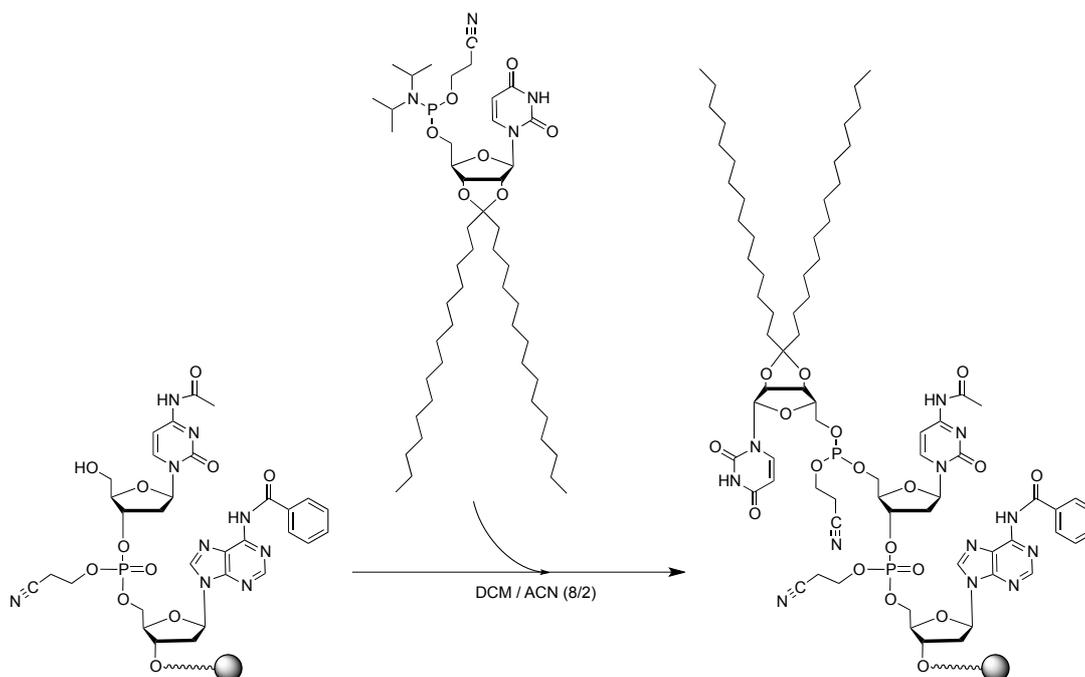


Figure 67 : Réaction de couplage entre l'oligonucléotide et le phosphoramidite nucléolipidique

Un phosphoramidite commercial (Thiol-Modifier C6 S-S CE Phosphoramidite, Link Technologies®, Figure 68) contenant un pont disulfure avec une chaîne de 6 carbones à chaque extrémité a également été couplé entre le nucléolipide et la séquence oligonucléotidique afin de donner une structure similaire à celle présentée en Figure 69. Ce groupement présente l'avantage d'être clivé en condition réductrice.

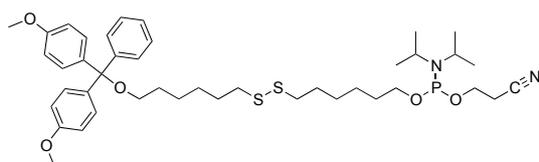


Figure 68 : Structure du Thiol-Modifier C6 S-S CE Phosphoramidite

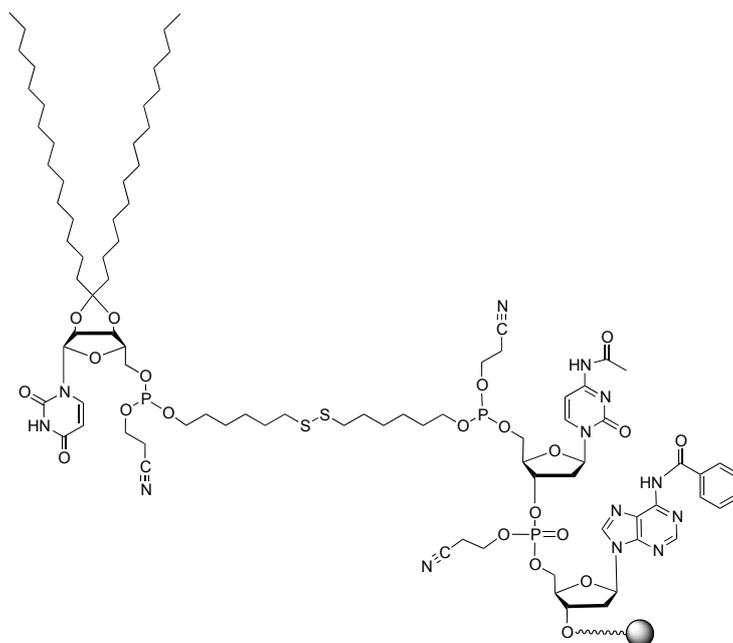


Figure 69 : Structure moléculaire d'un nucléolipide-oligonucléotide amphiphile contenant un pont disulfure

D'un point de vue expérimental, pour une synthèse de 40 μmol sur le système AKTA OP 10, le support contenant la première base à l'extrémité 3' est pesé dans un réacteur d'1,2 mL avec un chargement de 350 $\mu\text{mol/g}$. La pesée est de 114 mg. Le réacteur est ensuite placé sur l'appareil. Les phosphoramidites sont dissous dans l'ACN afin d'obtenir une concentration de 0,1 M. Par exemple, pour un flacon de 2 g de 5'-O-DMT-2'-dA(Bz)-CE Phosphoramidite de masse moléculaire égale à 857,93 g/mol, 23,3 mL d'ACN sont nécessaires afin de dissoudre le phosphoramidite à la concentration désirée. Il en est de même pour les 3 phosphoramidites contenant les autres bases azotées (T, C et G). Une fois que les flacons de phosphoramidites et de réactifs sont placés sur l'appareil, la méthode est créée sur le logiciel Unicorn® (GE Healthcare, États-Unis) avant le lancement de la synthèse.

La synthèse est programmée dans le but d'avoir 4 équivalents de phosphoramidites par couplage. Ainsi, pour une synthèse de 40 μmol , 160 μmol de phosphoramidites sont injectés automatiquement dans le réacteur. Le récapitulatif des volumes utilisés pour une synthèse de 40 μmol est présenté dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulatif des volumes utilisés lors d'une synthèse de 40 μ mol d'un oligonucléotide de 21 bases sur le système AKTA OP 10

Réactif	Volume requis/tour de cycle	Volume recommandé pour 5 bases	Volume recommandé pour la synthèse
Phosphoramidite A, 0,1 M	1,6 mL	8 mL	
Phosphoramidite C, 0,1 M	1,6 mL	8 mL	
Phosphoramidite G, 0,1 M	1,6 mL	8 mL	
Phosphoramidite T, 0,1 M	1,6 mL	8 mL	
ACN	\approx 60 mL		< 1200 mL
Réactif de détritylation	\approx 30 mL		< 600 mL
Réactif de <i>Capping</i> A	3 VC		\approx 72 mL
Réactif de <i>Capping</i> B	3 VC		\approx 72 mL
Réactif d'oxydation	3 VC		\approx 72 mL
Activateur (0,3 M de ETT)	1 VC		\approx 24 mL

VC : Volume colonne ; ETT : 5-(Ethylthio)-1H-tetrazole ; ACN : Acétonitrile

Lorsque les oligonucléotides synthétisés comportent des liens phosphorothioates, il faut ajouter un réactif supplémentaire composé de DDTT dissous dans un mélange pyridine / ACN (6/4). 2 g de DDTT sont dissous dans 120 mL de pyridine et 80 mL d'ACN pour obtenir une concentration finale de 0,05 M.

Lors de la synthèse du nucléolipide-oligonucléotide, le phosphoramidite amphiphile est ajouté sur l'appareil par ouverture d'une voie supplémentaire. Ce phosphoramidite particulier est dissous dans un mélange DCM / ACN (8/2) afin d'obtenir une solution de concentration 0,1 M. La dernière étape du cycle consistera à ajouter ce nucléolipide à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. Le couplage est réalisé avec 3 équivalents, recyclés une fois dans le réacteur avant d'être éliminés.

La conjugaison du nucléolipide à l'extrémité 3' est réalisée avec des phosphoramidites modifiés contenant le groupement DMT en position 3' et le groupement *N,N*-diisopropyle en position 5' (Figure 70). Ainsi, la synthèse est réalisée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' suivant le même cycle présenté précédemment.

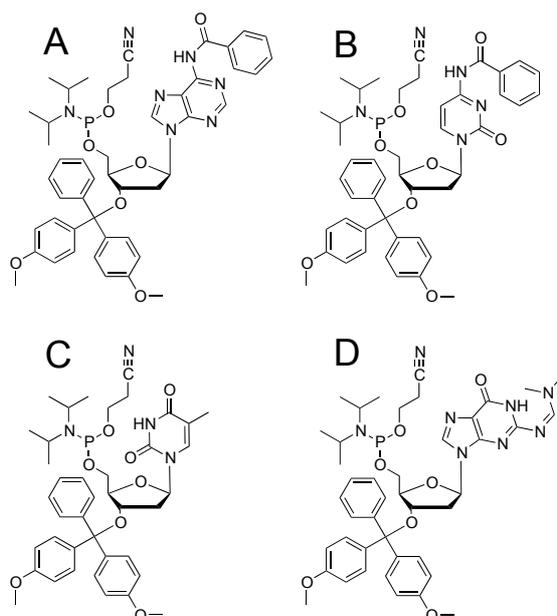


Figure 70 : Structure des phosphoramidites utilisés pour la synthèse 5' → 3'

A : Bz-dA-5'-CE Phosphoramidite ; B : Bz-dC-5'-CE Phosphoramidite ; C : dT-5'-CE Phosphoramidite ; D : dmf-dG-5'-CE Phosphoramidite. Les phosphoramidites sont commercialisés par Link Technologies®.

Les synthèses ont été réalisées sur deux appareils distincts suivant la quantité d'oligonucléotides nécessaire. En effet, lors de la sélection de la séquence active pour l'inhibition d'une cible, une vingtaine d'oligonucléotides sont synthétisés. L'inhibition de la cible *in vitro* est évaluée par ces différentes séquences. La quantité nécessaire est inférieure à 1 μmol et la synthèse est réalisée sur le synthétiseur H8. Le tableau 2 compare le fonctionnement des deux synthétiseurs d'oligonucléotides.

Tableau 2 : Comparatif de deux synthétiseurs d'oligonucléotides

	AKTA OP10	H8
Support solide	Polystyrène	CPG
Réactif de détritylation	DCA 3 % (v/v) dans le toluène	TCA 3 % dans DCM
Réactif de <i>Capping</i> A	<i>N</i> -méthylimidazole 20 %	Anhydride acétique 10 % dans le THF
Réactif de <i>Capping</i> B	Anhydride acétique 20% + 2,6-lutidine 30% dans ACN	<i>N</i> -méthylimidazole 10 % 10 % pyridine ; 80 % THF
Réactif d'oxydation	50 mM iode, 10% eau, 90% Pyridine	20 mM iode, 10 % eau, 0,4% pyridine, 89,6 % THF
Activateur	0,3 M d'ETT	0,25 M de BTT dans ACN
ACN	< 30 ppm d'eau	< 30 ppm d'eau
Réactif de thiolation	DDTT 60 % pyridine ; 40 % d'ACN	DDTT 60 % pyridine ; 40 % d'ACN
Nombre d'équivalents de phosphoramidite	4	8
Nombre d'équivalents de phosphoramidite nucléolipide	3	20
Temps de couplage	2,5 min	2,0 min

B. Chromatographie des oligonucléotides

1. Analyse chromatographique

Le profil chromatographique des oligonucléotides synthétisés renseigne sur la pureté de la synthèse. Le contrôle de chaque séquence est réalisé en chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur un système Elite LaChrom™ (VWR®) avec un détecteur à barrette de diodes (détection à 260 nm). Une colonne hydrophobe Xbridge™ oligonucleotide BEH C₁₈ de taille de particules de 2,5 µm de diamètre, de porosité 130 Å et de géométrie 4,6 x 50 mm (Waters®) est utilisée pour les oligonucléotides non lipidiques (ASO et Scr). La colonne est équilibrée pendant 30 min en solution A (100 mM d'acétate de tri-éthyle ammonium (TEAA) en phase aqueuse pH 7 ; 5 % en volume d'ACN) avec un débit de 2,8 mL/min. L'analyse est effectuée avec un gradient allant de 100 % à 70 % de solution A en 10 min. La phase mobile B est composée de 20 mM de TEAA en phase aqueuse et 80 % en volume d'ACN. Le plateau à 70 % de solution A est effectué pendant 2 min avant d'équilibrer la colonne avec 100 % de solution A (Tableau 3).

Tableau 3 : Gradient chromatographique pour l'analyse des ASO

Temps (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	100	0
10	70	30
12	70	30
14	100	0
15	100	0

L'analyse des oligonucléotides nucléolipidiques (LASO, LScr) est réalisée de manière similaire. La colonne utilisée est une Nucléosil® C₄ de taille de particules de 5 µm de diamètre, de porosité 300 Å et de géométrie 4 x 250 mm (Macherey Nagel). La colonne est équilibrée également en solution A à un débit de 1 mL/min. L'analyse est effectuée selon un gradient de 100 % à 0 % de solution A en 10 min, puis de 2 min de plateau avant équilibration avec 100 % de solution A (Tableau 4).

Tableau 4 : Gradient chromatographique pour l'analyse des LASO

Temps (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	100	0
10	0	100
12	0	100
14	100	0
15	100	0

2. Purification des oligonucléotides

L'étape de purification dépend de la nature de l'oligonucléotide synthétisé, des modifications chimiques utilisées et de l'échelle de synthèse. Les synthèses non nucléolipidiques ASO et Scr, inférieures ou égales à 1 µmol sont purifiées sur une colonne Nucléodur® C₁₈ ec de géométrie 250 x 10 mm, de taille de particules de 7 µm de diamètre et de porosité 100 Å (Macherey Nagel), tandis que les LASO sont purifiés sur une colonne Nucléosil® C₄ de géométrie 250 x 10 mm, de taille de particules de 5 µm de diamètre et de porosité 120 Å (Macherey Nagel). Les purifications sont réalisées à un débit fixe de 5 mL/min avec les mêmes gradients que pour l'analyse chromatographique (Chapitre VI B 1 ; Tableau 5).

Pour les échelles de synthèse supérieures, la purification est réalisée sur un système chromatographique Waters composé d'une pompe Waters® 2545 *Binary gradient module*, d'un injecteur Waters® FlexInject™, d'un détecteur Waters® 2489 UV/Visible et d'un collecteur de fraction Waters® *Fraction Collector III*. La colonne chromatographique utilisée est une XBridge™ Protein BEH C₄ OBD™ Prep de géométrie 30 x 50 mm contenant des tailles de particules de 5 µm de diamètre et de porosité 300 Å (Waters®).

Le système est piloté par le logiciel ChromScope™. Le débit utilisé est de 56,25 mL/min, le volume d'injection est de 5 mL et la durée d'analyse de 4 min avec 1 min d'équilibration. Les phases mobiles sont identiques à celles utilisées lors de l'analyse (Chapitre VI B 1). Après avoir déterminé les paramètres de séparation analytique, le transfert de méthode permet de purifier des quantités de l'ordre de 400 mg d'oligonucléotide en moins de 5 min (Tableau 5, Figure 71).

Tableau 5 : Gradient HPLC préparative pour la purification des LASO

Temps (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	100	0
2	0	100
3	0	100
3,2	100	0
4	100	0

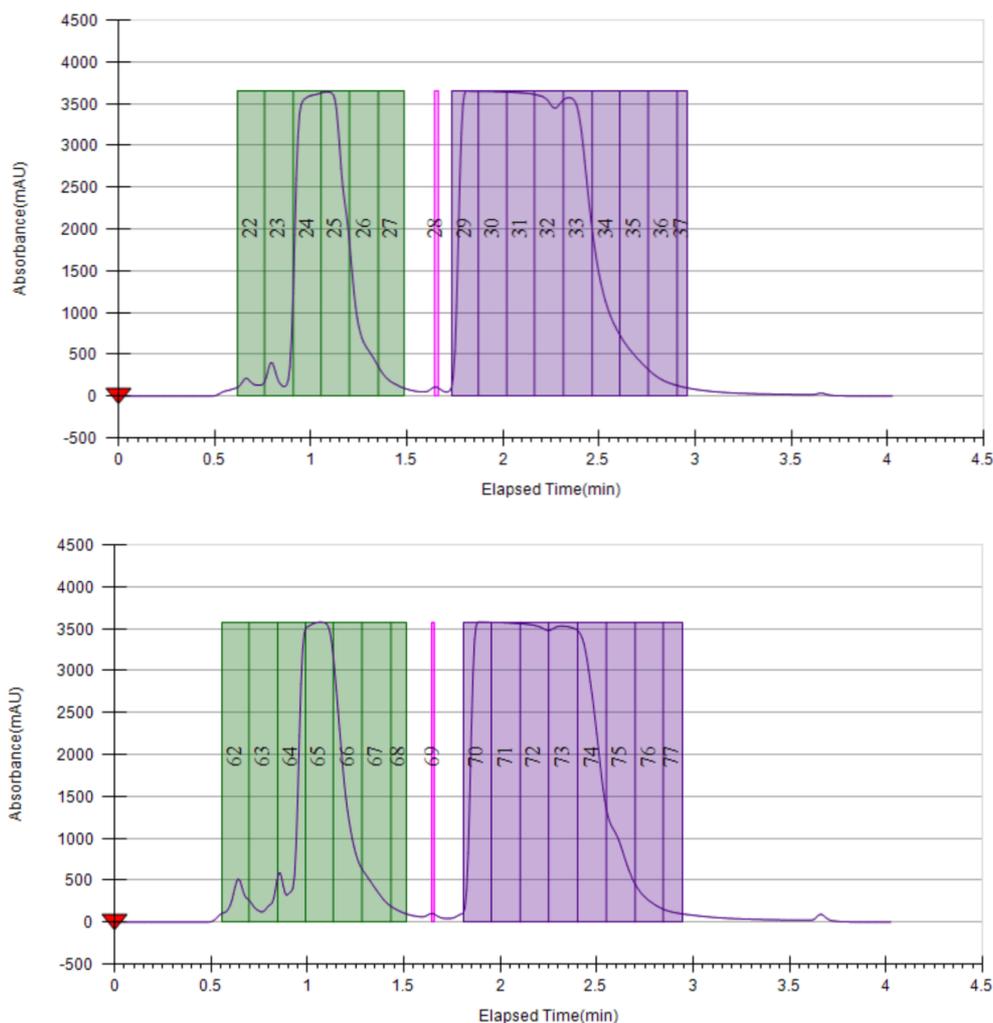


Figure 71 : Chromatogrammes de purification des conjugués nucléolipide-oligonucléotides LASO (haut) et le contrôle nucléolipidique LScr (bas)

Le premier pic correspond aux oligonucléotides non conjugués. Les fractions récupérées sont représentées en vert. Le second pic, représenté en violet, correspond aux oligonucléotides conjugués au nucléolipide. Volume d'injection : 5 mL ; Débit : 56,25 mL/min ; Détection : 260 nm ; Méthode de collection par seuil (100 mAU).

3. Dessalage des échantillons

Les contre-ions des charges négatives des phosphates de l'oligonucléotide sont changés en ions ammonium lors de la phase de déprotection et en tri-éthyle ammonium lors de la purification. Ces contre-ions n'étant pas compatibles avec le vivant, il est nécessaire de dessaler les échantillons afin de conserver les propriétés physico-chimiques des oligonucléotides similaires aux conditions physiologiques. Avant le dessalage, les contre-ions de l'oligonucléotide sont échangés par compétition avec une solution aqueuse de NaCl à 0,9 % en masse ajoutée et incubée avec le mélange avant dessalage. De plus, les systèmes utilisés permettent de s'affranchir des résidus de déprotection lors de la synthèse, des sels de triéthyle ammonium utilisés pour la

rétention de l'oligonucléotide sur les colonnes chromatographiques mais aussi de l'excès de NaCl ajouté. Ainsi, deux systèmes de dessalage peuvent être utilisés.

Pour des quantités de matières inférieures à 1 μmol après purification, un système d'ultrafiltration est préféré à un système de dialyse. En effet, la capacité de dessalage des colonnes Vivaspin® Turbo 4 (Sartorius) et le nombre d'échantillons dessalés simultanément fait de cette technique une méthode de choix. La membrane est tout d'abord rincée avec de l'eau distillée, puis jusqu'à 4 mL d'échantillons sont ajoutés dans le système d'ultrafiltration avant d'être centrifugés à 3000 g pendant 30 min. Trois rinçages sont effectués par ajout de 3 mL d'eau distillée pour chaque lavage. 500 μL d'eau distillée sont ajoutés sur la membrane afin de remettre en suspension et récupérer l'oligonucléotide. La membrane est ensuite rincée 2 fois avec 500 μL d'eau distillée limitant les pertes par colmatage.

Pour les synthèses de plus grande échelle, la dialyse permet de dessaler les échantillons sans risque de colmatage. Une membrane de porosité égale à 2 kDa, de diamètre 24 mm et de longueur variable, en fonction du volume à dialyser, est tout d'abord rincée avec de l'eau distillée avant utilisation (Spectra /Por® 6 Dialysis membrane Pre-wetted RC tubing, Spectrum®). L'échantillon est ensuite introduit dans la membrane puis l'ensemble est fermé par des pinces à dialyse (Spectrum®). Le boudin de dialyse est plongé dans un volume d'eau distillée 100 fois supérieur et est laissé 1 h sous agitation, jusqu'à équilibre des sels de part et d'autre de la membrane. Ce protocole est réalisé 3 fois en changeant l'eau de dialyse pour éliminer majoritairement les sels. La concentration en oligonucléotides reste inchangée dans la membrane tandis que les sels ont subi une dilution d'un facteur 10^8 .

4. Contrôle de la masse des oligonucléotides par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse MALDI ont été réalisées sur un spectromètre MALDI-ToF-ToF (pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* en anglais) (Ultraflex III™, Bruker Daltonics) équipé d'un laser Smartbeam (Nd:YAG 355nm). Les mesures ont été effectuées en mode linéaire positif avec une calibration externe dans la gamme de masse comprise entre 4000 et 10000 m/z. Les paramètres instrumentaux sont les suivants : Ion source 1 25 kV, Ion source 2 23,45 kV, Lens 6 kV, Pulsed Ion Extraction 100 ns et la fréquence du laser est 100 Hz.

Les échantillons d'oligonucléotides sont dilués dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 20 à 50 μM , puis sont mélangés à une solution de la matrice 2,4,6-trihydroxyacétophénone (2,4,6-THAP). Cette dernière est préparée à une concentration de 20 mg/mL dans un mélange eau distillée/ACN (50/50) avec 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique.

Les oligonucléotides sont analysés sous la forme d'ions monochargés $[\text{M}+\text{H}]^+$ et parfois sous la forme d'ions $[\text{M}+\text{Na}]^+$ lorsqu'il y a un adduit de cation sodium. Les masses mesurées correspondent aux masses moyennes des composés.

5. Lyophilisation des échantillons

Les échantillons dessalés sont congelés à l'azote liquide avant d'être introduits dans un lyophilisateur Labconco™ FreezeZone™. Ils sont lyophilisés pendant une durée de 12 h à une température de $-49\text{ }^\circ\text{C}$ sous un vide de 0,250 mbar.

C. Détermination de la stabilité chimique du LASO SS en condition réductrice

100 μM d'oligonucléotides nucléolipidiques comprenant un pont disulfure (LASO SS) sont incubés pendant 12 h à $37\text{ }^\circ\text{C}$ en présence d'une concentration croissante de DTT de 1 mM à 1 M, dans un volume final de 30 μL de PBS. L'analyse du clivage est évaluée en HPLC par comparaison des aires sous la courbe du pic du LASO SS à celui correspondant à l'oligonucléotide dégradé ASO SH.

D. Détermination de la formation d'objet spontanée en milieux aqueux

1. Conductimétrie des nucléolipide-oligonucléotides dans l'eau distillée

Les valeurs de conductance sont mesurées par un conductimètre CDM210 équipé d'une microsonde RADIOMETER™. La sonde est placée dans un bécher contenant 5 mL d'eau distillée sous agitation. Chaque mesure est enregistrée après ajout successif de 5 μL d'une solution de nucléolipide-oligonucléotides à 3,88 mM. L'expérience est réalisée en triplicat. Les valeurs sont collectées et analysées sur Microsoft® Excel™. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R™.

2. Analyse par tensiométrie de surface

Le caractère amphiphile des molécules oligonucléotidiques est évalué par un tensiomètre de surface DCAT21 (DataPhysics®) par la méthode de Wilhelmy. Les mesures sont réalisées après ajout successif de 15 µL de LASO dans 15 mL d'eau distillée ou de PBS 1X et agitation pendant 10 s, puis une phase de repos de 30 s. L'expérience est réalisée à 21 °C, avec une lame de Wilhelmy composée de platine et traitée à l'iridium de 19,9 mm de longueur, 10 mm de hauteur et 0,2 mm d'épaisseur. L'immersion de la lame dans le liquide est de 3 mm pour les mesures. Chaque point enregistré est une moyenne des 50 dernières mesures possédant une variation d'amplitude inférieure à 0,01 mN/m. Les valeurs sont enregistrées pour des concentrations en oligonucléotides variant de 0 à 150 µM en 40 points sur une échelle linéaire.

E. Analyse des nano-objets par Diffusion Dynamique de la Lumière

La diffusion dynamique de la lumière (pour *Diffusion Light Scattering* en anglais) est une méthode basée sur la mesure du rayon hydrodynamique d'une particule par suivi de son mouvement brownien. Connaissant différents paramètres comme la température, la viscosité, l'indice de réfraction du matériau etc., l'algorithme permet de calculer une distribution de taille des particules solvatées au moyen de la relation de Stokes-Einstein. La technologie NIBS (Rétrodiffusion non-invasive) permet d'améliorer la sensibilité de détection de taille par mesure du signal à 173 °. Les mesures ont été réalisées dans un volume final de 400 µL à une température de 25 °C dans des microcuves en polystyrène de 2 mL (LP Italiana SPA) ou dans un volume de 40 µL dans des microcuves ZEN0040 (Malvern Instrument) sur un appareil NanoSizer ZS™ contrôlé par le logiciel Zetasizer Software® (Malvern Instrument).

F. Détermination des assemblages supramoléculaires par microscopie électronique à transmission

10 µL de produits sont déposés sur une grille de microscopie en cuivre recouverte d'un film de carbone (Delta microscopie, France) pendant 2 min avant d'enlever le surplus par capillarité avec un papier absorbant de type Kimtech®. La grille est séchée à l'air libre pendant 10 min avant d'être éventuellement contrastée 2 min avec une solution d'acétate d'uranyle (coloration négative) filtrée à 0,22 µm ou avec des vapeurs d'oxyde de ruthénium pendant 5 min. L'observation est réalisée sur un microscope de 120 kV Hitachi H7650 équipé d'une caméra SC1000 ORIUS®

11 Mégapixels (GATAN). Les images sont traitées et analysées sur le logiciel Digital Micrograph™ (GATAN).

L'EDX (Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie) est réalisée sur un microscope électronique à transmission TECNAI couplé à un détecteur Quantax-X-Flash® SVE 6. Cette technique permet de déterminer les éléments qui composent le matériau observé.

G. Analyse du potentiel Zêta par Électrophorèse Laser Doppler

L'électrophorèse Laser Doppler est une technique de mesure du potentiel Zêta. Un champ électrique est appliqué à la solution contenant les nanoparticules, qui se déplacent à une vitesse liée à leur potentiel Zêta. Cette vitesse est mesurée au moyen d'un procédé d'interférométrie laser (*Phase analysis light scattering*) et permet de calculer la mobilité électrophorétique des particules en solution, leur potentiel zêta et leur distribution. Toutes les mesures sont réalisées dans des cellules à capillaires repliés sur l'appareil NanoSizer ZS® (Malvern Instrument).

H. Étude de la stabilité thermique des oligonucléotides

L'hybridation des duplexes entre les oligonucléotides et leurs séquences complémentaires est évaluée selon la séquence et la chimie utilisée de chacun des deux brins. L'oligonucléotide d'intérêt (ASO-TCTP : 5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3') est mélangé à sa séquence complémentaire à une concentration de 2,5 µM dans du PBS exempt de nucléases (volume final de 2,5 mL). Les cuves en quartz contenant ces solutions sont placées dans un spectrophotomètre (Cary UV/Vis spectrophotomètre, Agilent Technologies™) contenant un support multicuve thermostaté par effet Peltier permettant ainsi de réguler précisément la température. Le trajet optique lors de la mesure est de 1 cm. La température varie de 10 à 80 °C avec une vitesse de chauffage et de refroidissement de 0,1 °C/min. Une mesure est réalisée pour chaque cuve toute les 5 min. De plus, différentes combinaisons ont été étudiées selon la modification chimique du brin antisens et du brin complémentaire (Tableau 6).

Tableau 6 : Liste des séquences étudiées pour la stabilité thermique des duplexes

U₂*C₁₅ : Nucléolipide conjugué ; PO : Phosphodiester ; PTO : Phosphorothioate ; 2'-OMe : modification par ajout d'un groupement méthyle en position 2' ; 2'-O-MOE : modification par ajout d'un groupement méthoxyéthyle en position 2' ; 2'-F : modification de l'alcool secondaire en position 2' par un Fluor sur les pyrimidines

Séquences	Chimie	Séquences complémentaires	Chimie
5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN PO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN PTO	5' TCA CCT GCA GGA AAC AAG TT 3'	ADN PTO
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN PTO	5' TCA CCT GCA GGA AAC AAG TT 3'	ADN PTO
5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN 2'-OMe	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN 2'-OMe/2'-F	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN 2'-OMe/PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN 2'-OMe/2'-F PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' U ₂ *C ₁₅ AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3'	ADN 2'-O-MOE/PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN
5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA U ₂ *C ₁₅ 3'	ADN PTO	5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'	ARN

La dénaturation du duplexe ou de l'hétéroduplexe est visualisée par absorbance à 260 nm par hyperchromicité (ou effet hyperchrome). Lorsque les deux brins d'acide nucléique se désappariaient en fonction de la température, l'absorbance augmente de façon significative. Ces résultats sont analysés par le logiciel SigmaPlot™.

I. Étude in vitro

1. Conditions de culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées lors de cette étude sont des cellules de cancer de la prostate androgène-indépendant provenant de l'ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD). Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco®) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal, et incubées à 37 °C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

2. Étude de transfection

Les cellules PC-3 sont cultivées en boîte de culture p100 (Nunclon™) à 10⁶ cellules par boîte, et transfectées 2 fois (24 et 48 h après adhérence) avec 100 nM d'ASO ou de LASO. La transfection s'effectue dans du milieu Opti-MEM™ (Gibco®) en absence de sérum, avec 3 mg/mL d'oligofectamine™ (Invitrogen™) pour les ASO et Scr et sans oligofectamine™ pour les nucléolipide-oligonucléotides LASO et LScr. Le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet après 4 h d'incubation.

L'efficacité de transfection est évaluée en utilisant un oligonucléotide marqué par un fluorophore (6-FAM à l'extrémité 3') sur le ASO et le LASO. Les cellules PC-3 sont transfectées avec ces oligonucléotides fluorescents (avec ou sans oligofectamine™), puis les cellules sont trypsinées à différents temps afin d'évaluer l'efficacité de transfection

par mesure en cytométrie en flux dans des tubes contenant 0,5 mL de milieu complet. Chaque expérience compte 10^5 cellules par condition et est réalisée en triplicat. L'intensité de fluorescence est déterminée en cytométrie en flux (Canto Becton Dickinson®) et les données sont analysées par le logiciel FlowJo™.

En parallèle, les cellules sont cultivées avec les mêmes conditions sur des lames Lab-Tek II™ avec chambres de cultures (Nunc™-Thermo Scientific™). Une journée avant la transfection, 8×10^4 cellules sont incubées dans chaque chambre des plaques Lab-Tek II. Les cellules sont transfectées par des oligonucléotides, nucléolipidiques ou non, marquées par un fluorophore (6-FAM) à l'extrémité 3'. Les cellules sont ensuite lavées au PBS à différents temps d'incubation, puis fixées avec 4 % de paraformaldéhyde pendant 15 min à 4 °C, et montées dans un milieu Prolong Gold contenant le marqueur de noyau DAPI™ (Life Technologies™). La visualisation est effectuée sur un microscope inversé à fluorescence Zeiss® LSM 520 META, avec les filtres d'excitation à 405 et 488 nm.

3. Viabilité Cellulaire

La méthode de réduction du composé bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT en un composé de couleur violette (formazan) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes permet d'évaluer la viabilité cellulaire de la culture. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 12 puits à $3 \cdot 10^4$ cellules par puits et transfectées le lendemain avec les ASO ou LASO comme décrit précédemment. Après 48 h, le MTT est ajouté dans chaque puit (1 mg/mL final), puis les plaques sont mises à incubées 2 h à 37 °C, 5 % CO₂. Le surnageant est ensuite enlevé pour dissoudre les cristaux de formazan contenus dans les mitochondries des cellules vivantes à l'aide de DMSO. L'absorbance de ce composé est ensuite évaluée par un lecteur de microplaque en absorbance Sunrise™ (Tecan) à 595 nm. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par comparaison entre les cellules traitées et les cellules contrôles (non traitées).

4. Évaluation de la synthèse protéique par Western Blot

Les cellules PC-3 sont transfectées avec les oligonucléotides 72 h avant l'analyse protéique puis lysées dans un tampon (solution aqueuse de 1 % de Triton 100 X, 50 mM d'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), 150 mM de NaCl, 25 mM de NaF, 1 mM d'EGTA (ou acide éthylène glycol tetraacétique), 10 µM de

ZnCl₂ et 1 mM d'orthovanadate de sodium) contenant 4 % d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche®) pendant 30 min à 4 °C. Le lysat est ensuite centrifugé à 21 000 g pendant 60 min et les protéines sont quantifiées avec un kit *BCA protein assay* (Pierce®). 40 µg de protéine de chaque échantillon sont mélangés avec le tampon de Laemmli et sont déposés dans un gel d'électrophorèse de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) à 12 % puis transférés sur une membrane PVDF (Millipore™), qui est préalablement bloquée avec 5 % (m/v) de lait écrémé dans du tampon Tris. L'immunodétection s'effectue à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-TCTP de lapin ainsi que d'anticorps polyclonaux anti-GAPDH de lapin (Abcam®) dilués 2 500 fois dans 0,5 % de lait écrémé dans du TBS. Les membranes sont incubées une nuit à 4 °C avant d'être révélées par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (Santa-cruz®) par incubation à la dilution 1/5000 1 h à température ambiante. Les bandes des protéines spécifiques sont détectées en utilisant un substrat de transfert de Western Blot augmentant la chimiluminescence (Pierce®) et développées sur un film Amersham™ Hyperfilm™ ECL™ (GE healthcare®).

J. Études du mécanisme d'action du LASO

La sélectivité de la RNase H pour le duplexe ADN/ARN est évaluée et visualisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'activité du ASO dans la reconnaissance du duplexe ADN / ARN vis-à-vis de l'enzyme RNase H a été évaluée *in vitro*. La séquence d'ARN synthétisée a été sélectionnée en fonction de la séquence d'ARNm humaine codant pour la cible TCTP étudiée. La séquence, composée de 34 nucléotides, permet d'avoir une extension de sept nucléotides aux extrémités 5' et 3' de l'ARN par rapport à l'hybridation du ASO.

Ainsi, 20 µM d'ARN cible (5' uga acc auc acc ugc agg aaa caa guu uca caa a 3'), 2,2 µL d'une dilution au 1/10° de RNase H commerciale (New England BioLabs®) dans le tampon de réaction 1 X (20 U/mL) et 40 µM du ASO (5' AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA 3') ont été incubés 24 h dans un volume final de 55 µL avant inactivation de l'enzyme à 65 °C pendant 20 min. L'activité de la RNase H a été mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 20 %.

Le gel de polyacrylamide est polymérisé avec 0,1 % de persulfate d'ammonium et 0,01 % de Tetra Méthyle Éthylène Diamine. La révélation est effectuée par un bain de *stains all* (Sigma-Aldrich®) de 5 min avant décoloration dans de l'eau. Le contrôle négatif

ARN seul et le contrôle positif ASO PO + ARN sont comparés aux échantillons ARN + RNase H, ainsi que les combinaisons ASO PTO + ARN, LASO PTO + ARN, LASO 2'-OMe ADN + ARN, LASO 2'-OMe/2'-F ADN + ARN, LASO 2'-OMe PTO + ARN, LASO 2'-OMe/2'-F PTO + ARN.

K. Étude in vivo

Les animaux utilisés pour les études sont des souris mâles Swiss nude de 4 semaines (Nu/Nu; Charles River Laboratories) entretenues à l'animalerie du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM). Toutes les procédures et expérimentations animales ont été réalisées en accord avec les protocoles approuvés par la loi française, suivant les directives européennes, et avec la certification appropriée.

1. Traitement des animaux par les oligonucléotides

100 µL de milieu de culture complet contenant 10^7 cellules PC-3 sont injectés par voie sous-cutanée dans le flanc droit des animaux (n=30). Après deux semaines, la tumeur développée est visible. Les souris sont réparties aléatoirement en 4 groupes de traitement : l'ASO anti-TCTP (n=8), l'oligonucléotide contrôle Scr (n=7), le LASO anti-TCTP (n=8), le nucléolipide-oligonucléotide contrôle LScr (n=7). Lors de la première semaine, chaque individu reçoit de manière journalière une injection intra-péritonéale de l'oligonucléotide approprié à une dose de 10 mg/kg. Les semaines suivantes, 3 injections par semaine sont réalisées. La durée du traitement est de 11 semaines.

Toutes les souris sont examinées en routine afin de déterminer des signes de toxicité systémique ainsi que d'enregistrer leur poids. La taille des tumeurs est relevée hebdomadairement avec un pied à coulisse sur les 3 dimensions. Le volume tumoral est exprimé en mm³. À la fin du traitement, le sang et les urines sont collectés pour l'analyse des paramètres biochimiques.

2. Analyses biochimiques

Les échantillons de sang sont maintenus 4 h à température ambiante avant centrifugation à 100 g pendant 30 min pour collecter et analyser le sérum. Cette analyse est réalisée par un laboratoire indépendant (Charles River®) et comprend le dosage de l'alanine aminotransférase (ALT), de l'aspartate aminotransférase (AST) et de la créatinine. L'analyse urinaire consiste à déterminer la présence de protéines, de glucose,

de leucocytes, de nitrites, de cétones, de corps cétoniques, de sang, et aussi du pH. Ces analyses sont réalisées à l'aide de bandelettes Multistix™ 8SG (Siemens®).

3. Analyses statistiques

L'intensité des bandes sur gel d'électrophorèse est mesurée par le logiciel ImageJ™ (NIH). L'analyse statistique est effectuée par le programme GraphPad Prism™ (GraphPad Software, San Diego, USA). Toutes les données sont moyennées \pm l'écart type. Les différences significatives sont évaluées par des tests t de Student bilatéral. Les conditions sont significativement différentes et notées * si $p \leq 0,05$, ** si $p \leq 0,01$ et *** si $p \leq 0,001$.

L. Formulation de LASO/Dérivé de phénazine

200 μ L d'une solution mère de 5 mg/mL de dérivé de phénazine dans du chloroforme sont ajoutés dans un tube en verre et évaporés sous agitation à l'aide d'un flux d'azote. Le tube est ensuite placé sous vide afin d'évaporer les éventuelles traces de solvant organique. Le film hydrophobe ainsi créé est réhydraté par 1 mL d'une solution d'oligonucléotide (lipidique ou non) à 170 μ M au goutte-à-goutte sous agitation rapide. Deux étapes de sonication au bain à ultrasons (Fisherbrand™ FB-11205) de 15 min sont nécessaires afin d'améliorer l'homogénéisation de la suspension nanoparticulaire. La solution est ensuite filtrée à 1 μ m (Chromafil® Xtra GF-100/13, Macherey Nagel) afin de s'affranchir des éventuels agrégats de dérivé de phénazine non encapsulés. La formulation de rapport de charges N/P est égale à 1, où N représente les charges positives et P les charges négatives. Cette formulation est caractérisée par DLS, MET et zétamètre.

Le dosage de la substance active encapsulée est réalisé par déstabilisation du complexe dans une solution aqueuse de NaCl à une concentration saturante puis par extraction liquide/liquide par le chloroforme. La phase aqueuse est extraite 5 fois avec du chloroforme afin de séparer les oligonucléotides dans la phase aqueuse et les molécules hydrophobes (dérivé de phénazine) dans la phase organique. Ces deux phases sont évaporées sous pression réduite et le solide résultant est remis en solution (eau distillée ou chloroforme pour les oligonucléotides et le dérivé de phénazine respectivement) dans un volume final de 600 μ L. Le dérivé de phénazine est dosé par spectrophotométrie visible à 425 nm selon une gamme d'étalonnage réalisée précédemment d'équation

$y = 0,00725182x + 0,00898361$ et de coefficient de détermination $R^2 = 0,9987$. La phase aqueuse est dosée par spectrophotométrie UV à 260 nm en utilisant le coefficient d'absorption molaire de l'oligonucléotide étudié.

M. Formulation de LASO/Doxorubicine

Les formulations de type SNALP (pour *Stable Nucleic Acid-Lipid Particles* en anglais) ont été réalisées par précipitation simultanée d'une solution de 200 nmol de doxorubicine dispersées dans 500 µL de MeOH ainsi que 500 µL d'une solution de LASO anti-TCTP à 20 µM. Le solvant organique a été partiellement évaporé sous pression réduite, à une température de 37 °C, puis ajusté à un volume de 1 mL avec de l'eau distillée. L'ensemble est passé dans un bain à ultrasons Fisherbrand™ FB-11205 à 37 kHz et à 37 °C, 3 fois pendant 15 min. Les propriétés de tailles et de charges de surface sont évaluées par DLS, MET et zétamètre.

N. Formulation Nucléolipide / Sorafénib

100 µL d'une solution mère à 10 mg/mL de sorafénib sont ajoutés à 100 µL d'une solution mère de nucléolipides à 10 mg/mL. Le mélange est ajusté à 1 mL avant d'être nanoprecipité au goutte-à-goutte par diffusion de solvant dans 10 mL d'eau distillée. Le mélange est ensuite plongé dans un bain à ultrason (Fisherbrand™ FB-11205) à 25 °C, 37 kHz pendant 3 cycles de 30 min avant d'être concentré sous vide jusqu'à obtenir 1 mL de solution. Ce volume est ensuite ajusté dans une fiole jaugée de 2,0 mL avec de l'eau distillée. Deux étapes de sonication de 10 min avec 100 % d'amplitude sur un sonicateur Vibra-cell™ 75186 (pulse de 2 s toutes les 5 s) sont effectuées afin d'obtenir des particules de taille sub-micrométriques monodisperses. Une caractérisation en DLS est effectuée à chaque étape de la formulation ainsi qu'un dosage en HPLC. Ceci permet de connaître l'évolution de la taille et de la polydispersité des particules formées ainsi que les pertes de substances actives engendrées par le protocole afin de déterminer un rendement d'encapsulation.

Le dosage est réalisé sur un système chromatographique UHPLC UltiMate™ 3000 de Dionex-Thermo Scientific™. La séparation des composés est réalisée en utilisant une colonne Synchronis™ C₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 µm). Les phases mobiles sont composées de 70 % de méthanol et de 30 % d'une phase aqueuse d'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 7,4 (A) et de 26,5 mM d'acétate d'ammonium à pH 7,9 dans du méthanol (B).

Le débit de la phase mobile est de 0,2 mL/min et le gradient est de 2 min pour passer de 0 à 100 % de B puis d'un plateau de 18 min à 100 % de B. La température est réglée à 25 °C. La détection est réalisée à 267 nm pour le sorafénib et la DiC₁₆dT et 257 nm pour le DOTAU. Le volume d'injection est de 1 µL et la limite de détection est de 0,6 ng pour le sorafénib et de 15 ng pour les nucléolipides DiC₁₆dT et DOTAU.

O. Étude de stabilité colloïdale

Cette étude est réalisée après incubation des nanoparticules étudiées à 4 °C et 37 °C par les mesures des diamètres hydrodynamiques en DLS ainsi que leurs polydispersités. Une expérience d'électrophorèse laser doppler est réalisée sur les nanoparticules dont la charge de surface est non nulle afin d'établir une potentielle déstabilisation du complexe formé par la modification de charges en surface.

P. Protocole de gélification du LASO dans les milieux aqueux

L'hydrogel de LASO a été préparé à des concentrations de 25 % (m/m) dans l'eau distillée et 10 % (m/m) dans le PBS (Gibco®, Life Technologie, Thermo Scientific, France). Pour une solubilisation complète de la molécule dans le milieu, les échantillons ont été chauffés à 55 °C pour l'eau distillée et 70 °C pour le PBS pendant 10 minutes sous une agitation de 800 rpm (Thermomixer® compact, Eppendorf, Etats-Unis). Ils ont ensuite été laissés revenir à température ambiante jusqu'à formation de l'hydrogel. L'état de gel du LASO a été vérifié par le test du retournement du tube et l'absence d'écoulement du matériau.

Q. Étude rhéologique du LASO à 10 % (m/m) dans le PBS

Les expériences de rhéologie ont été réalisées sur le rhéomètre Kinexus® Pro+ (Malvern Instruments, Angleterre). La géométrie inférieure est équipée d'un système de Peltier pour le contrôle de la température tout au long des manipulations. La géométrie supérieure est un cône en acier présentant un angle de 1° (20 mm de diamètre, entrefer 0,029 mm). Pour prévenir toute évaporation de solvant au cours des analyses, une trappe à solvant a été utilisée. Tous les échantillons ont été déposés sous forme liquide, à l'aide d'une micropipette après chauffage à 70 °C, entre les 2 géométries avant analyse. Les expériences ont été réalisées dans le domaine linéaire de visco-élasticité (LVER). Ce dernier a été déterminé par un balayage en amplitude (0,01 % à 100 % en déformation à une fréquence de 1 Hz et une température de 37 °C). Le balayage en fréquence (0,1 à

10 Hz, pourcentage de déformation de 0,03 % dans le LVER) a permis de mesurer les modules élastiques (G') et visqueux (G''). Les expériences de balayage en fréquence ont été effectuées à différentes températures : 25, 37 et 70 °C. Le caractère thixotrope de l'hydrogel a été mis en évidence à 37 °C par la succession de 2 cycles de structuration / déstructuration. Les phases de structuration sont effectuées dans le LVER à un pourcentage de déformation égal à 0,03 % et une fréquence de 1 Hz. Les phases de destruction quant à elles correspondent à un pourcentage de déformation en dehors du LVER (30 %) et une fréquence de 1 Hz. Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicat pour chaque échantillon.

VII. Annexes

Annexe 1 : pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems

CHEMMEDCHEM
CHEMISTRY ENABLING DRUG DISCOVERY

11/2015

10 volume
WILEY-VCH

Cover Picture:
P. Barthélémy et al.
pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm
for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery
Systems
www.chemmedchem.org

A Journal of
ChemPubSoc
Europe



pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems

Khalid Oumzil,^[a] Sébastien Benizri,^[a] Giovanni Tonelli,^[a] Cathy Staedel,^[a] Ananda Appavoo,^[a] Max Chaffanet,^[b] Laurence Navailles,^[c] and Philippe Barthélémy*^[a]

Lipid-based delivery systems are an established technology with considerable clinical acceptance and several applications in human. Herein, we report the design, synthesis and evaluation of novel orthoester nucleoside lipids (ONLs) for the modulation of liposome stability. The ONLs contain head groups with 3'-orthoester nucleoside derivatives featuring positive or negative charges. The insertion of the orthoester function in the NL structures allows the formation of pH-sensitive liposomes. ONL-based liposomes can be hydrolyzed to provide nontoxic products, including nucleoside derivatives and hexadecanol. To allow the release to be tunable at different hydrolysis rates, the charge of the polar head structure is modulated, and the head group can be released at a biologically relevant pH. Crucially, when ONLs are mixed with natural phosphocholine lipids (PC), the resultant liposome evolves toward the formation of a hexadecanol/PC lamellar system. Biological evaluation shows that stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) formulated with ONLs and siRNAs can effectively enter into tumor cells and release their nucleic acid payload in response to an intracellular acidic environment. This results in a much higher antitumor activity than conventional SNALPs. The ability to use pH-cleavable nucleolipids to control the stability of lipid-based delivery systems represents a promising approach for the intracellular delivery of drug cargos.

Programmed site-specific release of therapeutics is emerging as a promising approach to address issues in drug delivery.^[1] Among the various stimuli-responsive options available, micro-environmental pH-sensitive delivery systems have been widely studied for biomedical applications. Indeed, changes in exter-

nal pH can be exploited by pH-responsive systems, which respond to changes in pH through altered physicochemical properties, ensuring the triggered release of the drug payload in an acidic environment. For example, it has been reported that the tumor environment is one pH unit lower than normal tissue.^[2] Larger pH shifts from 7.2–7.4 in the blood to 4.0–6.5 in intracellular compartments such as the endosome can be used to enhance intracellular drug delivery. Numerous efforts have been made to construct pH-responsive smart materials,^[3,4] including lipids,^[5] pH-responsive supramolecular systems,^[6,7] polymers,^[8] liposomes,^[9–11] vesicles, and nanoparticles.^[12] Such a chemical strategy was successfully used to induce the cleavage of poly(ethylene glycol) PEG moieties in the case of stealth vesicles,^[13] or promote the leakage of liposomes^[14] and membrane fusion.^[15,16]

We propose a new approach to the problem of pH control of the fusion properties by exploiting the cleavage of orthoester functions into single-chain fatty alcohols. The insertion of single-chain amphiphiles in phospholipid formulations is known to promote liposome destabilization.^[17] Herein we report pH-cleavable orthoester nucleoside lipids^[18–20] (ONLs) that generate hexadecanol in the bilayers, resulting in destabilization of vesicles under weak acidic conditions. ONLs consist of dialkyl orthoester chains attached to the 3'-secondary hydroxy group of 2'-desoxythymidine and charged or neutral hydrophilic moieties linked to the 5'-position of the nucleoside. Figure 1 depicts the pH-sensitive nucleoside-based lipids investigated in this study. To the best of our knowledge, there are no previous examples of pH-cleavable lipids promoting liposome destabilization via the production in situ of fatty alcohol.

We hypothesized that a covalent association between the nucleoside and fatty alcohols via orthoester functions could lead to pH-sensitive lipids suitable for biomedical applications, including pH-responsive prodrugs and drug delivery systems, for example. To investigate the influence of the chemical structure on their stability in weak acidic conditions, we synthesized novel ONLs with 3'-orthoester nucleoside derivatives featuring either positive or negative charges (Figure 1a). All ONL head groups contain a nucleoside and an orthoester function with two fatty alcohols linked to the 3'-hydroxy group of the thymidine. The structures synthesized were chosen to test how the charge of the hydrophilic polar head affects the biophysical behavior and stability of ONLs. We reasoned that we could engineer the polar head to modulate the protonation behavior of the orthoester function, which might affect the rate of orthoester hydrolysis. ONLs **6** and **11** were synthesized using a similar synthetic approach used for the synthesis of 5'-silyl-2'-

[a] Dr. K. Oumzil, S. Benizri, G. Tonelli, Dr. C. Staedel, A. Appavoo, Prof. P. Barthélémy
ARNA laboratory–INSERM U869, Université Bordeaux Segalen
146 Rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux (France)
E-mail: philippe.barthelemy@inserm.fr

[b] M. Chaffanet
INSERM UMR1068–CNRS UMR725, Institut Paoli-Calmettes
232 Boulevard Sainte Marguerite, 13273 Marseille (France)
and
Faculté de Médecine, Aix Marseille Université
27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille (France)

[c] L. Navailles
Centre de recherche Paul Pascal/UPR 8641, CNRS–Université Bordeaux
115 Avenue Dr Schweitzer, 33600, Pessac (France)

Experimental procedures and characterization data (NMR, MS), spectra from SAXS, DLS, and NMR analyses, TEM images, and methods for the biological studies performed are given in the Supporting Information available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500381>.

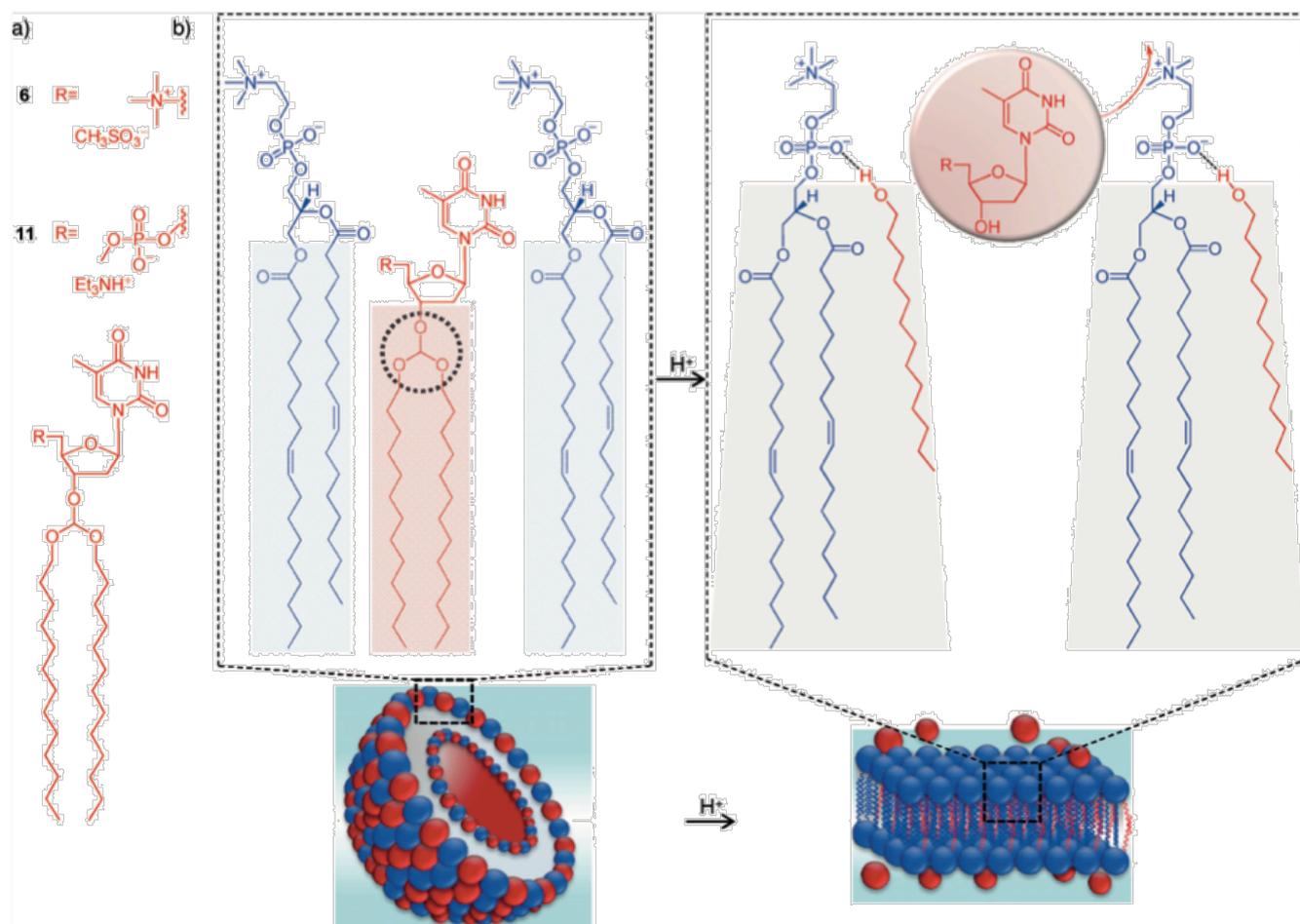


Figure 1. a) Orthoester nucleoside lipids (ONLs) investigated in this study feature positive (**6**) or negative (**11**) charges. Cleavage of the orthoester function (dotted line) under weak acidic conditions induces the release of fatty alcohols and nucleosides (red). b) Single-chain alcohols interact with phospholipids to provide inverted cone shape amphiphilic complexes, which promote liposome destabilization.

orthoester nucleoside^[21] (Schemes S1 and S2, Supporting Information). This synthetic strategy proved to be an effective way to attach an orthoester side chain to the 3'-hydroxy group of the 2'-deoxythymidine (83 and 90% yields for **6** and **11**, respectively). Briefly stated, in the case of cationic ONL **6**, the starting material 2'-deoxythymidine was allowed to react with methanesulfonyl chloride in pyridine followed by a coupling reaction with trihexadecyl orthoformate **2** (Scheme S1, Supporting Information). The resulting nucleolipid intermediate **5** was incubated in the presence of trimethylamine for 48 h to give ONL **6**. The synthesis of ONL **11** started with the reaction of thymidine TBDMS-Cl in DMF followed by a coupling reaction with trihexadecyl orthoformate (Scheme S2, Supporting Information). After removal of the TBDMS protecting group, the 5'-hydroxy function of the resulting intermediate **9** was then treated with a chlorophosphoramidite to give rise to a phosphoramidite intermediate **10**. ONL **11** was isolated after oxidation of **10** and deprotection of the cyanoethyl group.

First, dynamic light scattering (DLS) experiments were carried out to confirm the formation of supramolecular objects. Both cationic and anionic ONLs form supramolecular assemblies of similar size ($d=100.4$ and 135.9 nm, respectively) in

aqueous solution with reasonably narrow polydispersity (Figures S1–S6, Supporting Information). As expected, the zeta potentials measured for ONL-based objects depend on the charge of the respective polar heads ($\zeta=51.4$ mV and -43.3 mV for **6** and **11**, respectively). Thus, the presence of the orthoester function has a limited effect on the formation of aggregates, as liposomes were observed in both cases. To mimic endosomal membranes, which are rich in phosphocholine lipids,^[22] liposomes containing 1:1 mixtures of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)/ONL (5 mg mL⁻¹) were prepared after vortex agitation. Then the stability of the resulting vesicles was followed either at pH 5 or pH 7.4. Under these conditions, both anionic and cationic DOPC/ONL samples form vesicles with diameters of ~ 150 and 100 nm (PDI=0.1), respectively (Figure 2b and Figure S10, Supporting Information).

Because the charge of the polar heads is an important factor in defining the overall chemical stability, we performed kinetic of hydrolysis for both ONLs at pH 5 and 7.4. Thus, ¹H NMR experiments involving pure ONLs **6** or **11** were carried out (Figure 2a). After hydrolysis of the orthoester function the chemical shifts of the thymidine methyl group protons are shifted upfield and downfield for ONLs **6** and **11**, respectively (Figur-

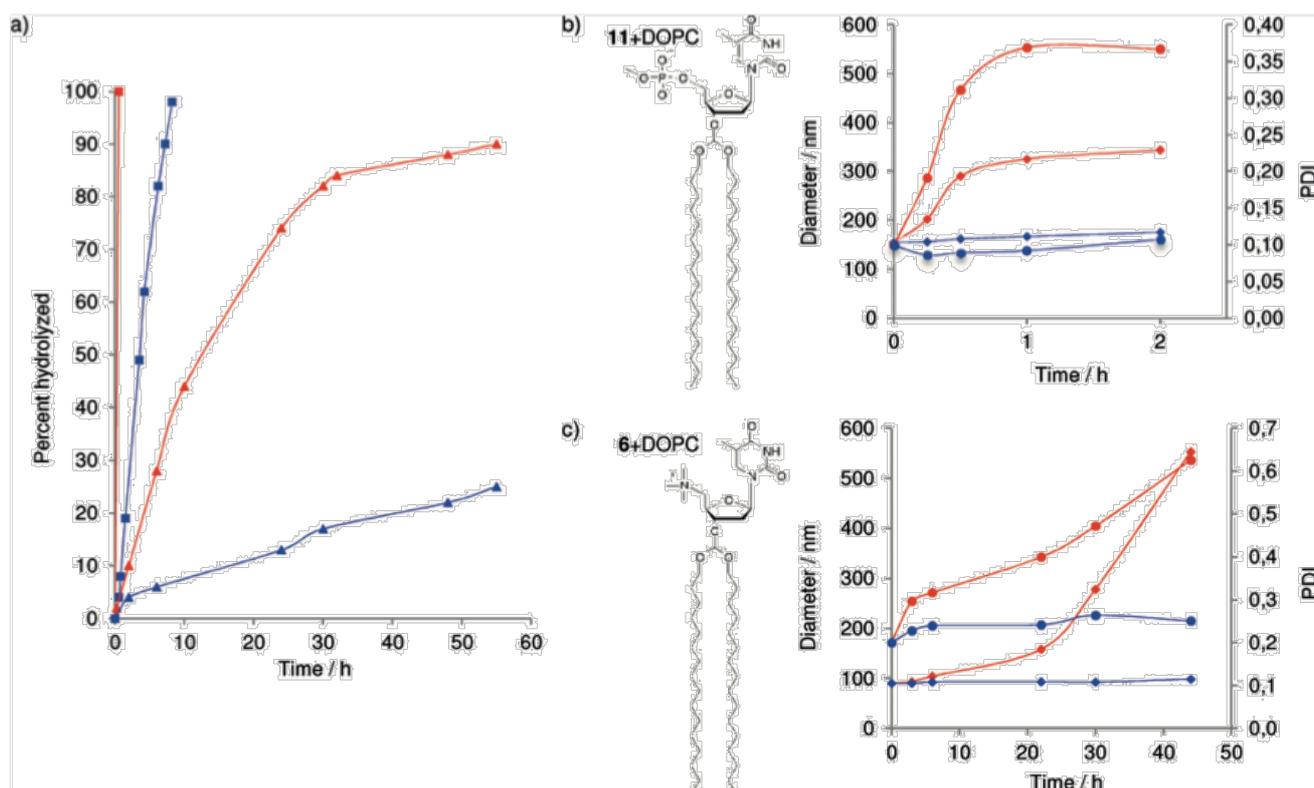


Figure 2. Chemical and colloidal stabilities of orthoester nucleoside lipids (ONLs) in different conditions at neutral pH 7.4 (blue) and acidic pH 5 (red). a) Hydrolysis profile of cationic ONL **6** (▲) and anionic ONL **11** (■) as a function of time at different pH at 37 °C. The hydrolysis was monitored by NMR (see Supporting Information). Colloidal stabilities of biomimetic ONL/DOPC liposomes involving b) anionic ONL **11** and c) cationic ONL **6**: polydispersity index (PDI): ●; diameter: ◆.

es S7 and S8, Supporting Information). The kinetics of hydrolysis was followed by integrating the signals corresponding to methyl group protons (Figures S7 and S8, Supporting Information). Interestingly, this study reveals that the hydrolysis rate of the orthoester function depends on both the pH and charge of the polar heads. The rate of hydrolysis of orthoester function is known to increase with the hydrogen ion concentration.^[23,24] Hence, both ONLs **6** and **11** show higher rates of hydrolysis at pH 5 (Figure 2a). The increased hydrolysis rates observed for the anionic ONL **11** relative to cationic ONL **6** at both pH 5 and 7.4 results from the presence of a formal negative charge in the ONL head group. During the hydrolysis mechanism the orthoester oxygen atoms are protonated, leading to a positively charged transition state. In the case of ONL **11**, the presence of negative zeta potential at the surface of the liposomes contributes to stabilization of this transition state, which decreases the energy of activation and enhances the hydrolysis rate.^[25]

To deliver the drug payload to the intracellular compartment, liposomes must first be taken up by endocytosis before being destabilized at the lower endosomal pH. Such destabilization allows the liposome to break down and deliver its contents into the cytoplasm. Because it has been reported that the internal membranes of endosomes are rich in phosphatidylcholine lipids, ONLs were mixed with DOPC to mimic the endosomal environment. Thus, in theory, upon acidification of the liposomes, the ONLs would be hydrolyzed to expose the

fatty alcohol. These alcohols (associated with phosphocholine lipids)^[26,27] would disrupt the biomimetic membranes and release the nucleoside moiety into the cytoplasm. This hypothesis is supported by the possibility to associate fatty alcohol hydroxy groups with the phosphocholine moiety of lipids via hydrogen bonding. Such an association has been reported to lead to the formation of complexes with geometry similar to that of DOPE.^[26] This, in turn, would result in allowing the lipid to transition from a lamellar to a hexagonal phase, which is required for membrane destabilization. Thus, the colloidal stability of ONL/DOPC mixtures was studied at 37 °C by DLS experiments.

The colloidal stability of the liposomes (orthoester/DOPC, 1:1) was studied by monitoring the diameter and polydispersity index (PDI) of particles versus time. The kinetics at 37 °C are shown in Figure 2b,c for anionic and cationic compounds/DOPC mixtures, respectively. Under acidic conditions (pH 5), the results show that hydrolysis of the orthoester function results in an increase in both the particles' diameter and PDI for both ONLs, indicating a disruption of the colloidal suspension. Notably, at pH 7.4 (37 °C), the colloidal stability is maintained for more than 1 h for both systems. The morphology of colloidal systems before and after hydrolysis under acidic conditions was studied by transmission electron microscopy (TEM). TEM images exhibit the presence of liposomes (Figure 3a,c) for ONL/DOPC mixtures before acidification, whereas lamellar structures were observed after incubation at pH 5. To further

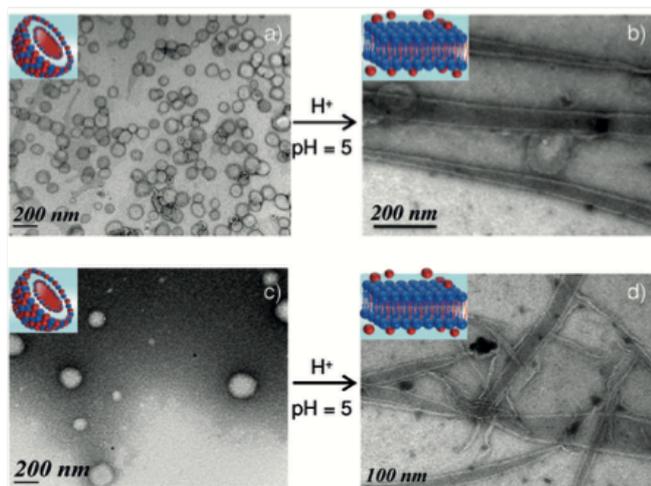


Figure 3. Transmission electron microscopy (TEM) images showing the morphology of biomimetic ONL/DOPC liposomes involving anionic orthoester nucleoside lipid (ONL) **11** (top) and cationic ONL **6** (bottom) colloidal mixtures before (a and c) and after incubation at pH 5 (b and d).

characterize the colloidal systems small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were performed on cationic ONL/DOPC mixtures before and after exposure to acidic pH. The results shown in Figure 4 show SAXS profiles of a cationic compound **6**/DOPC mixture (50:50 molar ratio) before and after incubation at pH 5 and 37 °C. Before incubation, a broad peak corresponding to a form factor of a vesicular object was observed.^[28] The thicknesses of the hydrophilic (δH) and hydrophobic (δT) parts of the bilayer were determined using the model of Nallet et al.^[29] The bilayer thickness ($2\delta H + 2\delta T$) was roughly equal to 4.7 nm, with $\delta H = 1.1$ and $\delta T = 1.25$, respectively. After incubation, a characteristic feature that we interpret as a Bragg peak was observed. This peak corresponds to

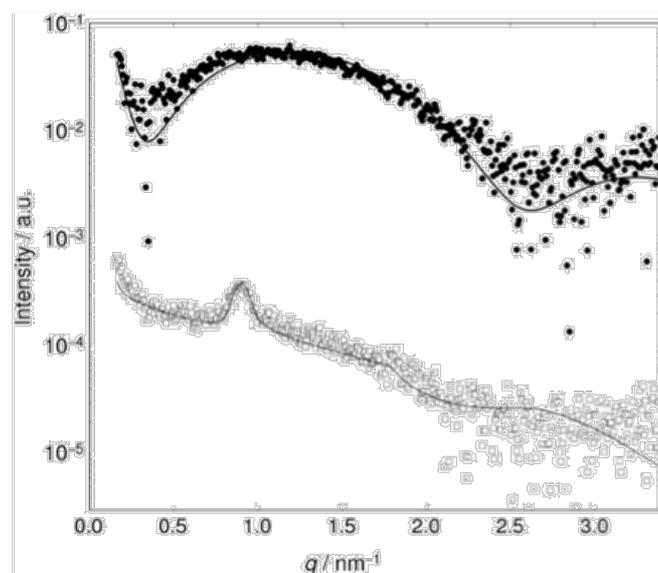


Figure 4. Small-angle X-ray scattering (SAXS) profiles of cationic orthoester/DOPC (50:50 molar ratio) before (●) and after (□) incubation at pH 5 and 37 °C. The solid lines correspond to the best fit.

the structure factor of a multilamellar stacking of bilayers.^[30] Hence, the compound **6**/DOPC mixture evolves from unilamellar vesicles before incubation to multilamellar systems with a lamellar periodicity equal to 7 nm.

Non-pH-sensitive stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) have been used to deliver siRNA and to promote the knock-down of proteins *in vitro*^[31,32] and *in vivo*.^[33,34] To determine whether a delivery system involving ONL would release its contents in response to a decrease in pH in the endosomal compartment, we examined the entrapment and release of an siRNA in breast cancer cells. RECQL4 is a human RecQ helicase implicated in three syndromes (Rothmund–Thompson, Rapadilino, and Baller–Gerold) displaying accelerating aging, developmental abnormalities, and a predisposition to cancer. An increase in RECQL4 mRNA levels was observed in clinical breast tumor samples, and recent studies indicate that overexpression of RECQL4 plays a critical role in the progression of human breast tumor luminal B.^[35,36]

The inhibition of RECQL4 expression by specific siRNA (siRECQL4) was investigated using pH-sensitive (ONL **6**/DOPE, 1:1) and non-sensitive (DOTAU^[37]/DOPE, 1:1) SNALPs. These mixtures were incubated in the presence of siRNA at different ratios (N/P = 5 and 10). SNALPs loaded with siRNA targeting luciferase (siLuc) were used as a negative control to evaluate the possible nonspecific effects of the complexes on the RECQL4 expression monitored by quantitative RT-PCR. In the case of the pH-sensitive ONL **6**/DOPE/siRNA complexes, DLS experiments revealed the presence of nanoparticles of 90 and 100 nm in diameter for siLuc and siRECQL4, respectively. Under the same conditions the size of DOTAU/DOPE/siRNA particles were 69 and 63 nm for siLuc and siRNA RECQL4, respectively. The results showing the expression levels of RECQL4 normalized to that of GAPDH indicate that only the pH-sensitive SNALP was able to inhibit the expression of RECQL4 (50% for an N/P ratio of 10). In contrast, the non-pH-sensitive SNALP DOTAU was inefficient in transfecting the siRNA targeting RECQL4 (Figure S9, Supporting Information). Also, SNALPs loaded with siRNA targeting luciferase did not decrease RECQL4 expression, indicating that the downregulation effect observed in the case of pH-sensitive SNALP is specific. Therefore, the cleavable ONL-based particles exhibit better siRNA delivery over conventional SNALPs.

In summary, we have shown that the orthoester modification of nucleolipids results in the formation of pH-sensitive liposomes. The co-formulation of the ONLs with natural lipids such as DOPC allows for the destabilization of the vesicles under acidic conditions and the formation of lamellar phases. Such a new system organized by the association of fatty alcohol and DOPC features a different curvature, which leads to destabilization of the liposomes. The utility of such a pH-sensitive lipid-based delivery system was demonstrated with ONL/siRNA particles. These SNALPs were able to release siRNAs targeting the human RecQ helicase (RECQL4), which is overexpressed in human breast cancer. Although further optimization of the ONLs is required for biological applications, the results reported herein highlight the utility of pH-sensitive ONLs for the development of a wide variety of lipid-based delivery systems.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its programme "Blanc and Emergence" (projects "GelCells" SIMI 7-2010 and "NanoDeconGels" ANR-12-EMMA 0008) and the Conseil Régional d'Aquitaine (CRAq), France.

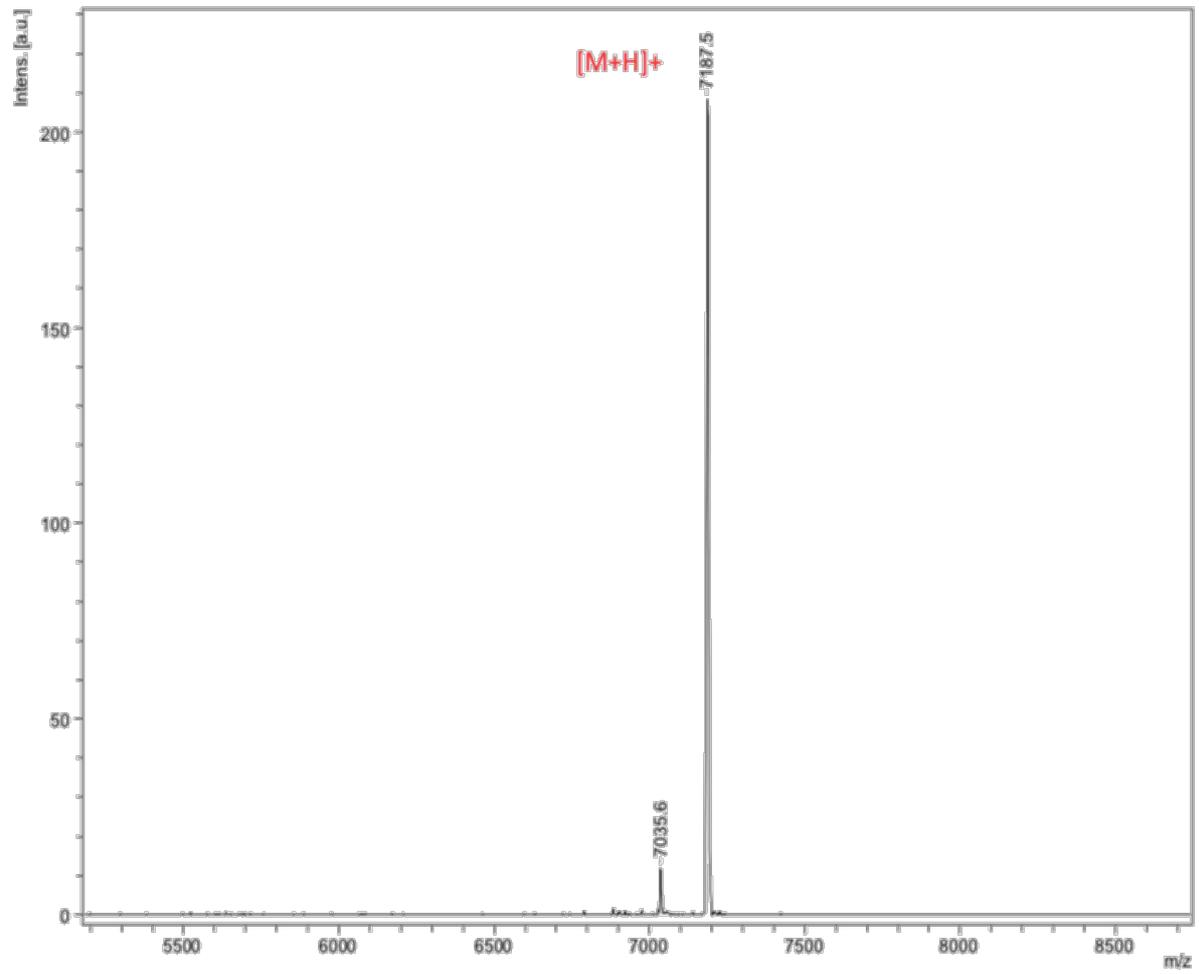
Keywords: drug delivery · lipids · nucleosides · pH responsive · small interfering RNA (siRNA)

- [1] C. S. Kim, B. Duncan, B. Creran, V. M. Rotello, *Nano Today* **2013**, *8*, 439–447.
- [2] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373–4384.
- [3] A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8002–8018; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8122–8139.
- [4] D. E. Whitaker, C. S. Mahon, D. A. Fulton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 956–959; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 990–993.
- [5] C. L. Walsh, J. Nguyen, F. C. Szoka, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5575–5577.
- [6] K. C.-F. Leung, C.-P. Chak, C.-M. Lo, W.-Y. Wong, S. Xuan, C. H. K. Cheng, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 364–381.
- [7] A. Ghosh, M. Haverick, K. Stump, X. Yang, M. F. Tweedle, J. E. Goldberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3647–3650.
- [8] S. Binauld, M. H. Stenzel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2082–2102.
- [9] E. Fattal, P. Couvreur, C. Dubernet, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 931–946.
- [10] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2005**, *4*, 145–160.
- [11] W. Viricel, A. Mbarek, J. Leblond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, in press, DOI: 10.1002/anie.201504661; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, in press, DOI: 10.1002/ange.201504661.
- [12] P. P. Pillai, S. Huda, B. Kowalczyk, B. A. Grzybowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6392–6395.
- [13] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzler, P. Mailhe, D. Scherman, M. Bessodes, *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 423–434.
- [14] Z. Huang, X. Guo, W. Li, J. A. MacKay, F. C. Szoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 60–61.
- [15] D. Hoekstra, N. Düzgüneş, *Methods Enzymol.* **1993**, *220*, 15–32.
- [16] J. W. N. Düzgüneş, *Methods Enzymol.* **1993**, *220*, 3–14.
- [17] S. Zellmer, G. Cevc, *J. Drug Targeting* **1996**, *4*, 19–29.
- [18] V. Allain, C. Bourgaux, P. Couvreur, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1891–1903.
- [19] P. Barthélemy, *C. R. Chim.* **2009**, *12*, 171–179.
- [20] A. Gissot, M. Camplo, M. W. Grinstaff, P. Barthélemy, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324–1333.
- [21] S. A. Scaringe, *Methods* **2001**, *23*, 206–217.
- [22] T. Kobayashi, M.-H. Beuchat, J. Chevallier, A. Makino, N. Mayran, J.-M. Escola, C. Lebrand, P. Cosson, T. Kobayashi, J. Gruenberg, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32157–32164.
- [23] H. Kwart, M. B. Price, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5123–5129.
- [24] J. G. Fullington, E. H. Cordes, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 970–972.
- [25] M. T. A. Behme, J. G. Fullington, R. Noel, E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 266–270.
- [26] J. J. Sudimack, W. Guo, W. Tjarks, R. J. Lee, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2002**, *1564*, 31–37.
- [27] J. M. Boggs, G. Rangaraj, K. M. Koshy, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*, 23–34.
- [28] A. E. Blaurock, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1982**, *650*, 167–207.
- [29] F. Nallet, R. Laversanne, D. Roux, *J. Phys. II* **1993**, *3*, 16.
- [30] C. Loudet-Courreges, F. Nallet, E. J. Dufourc, R. Oda, *Langmuir* **2011**, *27*, 9122–9130.
- [31] D. Luvino, S. Khiati, K. Oumzil, P. Rocchi, M. Camplo, P. Barthélemy, *J. Controlled Release* **2013**, *172*, 954–961.
- [32] P. Pierrat, G. Laverny, G. Creusat, P. Wehrung, J.-M. Strub, A. VanDorsseleer, F. Pons, G. Zuber, L. Lebeau, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2344–2355.
- [33] T. S. Zimmermann, A. C. H. Lee, A. Akin, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, I. MacLachlan, *Nature* **2006**, *441*, 111–114.
- [34] P. M. Costa, A. L. Cardoso, C. Custódia, P. Cunha, L. Pereira deAlmeida, M. C. Pedroso de Lima, *J. Controlled Release* **2015**, *207*, 31–39.
- [35] S. Cornen, A. Guille, J. Adélaïde, L. Addou-Klouche, P. Finetti, M.-R. Saade, M. Manai, N. Carbuca, I. Bekhouche, A. Letessier, S. Reynaud, E. Charafe-Jauffret, J. Jacquemier, S. Spicuglia, H. de The, P. Viens, F. Bertucci, D. Birnbaum, M. Chaffanet, *PLoS One* **2014**, *9*, e81843.
- [36] H. Fang, L. Nie, Z. Chi, J. Liu, D. Guo, X. Lu, T. K. Hei, A. S. Balajee, Y. Zhao, *PLoS One* **2013**, *8*, e69600.
- [37] P. Chabaud, M. Camplo, D. Payet, G. Serin, L. Moreau, P. Barthélemy, M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 466–472.

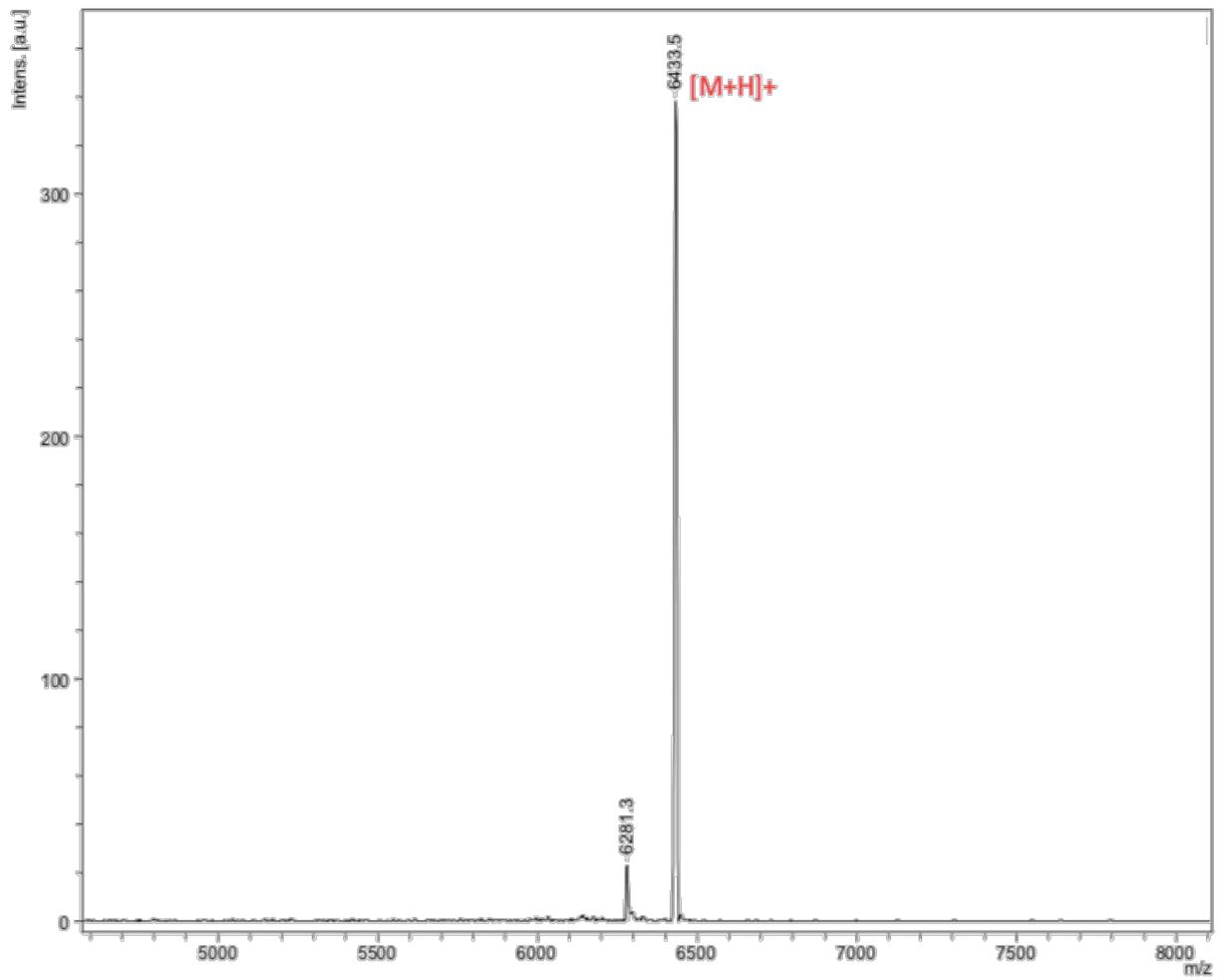
Received: August 28, 2015

Published online on September 18, 2015

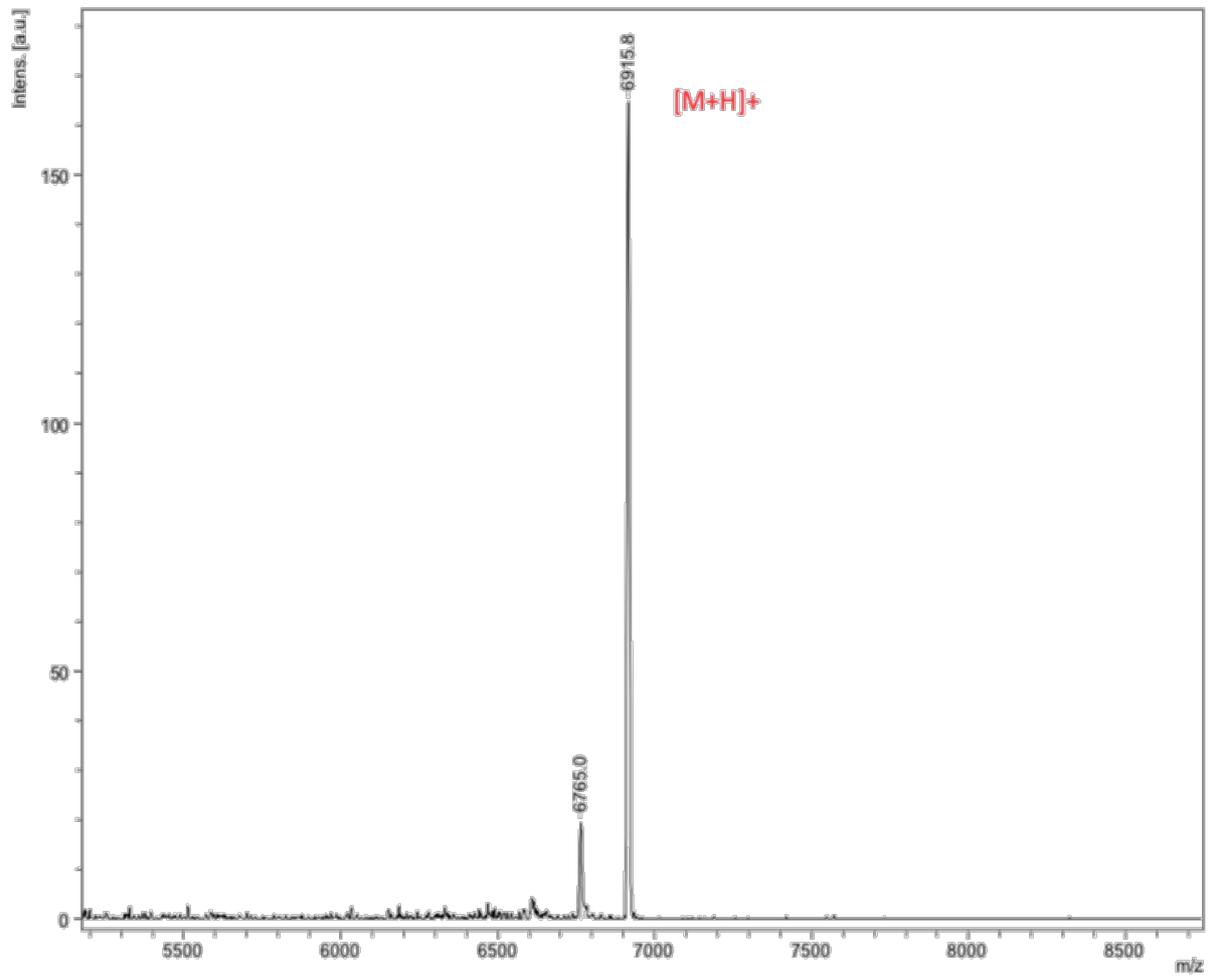
Annexe 2 : Spectre de masse du LASO



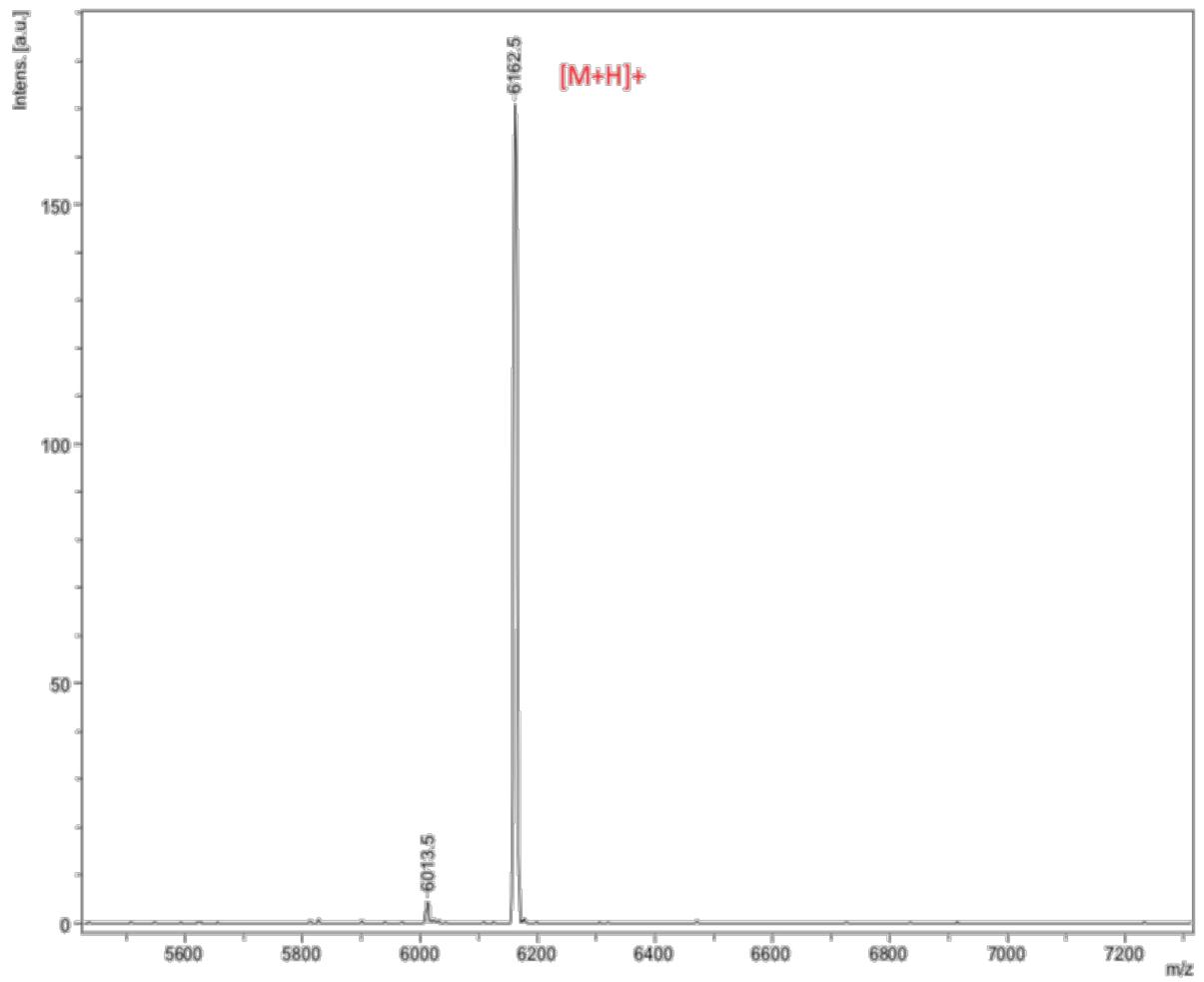
Annexe 3 : Spectre de masse du ASO



Annexe 4 : Spectre de masse du LScr



Annexe 5 : Spectre de masse du Scr



Références :

- Aartsma-Rus, A., and Krieg, A.M. (2017). FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther.* *27*, 1–3.
- Ackermann, E.J., Guo, S., Benson, M.D., Booten, S., Freier, S., Hughes, S.G., Kim, T.-W., Jesse Kwoh, T., Matson, J., Norris, D., et al. (2016). Suppressing transthyretin production in mice, monkeys and humans using 2nd-Generation antisense oligonucleotides. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* *23*, 148–157.
- Acunzo, J., Baylot, V., So, A., and Rocchi, P. (2014). TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat. Rev.* *40*, 760–769.
- Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S., and Greiner, A. (2012). PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater. Today* *15*, 388–393.
- Aigner, A., and Kögel, D. (2018). Nanoparticle/siRNA-based therapy strategies in glioma: which nanoparticles, which siRNAs? *Nanomed.* *13*, 89–103.
- Ajufo, E., and Rader, D.J. (2018). New Therapeutic Approaches for Familial Hypercholesterolemia. *Annu. Rev. Med.* *69*, 113–131.
- Alam, M.R., Ming, X., Fisher, M., Lackey, J.G., Rajeev, K.G., Manoharan, M., and Juliano, R.L. (2011). Multivalent cyclic RGD conjugates for targeted delivery of small interfering RNA. *Bioconjug. Chem.* *22*, 1673–1681.
- Allain, V., Bourgaux, C., and Couvreur, P. (2012). Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1891–1903.
- Asami, Y., Yoshioka, K., Nishina, K., Nagata, T., and Yokota, T. (2016). Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discov. Ther.* *10*, 256–262.
- Bagal, B., Chandrasekharan, A., Chougale, A., and Khattry, N. (2018). Low, fixed dose defibrotide in management of hepatic veno-occlusive disease post stem cell transplantation. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* *11*, 47–51.
- Baillet, J., Desvergnès, V., Hamoud, A., Latxague, L., and Barthélémy, P. (2018). Lipid and Nucleic Acid Chemistries: Combining the Best of Both Worlds to Construct Advanced Biomaterials. *Adv. Mater.*
- Baker, B.F., Lot, S.S., Condon, T.P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E.A., Sasmor, H.M., and Bennett, C.F. (1997). 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified Anti-intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Oligonucleotides Selectively Increase the ICAM-1 mRNA Level and Inhibit Formation of the ICAM-1 Translation Initiation Complex in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 11994–12000.
- Baylot, V., Katsogiannou, M., Andrieu, C., Taieb, D., Acunzo, J., Giusiano, S., Fazli, L., Gleave, M., Garrido, C., and Rocchi, P. (2012). Targeting TCTP as a New Therapeutic Strategy in Castration-resistant Prostate Cancer. *Mol. Ther.* *20*, 2244–2256.
- Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* *587*, 1693–1702.
- Beg, M.S., Brenner, A.J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y.-K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A.G., Kim, S., and Hong, D.S. (2017). Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* *35*, 180–188.
- Benizri, S., Ferey, L., Alies, B., Mebarek, N., Vacher, G., Appavoo, A., Staedel, C., Gaudin, K., and Barthélémy, P. (2018). Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res. Lett.* *13*, 17.
- Bennett, C.F., and Swayze, E.E. (2010). RNA Targeting Therapeutics: Molecular

- Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 259–293.
- Benson, M.D., Dasgupta, N.R., Rissing, S.M., Smith, J., and Feigenbaum, H. (2017). Safety and efficacy of a TTR specific antisense oligonucleotide in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid* *24*, 217–223.
- Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., and Corey, D.R. (2003). RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 7967–7975.
- Burchett, K.M., Yan, Y., and Ouellette, M.M. (2014). Telomerase Inhibitor Imetelstat (GRN163L) Limits the Lifespan of Human Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE* *9*.
- Cao, M., Chen, H., Chen, D., Xu, Z., Liu, S.H., Chen, X., and Yin, J. (2016). Naphthalimide-based fluorescent probe for selectively and specifically detecting glutathione in the lysosomes of living cells. *Chem. Commun.* *52*, 721–724.
- Capodici, J., Karikó, K., and Weissman, D. (2002). Inhibition of HIV-1 Infection by Small Interfering RNA-Mediated RNA Interference. *J. Immunol.* *169*, 5196–5201.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642–655.
- Cazenave, C., Stein, C.A., Loreau, N., Thuong, N.T., Neckers, L.M., Subasinghe, C., Hélène, C., Cohen, J.S., and Toulmé, J.J. (1989). Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* *17*, 4255–4273.
- Ceballos, C., Prata, C.A.H., Giorgio, S., Garzino, F., Payet, D., Barthélémy, P., Grinstaff, M.W., and Camplo, M. (2009). Cationic Nucleoside Lipids Based on a 3-Nitropyrrole Universal Base for siRNA Delivery. *Bioconjug. Chem.* *20*, 193–196.
- Ceballos, C., Khiati, S., Prata, C.A.H., Zhang, X.-X., Giorgio, S., Marsal, P., Grinstaff, M.W., Barthélémy, P., and Camplo, M. (2010). Cationic Nucleoside Lipids Derived from Universal Bases: A Rational Approach for siRNA Transfection. *Bioconjug. Chem.* *21*, 1062–1069.
- Cech, T.R. (1988). Ribozymes and their medical implications. *JAMA* *260*, 3030–3034.
- Cepeda-Plaza, M., McGhee, C.E., and Lu, Y. (2018). Evidence of a General Acid–Base Catalysis Mechanism in the 8–17 DNAzyme. *Biochemistry (Mosc.)* *57*, 1517–1522.
- Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in Eukaryotes. *FEBS J.* *276*, 1494–1505.
- Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., Serin, G., Moreau, L., Barthélémy, P., and Grinstaff, M.W. (2006). Cationic Nucleoside Lipids for Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* *17*, 466–472.
- Chan, J.H.P., Lim, S., and Wong, W.S.F. (2006). Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *33*, 533–540.
- Chernikov, I.V., Gladkikh, D.V., Meschaninova, M.I., Ven'yaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V., and Chernolovskaya, E.L. (2017). Cholesterol-Containing Nuclease-Resistant siRNA Accumulates in Tumors in a Carrier-free Mode and Silences MDR1 Gene. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *6*, 209–220.
- Chiper, M., Tounsi, N., Kole, R., Kichler, A., and Zuber, G. (2017). Self-aggregating 1.8kDa polyethylenimines with dissolution switch at endosomal acidic pH are delivery carriers for plasmid DNA, mRNA, siRNA and exon-skipping oligonucleotides. *J. Controlled Release* *246*, 60–70.
- Chiriboga, C.A., Swoboda, K.J., Darras, B.T., Iannaccone, S.T., Montes, J., De Vivo, D.C., Norris, D.A., Bennett, C.F., and Bishop, K.M. (2016). Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*

- 86, 890–897.
- Chiu, Y.-L., and Rana, T.M. (2003). siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9, 1034–1048.
- Corporation, G. (2017). Geron Announces Fast Track Designation Granted to Imetelstat for Lower Risk Myelodysplastic Syndromes.
- Crooke, S.T., Witztum, J.L., Bennett, C.F., and Baker, B.F. (2018). RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab.* 27, 714–739.
- Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygün, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 2705–2716.
- Dalmay, T. (2013). Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem.* 54, 29–38.
- Dande, P., Prakash, T.P., Sioufi, N., Gaus, H., Jarres, R., Berdeja, A., Swayze, E.E., Griffey, R.H., and Bhat, B. (2006). Improving RNA Interference in Mammalian Cells by 4'-Thio-Modified Small Interfering RNA (siRNA): Effect on siRNA Activity and Nuclease Stability When Used in Combination with 2'-O-Alkyl Modifications. *J. Med. Chem.* 49, 1624–1634.
- Davis, R.R., Shaban, N.M., Perrino, F.W., and Hollis, T. (2015). Crystal structure of RNA-DNA duplex provides insight into conformational changes induced by RNase H binding. *Cell Cycle* 14, 668–673.
- Davis, S., Propp, S., Freier, S.M., Jones, L.E., Serra, M.J., Kinberger, G., Bhat, B., Swayze, E.E., Bennett, C.F., and Esau, C. (2009). Potent inhibition of microRNA in vivo without degradation. *Nucleic Acids Res.* 37, 70–77.
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., et al. (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17204–17209.
- Dominski, Z., and Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8673–8677.
- Doran, G., and Sohail, M. (2006). Systematic analysis of the role of target site accessibility in the activity of DNA enzymes. *J. RNAi Gene Silenc. Int. J. RNA Gene Target. Res.* 2, 205–214.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877–6888.
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E.G., Ravichandran, L.V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R.J., Jain, R., et al. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 52361–52365.
- Evers, M.M., Toonen, L.J.A., and van Roon-Mom, W.M.C. (2015). Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 90–103.
- Faria, M., Spiller, D.G., Dubertret, C., Nelson, J.S., White, M.R.H., Scherman, D., Hélène, C., and Giovannangeli, C. (2001). Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 19, 40–44.
- Fine, S.L., Martin, D.F., and Kirkpatrick, P. (2005). Pegaptanib sodium.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Franchini, M., and Mannucci, P.M. (2018). Non-factor replacement therapy for

- haemophilia: a current update. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* 1–5.
- Froehler, B., Ng, P., and Matteucci, M. (1988). Phosphoramidate analogues of DNA: synthesis and thermal stability of heteroduplexes. *Nucleic Acids Res.* 16, 4831–4839.
- Furdon, P.J., Dominski, Z., and Kole, R. (1989). RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. *Nucleic Acids Res.* 17, 9193–9204.
- Gamcsik, M.P., Kasibhatla, M.S., Teeter, S.D., and Colvin, O.M. (2012). Glutathione Levels in Human Tumors. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 17, 671–691.
- Gao, W.Y., Han, F.S., Storm, C., Egan, W., and Cheng, Y.C. (1992). Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNase H: implications for antisense technology. *Mol. Pharmacol.* 41, 223–229.
- Garba, A.O., and Mousa, S.A. (2010). Bevasiranib for the Treatment of Wet, Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol. Eye Dis.* 2, 75–83.
- Girelli, D., Busti, F., Marchi, G., Martinelli, N., and Olivieri, O. (2018). Therapeutic oligonucleotides in cardiovascular and metabolic diseases: insights for the internist. *Intern. Emerg. Med.* 1–6.
- Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M.W., and Barthélémy, P. (2008a). Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids. *Org. Biomol. Chem.* 6, 1324–1333.
- Gissot, A., Primo, C.D., Bestel, I., Giannone, G., Chapuis, H., and Barthélémy, P. (2008b). Sensitive liposomes encoded with oligonucleotide amphiphiles: a biocompatible switch. *Chem. Commun.* 5550–5552.
- Godeau, G., Staedel, C., and Barthélémy, P. (2008). Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation. *J. Med. Chem.* 51, 4374–4376.
- Goldblatt, E.M., Erickson, P.A., Gentry, E.R., Gryaznov, S.M., and Herbert, B.-S. (2009). Lipid-conjugated telomerase template antagonists sensitize resistant HER2-positive breast cancer cells to trastuzumab. *Breast Cancer Res. Treat.* 118, 21–32.
- Gooding, M., Malhotra, M., Evans, J.C., Darcy, R., and O’Driscoll, C.M. (2016). Oligonucleotide conjugates - Candidates for gene silencing therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 107, 321–340.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Vandeburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Weber, K., and Tuschl, T. (2003). Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13, 83–105.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130–1134.
- Herbert, B.-S., Gellert, G.C., Hochreiter, A., Pongracz, K., Wright, W.E., Zielinska, D., Chin, A.C., Harley, C.B., Shay, J.W., and Gryaznov, S.M. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3′ → P5′ thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene* 24, 5262–5268.
- Hoshika, S., Minakawa, N., and Matsuda, A. (2004). Synthesis and physical and physiological properties of 4′-thioRNA: application to post-modification of RNA aptamer toward NF-κB. *Nucleic Acids Res.* 32, 3815–3825.
- Hua, Y., Vickers, T.A., Baker, B.F., Bennett, C.F., and Krainer, A.R. (2007). Enhancement of

- SMN2 Exon 7 Inclusion by Antisense Oligonucleotides Targeting the Exon. *PLOS Biol.* *5*, e73.
- Huang, Y. (2017). Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *6*, 116–132.
- Inoue, H., Hayase, Y., Iwai, S., and Ohtsuka, E. (1987). Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett.* *215*, 327–330.
- Isaiah Cedillo, Dana Chreng, Elyse Engle, Lijian Chen, Andrew McPherson, and Andrew Rodriguez (2017). Synthesis of 5'-GalNAc-Conjugated Oligonucleotides: A Comparison of Solid and Solution-Phase Conjugation Strategies. *Molecules* *22*, 1356.
- Iwamoto, N., Butler, D.C.D., Svrzikapa, N., Mohapatra, S., Zlatev, I., Sah, D.W.Y., Meena, Standley, S.M., Lu, G., Apponi, L.H., et al. (2017). Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* *35*, 845–851.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Järver, P., Coursindel, T., Andaloussi, S.E., Godfrey, C., Wood, M.J., and Gait, M.J. (2012). Peptide-mediated Cell and In Vivo Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* *1*.
- Jiang, Y., Lu, H., Khine, Y.Y., Dag, A., and Stenzel, M.H. (2014). Polyion Complex Micelle Based on Albumin-Polymer Conjugates: Multifunctional Oligonucleotide Transfection Vectors for Anticancer Chemotherapeutics. *Biomacromolecules* *15*, 4195–4205.
- Juliano, R.L., Ming, X., Nakagawa, O., Xu, R., and Yoo, H. (2011). Integrin Targeted Delivery of Gene Therapeutics. *Theranostics* *1*, 211–219.
- Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A., and Anderson, D. (2013). Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* *12*, 967–977.
- Khiati, S., Luvino, D., Oumzil, K., Chauffert, B., Camplo, M., and Barthélémy, P. (2011). Nucleoside-Lipid-Based Nanoparticles for Cisplatin Delivery. *ACS Nano* *5*, 8649–8655.
- Khvorova, A., and Watts, J.K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* *35*, 238–248.
- Kozak, I., McCutchan, J.A., and Freeman, W.R. (2013). Chapter 81 - HIV-Associated Infections. In *Retina (Fifth Edition)*, S.J. Ryan, S.R. Sadda, D.R. Hinton, A.P. Schachat, S.R. Sadda, C.P. Wilkinson, P. Wiedemann, and A.P. Schachat, eds. (London: W.B. Saunders), pp. 1441–1472.
- Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3903–3908.
- Kurreck, S.S. and J. (2004). Ribozyme- and Deoxyribozyme-Strategies for Medical Applications.
- Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A., and Sullenger, B.A. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* *10*, 766–771.
- Lengyel, P., Speyer, J.F., and Ochoa, S. (1961). Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *47*, 1936–1942.
- Lewis, L.J., Mistry, P., Charlton, P.A., Thomas, H., and Coley, H.M. (2007). Mode of action of the novel phenazine anticancer agents XR11576 and XR5944: Anticancer. *Drugs* *18*, 139–148.

- Liang, X., Sun, H., Shen, W., and Crooke, S.T. (2015). Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* *43*, 2927–2945.
- Lim, K.R.Q., Maruyama, R., and Yokota, T. (2017). Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769–773.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437–1441.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719–723.
- Lobeek, D., Franssen, G.M., Ma, M.T., Wester, H.-J., Decristoforo, C., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C., Terry, S.Y.A., and Rijpkema, M. (2018). In vivo characterization of four 68Ga-labeled multimeric RGD peptides to image $\alpha v \beta 3$ integrin expression in two human tumor xenograft mouse models. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*
- Lukashev, A.N., and Zamyatnin, A.A. (2016). Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochem. Biokhimiia* *81*, 700–708.
- Lundin, K.E., Gissberg, O., and Smith, C.I.E. (2015). Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* *26*, 475–485.
- Luvino, D., Khiati, S., Oumzil, K., Rocchi, P., Camplo, M., and Barthélémy, P. (2013). Efficient delivery of therapeutic small nucleic acids to prostate cancer cells using ketal nucleoside lipid nanoparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *172*, 954–961.
- Maher, L.J., and Dolnick, B.J. (1988). Comparative hybrid arrest by tandem antisense oligodeoxyribonucleotides or oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates in a cell-free system. *Nucleic Acids Res.* *16*, 3341–3358.
- Manoharan, M. (2004). RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *8*, 570–579.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell* *110*, 563–574.
- Matsuda, S., Keiser, K., Nair, J.K., Charisse, K., Manoharan, R.M., Kretschmer, P., Peng, C.G., V. Kel'in, A., Kandasamy, P., Willoughby, J.L.S., et al. (2015). siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1181–1187.
- McNamara, J.O., Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A., and Giangrande, P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1005–1015.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185–197.
- Merten, O.-W., and Gaillet, B. (2016). Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches. *Biochem. Eng. J.* *108*, 98–115.
- Ming, X., Alam, M.R., Fisher, M., Yan, Y., Chen, X., and Juliano, R.L. (2010). Intracellular delivery of an antisense oligonucleotide via endocytosis of a G protein-coupled receptor. *Nucleic Acids Res.* *38*, 6567–6576.
- Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinosso, C.J., Kawasaki,

- A.M., Cook, P.D., and Freier, S.M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* *268*, 14514–14522.
- Moris, M.-A., Andrieu, C., Rocchi, P., Seillan, C., Acunzo, J., Brunel, F., Garzino, F., Siri, O., and Camplo, M. (2015). 2,3-Dialkoxyphenazines as anticancer agents. *Tetrahedron Lett.* *56*, 2695–2698.
- Moschos, S.A., Jones, S.W., Perry, M.M., Williams, A.E., Erjefalt, J.S., Turner, J.J., Barnes, P.J., Sproat, B.S., Gait, M.J., and Lindsay, M.A. (2007). Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48–60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity. *Bioconjug. Chem.* *18*, 1450–1459.
- Nair, J.K., Willoughby, J.L.S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M.R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A.V., Milstein, S., et al. (2014). Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 16958–16961.
- Nakagawa, O., Ming, X., Carver, K., and Juliano, R. (2014). Conjugation with receptor-targeted histidine-rich peptides enhances the pharmacological effectiveness of antisense oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* *25*, 165–170.
- Nakajima, M., Kasuya, T., Yokota, S., Onishi, R., Ikehara, T., Kugimiya, A., and Watanabe, A. (2017). Gene Silencing Activity and Hepatic Accumulation of Antisense Oligonucleotides Bearing Cholesterol-Conjugated Thiono Triester at the Gap Region. *Nucleic Acid Ther.* *27*, 232–237.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* *2*, 279–289.
- Neff, C.P., Zhou, J., Remling, L., Kuruvilla, J., Zhang, J., Li, H., Smith, D.D., Swiderski, P., Rossi, J.J., and Akkina, R. (2011). An Aptamer-siRNA Chimera Suppresses HIV-1 Viral Loads and Protects from Helper CD4+ T Cell Decline in Humanized Mice. *Sci. Transl. Med.* *3*, 66ra6.
- Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A., Shannon, J.M., Gupta, M.K., and Duvall, C.L. (2013). Balancing Cationic and Hydrophobic Content of PEGylated siRNA Polyplexes Enhances Endosome Escape, Stability, Blood Circulation Time, and Bioactivity In Vivo. *ACS Nano* *7*.
- Neuberg, P., and Kichler, A. (2014). Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Adv. Genet.* *88*, 263–288.
- Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R., and Adamis, A.P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 123–132.
- Niemietz, C.J., Sauer, V., Stella, J., Fleischhauer, L., Chandhok, G., Guttman, S., Avsar, Y., Guo, S., Ackermann, E.J., Gollob, J., et al. (2016). Evaluation of Therapeutic Oligonucleotides for Familial Amyloid Polyneuropathy in Patient-Derived Hepatocyte-Like Cells. *PLoS ONE* *11*.
- Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., and Yokota, T. (2008). Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 734–740.
- Nishina, T., Numata, J., Nishina, K., Yoshida-Tanaka, K., Nitta, K., Piao, W., Iwata, R., Ito, S., Kuwahara, H., Wada, T., et al. (2015). Chimeric Antisense Oligonucleotide Conjugated to α -Tocopherol. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e220.
- Norton, J.C., Piatyszek, M.A., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1996). Inhibition of

- human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat. Biotechnol.* *14*, 615–619.
- Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* *107*, 309–321.
- Okamoto, A., Asai, T., Hirai, Y., Shimizu, K., Koide, H., Minamino, T., and Oku, N. (2018). Systemic Administration of siRNA with Anti-HB-EGF Antibody-Modified Lipid Nanoparticles for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Pharm.*
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., and Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *59*, 598–605.
- Oumzil, K., Benizri, S., Tonelli, G., Staedel, C., Appavoo, A., Chaffanet, M., Navailles, L., and Barthélémy, P. (2015). pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems. *ChemMedChem* *10*, 1797–1801.
- Oumzil, K., Ramin, M.A., Lorenzato, C., Hémadou, A., Laroche, J., Jacobin-Valat, M.J., Mornet, S., Roy, C.-E., Kauss, T., Gaudin, K., et al. (2016). Solid Lipid Nanoparticles for Image-Guided Therapy of Atherosclerosis. *Bioconjug. Chem.* *27*, 569–575.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., and Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* *6*, 1077–1087.
- Pasi, K.J., Rangarajan, S., Georgiev, P., Mant, T., Creagh, M.D., Lissitchkov, T., Bevan, D., Austin, S., Hay, C.R., Hegemann, I., et al. (2017). Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. *N. Engl. J. Med.* *377*, 819–828.
- Pescador, R., Capuzzi, L., Mantovani, M., Fulgenzi, A., and Ferrero, M.E. (2013). Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul. Pharmacol.* *59*, 1–10.
- Petrova, N.S., Chernikov, I.V., Meschaninova, M.I., Dovydenko, Ii.S., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V., and Chernolovskaya, E.L. (2012). Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group. *Nucleic Acids Res.* *40*, 2330–2344.
- Piasecki, P. (1999). Fomiversen sodium approved to treat CMV retinitis. *J. Am. Pharm. Assoc. WashingtonDC* *1996* *39*, 84–85.
- Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., and Bhat, B. (2005). Positional Effect of Chemical Modifications on Short Interference RNA Activity in Mammalian Cells. *J. Med. Chem.* *48*, 4247–4253.
- Prakash, T.P., Graham, M.J., Yu, J., Carty, R., Low, A., Chappell, A., Schmidt, K., Zhao, C., Aghajan, M., Murray, H.F., et al. (2014). Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* *42*, 8796–8807.
- Priebe, W., and Perez-Soler, R. (1993). Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. *Pharmacol. Ther.* *60*, 215–234.
- Quartin, R.S., Brakel, C.L., and Wetmur, J.G. (1989). Number and distribution of methylphosphonate linkages in oligodeoxynucleotides affect exo- and endonuclease sensitivity and ability to form RNase H substrates. *Nucleic Acids Res.* *17*, 7253–7262.
- Rait, V.K., and Shaw, B.R. (1999). Boranophosphates Support the RNase H Cleavage of Polyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* *9*, 53–60.

- Rajeev, K.G., Nair, J.K., Jayaraman, M., Charisse, K., Taneja, N., O'Shea, J., Willoughby, J.L.S., Yucius, K., Nguyen, T., Shulga-Morskaya, S., et al. (2015). Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *16*, 903–908.
- Raouane, M., Desmaele, D., Gilbert-Sirieix, M., Gueutin, C., Zouhiri, F., Bourgaux, C., Lepeltier, E., Gref, R., Ben Salah, R., Clayman, G., et al. (2011). Synthesis, characterization, and in vivo delivery of siRNA-squalene nanoparticles targeting fusion oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J. Med. Chem.* *54*, 4067–4076.
- Raouane, M., Desmaële, D., Urbinati, G., Massaad-Massade, L., and Couvreur, P. (2012). Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery. *Bioconjug. Chem.* *23*, 1091–1104.
- Van der Ree, M.H., van der Meer, A.J., de Bruijne, J., Maan, R., van Vliet, A., Welzel, T.M., Zeuzem, S., Lawitz, E.J., Rodriguez-Torres, M., Kupcova, V., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res.* *111*, 53–59.
- Rizk, M., and Tüzmen, Ş. (2017). Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. *Pharmacogenomics Pers. Med.* *10*, 267–278.
- Salvatori, R., Woodmansee, W.W., Molitch, M., Gordon, M.B., and Lomax, K.G. (2014). Lanreotide extended-release aqueous-gel formulation, injected by patient, partner or healthcare provider in patients with acromegaly in the United States: 1-year data from the SODA registry. *Pituitary* *17*, 13–21.
- Satake, N., Duong, C., Yoshida, S., Oestergaard, M., Chen, C., Peralta, R., Guo, S., Seth, P.P., Li, Y., Beckett, L., et al. (2016). Novel Targeted Therapy for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate. *Mol. Med.* *22*, 632–642.
- Schoch, K.M., and Miller, T.M. (2017). Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron* *94*, 1056–1070.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. (2002). Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the Drosophila and Human RNAi Pathways. *Mol. Cell* *10*, 537–548.
- Shen, X., and Corey, D.R. (2018). Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* *46*, 1584–1600.
- Singh, N.N., Singh, R.N., and Androphy, E.J. (2007). Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *Nucleic Acids Res.* *35*, 371–389.
- Song, E., Zhu, P., Lee, S.-K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D.M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D.B., Shankar, P., et al. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.* *23*, 709–717.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* *432*, 173–178.
- Stanton, R., Sciabola, S., Salatto, C., Weng, Y., Moshinsky, D., Little, J., Walters, E., Kreeger, J., DiMattia, D., Chen, T., et al. (2012). Chemical modification study of antisense gapmers. *Nucleic Acid Ther.* *22*, 344–359.
- Stein, C.A. (2016). Eteplirsen Approved for Duchenne Muscular Dystrophy: The FDA Faces a Difficult Choice. *Mol. Ther.* *24*, 1884–1885.

- Stein, C.A., Benimetskaya, L., and Mani, S. (2005). Antisense Strategies for Oncogene Inactivation. *Semin. Oncol.* *32*, 563–572.
- Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 285–288.
- Summerton, J.E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity.
- Suresh, G., and Priyakumar, U.D. (2014). DNA–RNA hybrid duplexes with decreasing pyrimidine content in the DNA strand provide structural snapshots for the A- to B-form conformational transition of nucleic acids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *16*, 18148–18155.
- Svyatchenko, V.A., Tarasova, M.V., Netesov, S.V., and Chumakov, P.M. (2012). Oncolytic adenoviruses in anticancer therapy: Current status and prospects. *Mol. Biol.* *46*, 496–507.
- Tajik-Ahmadabad, B., Polyzos, A., Separovic, F., and Shabanpoor, F. (2017). Amphiphilic lipopeptide significantly enhances uptake of charge-neutral splice switching morpholino oligonucleotide in spinal muscular atrophy patient-derived fibroblasts. *Int. J. Pharm.* *532*, 21–28.
- Takahashi, M., Nagai, C., Hatakeyama, H., Minakawa, N., Harashima, H., and Matsuda, A. (2012). Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Res.* *40*, 5787–5793.
- Ts'o, P.O., Miller, P.S., Aurelian, L., Murakami, A., Agris, C., Blake, K.R., Lin, S.B., Lee, B.L., and Smith, C.C. (1987). An approach to chemotherapy based on base sequence information and nucleic acid chemistry. Matagen (masking tape for gene expression). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *507*, 220–241.
- Turner, B.J., Cheah, I.K., Macfarlane, K.J., Lopes, E.C., Petratos, S., Langford, S.J., and Cheema, S.S. (2003). Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *J. Neurochem.* *87*, 752–763.
- Ussery, D.W. (2002). DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd),.
- Valéry, C., Artzner, F., Robert, B., Gulick, T., Keller, G., Grabielle-Madelmont, C., Torres, M.-L., Cherif-Cheikh, R., and Paternostre, M. (2004). Self-Association Process of a Peptide in Solution: From β -Sheet Filaments to Large Embedded Nanotubes. *Biophys. J.* *86*, 2484–2501.
- Verbaan, F.J., Oussoren, C., van Dam, I.M., Takakura, Y., Hashida, M., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., and Storm, G. (2001). The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int. J. Pharm.* *214*, 99–101.
- Vickers, T.A., Wyatt, J.R., Burckin, T., Bennett, C.F., and Freier, S.M. (2001). Fully modified 2' MOE oligonucleotides redirect polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1293–1299.
- Wada, F., Yamamoto, T., Ueda, T., Sawamura, M., Wada, S., Harada-Shiba, M., and Obika, S. (2018). Cholesterol-GalNAc Dual Conjugation Strategy for Reducing Renal Distribution of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* *28*, 50–57.
- Wan, W.B., Migawa, M.T., Vasquez, G., Murray, H.M., Nichols, J.G., Gaus, H., Berdeja, A., Lee, S., Hart, C.E., Lima, W.F., et al. (2014). Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* *42*, 13456–13468.

- Winkler, J., Stessl, M., Amartey, J., and Noe, C.R. (2010). Off-Target Effects Related to the Phosphorothioate Modification of Nucleic Acids. *ChemMedChem* 5, 1344–1352.
- Wolin, E.M., Manon, A., Chassaing, C., Lewis, A., Bertocchi, L., Richard, J., and Phan, A.T. (2016). Lanreotide Depot: An Antineoplastic Treatment of Carcinoid or Neuroendocrine Tumors. *J. Gastrointest. Cancer* 47, 366–374.
- Wood, H. (2018). Motor neuron disease: Benefits of nusinersen extend to later-onset SMA.
- Yang, J., Chen, C., and Tang, X. (2018). Cholesterol-Modified Caged siRNAs for Photoregulating Exogenous and Endogenous Gene Expression. *Bioconjug. Chem.*
- Ye, J., Liu, E., Gong, J., Wang, J., Huang, Y., He, H., and Yang, V.C. (2017). High-Yield Synthesis of Monomeric LMWP(CPP)-siRNA Covalent Conjugate for Effective Cytosolic Delivery of siRNA. *Theranostics* 7, 2495–2508.
- Yu, R.Z., Graham, M.J., Post, N., Riney, S., Zanardi, T., Hall, S., Burkey, J., Shemesh, C.S., Prakash, T.P., Seth, P.P., et al. (2016a). Disposition and Pharmacology of a GalNAc3-conjugated ASO Targeting Human Lipoprotein (a) in Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 5, e317.
- Yu, R.Z., Gunawan, R., Post, N., Zanardi, T., Hall, S., Burkey, J., Kim, T.-W., Graham, M.J., Prakash, T.P., Seth, P.P., et al. (2016b). Disposition and Pharmacokinetics of a GalNAc3-Conjugated Antisense Oligonucleotide Targeting Human Lipoprotein (a) in Monkeys. *Nucleic Acid Ther.* 26, 372–380.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I., and Chattopadhyaya, J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J. Biochem. Biophys. Methods* 48, 189–208.
- Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 280–284.
- Zhao, Y., and Huang, L. (2014). Lipid Nanoparticles for Gene Delivery. *Adv. Genet.* 88, 13–36.
- Zhou, J., and Rossi, J. (2014). Cell-type Specific Aptamer and Aptamer-siRNA Conjugates for Targeted HIV-1 Therapy. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 62, 914–919.
- Zhou, J., Li, H., Li, S., Zaia, J., and Rossi, J.J. (2008). Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1481–1489.
- Zhu, Y., Liang, G., Sun, B., Tian, T., Hu, F., and Xiao, Z. (2016). A novel type of self-assembled nanoparticles as targeted gene carriers: an application for plasmid DNA and antimicroRNA oligonucleotide delivery. *Int. J. Nanomedicine* 11, 399–411.
- Ziouziou, H. (2017). Ciblage de l'interaction hsp27-eIF4E par le composé phénazine et sa nanoformulation: alternative prometteuse pour le traitement des cancers de la prostate résistants à la castration.
- Ziouziou, H., Andrieu, C., Laurini, E., Karaki, S., Fermeglia, M., Oueslati, R., Taieb, D., Camplo, M., Siri, O., Pricl, S., et al. (2017). Targeting Hsp27/eIF4E interaction with phenazine compound: a promising alternative for castration-resistant prostate cancer treatment. *Oncotarget* 8, 77317–77329.

Titre : Synthèses et études d'oligonucléotides amphiphiles à visée thérapeutique

Résumé :

Les oligonucléotides sont de courtes séquences d'acide nucléique qui ont la capacité d'inhiber ou de moduler l'expression d'un gène cible par différents mécanismes. Cependant, leur potentiel thérapeutique est limité par leur faible internalisation. Pour pallier ce problème de vectorisation, il a été envisagé de conjuguer les oligonucléotides à des molécules biocompatibles. Ce travail de thèse porte sur des bioconjugués composés d'un nucléolipide à l'extrémité 5' ou 3' des oligonucléotides.

Tout d'abord, les propriétés physico-chimique et d'hybridation de ces nouveaux composés ont été évaluées. Des études biologiques ont ensuite été réalisées *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'internalisation cellulaire mais aussi de prouver l'efficacité de transfection et d'inhibition de ces conjugués. En outre, le caractère amphiphile de ce type de composé rend possible leur auto-assemblage pour la formulation de substances actives. Dans ce cadre, différentes formulations ont été investiguées.

Ainsi, dans ce travail de thèse une nouvelle technologie d'oligonucléotides conjugués a été développée. La séquence de ces molécules peut être modulée et maîtrisée de manière à l'adapter à la cible thérapeutique visée. Actuellement, ce système est appliqué sur treize projets différents à l'échelle nationale. L'effet thérapeutique est ainsi évalué dans différentes pathologies telles que des cancers hormono-dépendants, des leucémies, des maladies neurologiques chroniques ou encore la résistance aux antibiotiques.

Mots clés : Oligonucléotide, Conjugué, Nanomédecine, Vectorisation

Title: Synthesis and characterization of amphiphilic oligonucleotides for therapeutic application

Abstract:

Oligonucleotides are short nucleic acid molecules able to modulate or inhibit gene expression. However the main drawback of oligonucleotides lies in their poor cellular internalization, which limit their therapeutic applications. Herein, to overcome this limitation, oligonucleotides were conjugated to biocompatible molecules as a nucleolipid to either the 5'- or the 3'-end.

First, physico-chemical properties and binding behaviour of this newly compound were investigated. Then *in vitro* and *in vivo* biological assays were performed to characterize but also understand the cellular internalization pathways and their biological activities. Finally, the amphiphilic nature of the oligonucleotide-nucleolipid confers spontaneously self-assembling properties for drugs loading and vectorization purposes.

This Ph.D. thesis focuses on new oligonucleotide bioconjugates for various biological applications. Sequences of nucleotides can also be modulated to specifically bind to the therapeutic target. This tuneable technology is actually used in 13 different projects, including hormone-dependent cancers, leukemia, chronic neurological disorders and antibiotic resistance, for example.

Keywords: Oligonucleotide, Conjugate, Nanomedicine, Vectorization