



HAL
open science

Ingénierie et auto-assemblage de nano-vecteurs pour la délivrance ciblée de siRNA

Nabila Laroui

► **To cite this version:**

Nabila Laroui. Ingénierie et auto-assemblage de nano-vecteurs pour la délivrance ciblée de siRNA. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT058 . tel-03209993

HAL Id: tel-03209993

<https://theses.hal.science/tel-03209993>

Submitted on 27 Apr 2021

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche

Institut des Biomolécules Max Mousseron UMR 5247

Ingénierie et auto-assemblage de nano-vecteurs pour la délivrance ciblée de siRNA

Présentée par **Nabila LAROUI**

Le 15 Décembre 2020

Sous la direction de
Dr. Nadir BETTACHE
Dr. Sébastien ULRICH

Devant le jury composé de

Dr. Sandrine SAGAN	Directrice de recherche	CNRS UMR 7203 (Paris)	Présidente du jury
Dr. Ling PENG	Directrice de Recherche	CNRS UMR 7325 (Marseille)	Rapporteure
Pr. Chantal PICHON	Professeure	CNRS UPR 4301 (Orléans)	Rapporteure
Dr. Magali GARY-BOBO	Chargée de Recherche	CNRS UMR 5247 (Montpellier)	Membre invitée
Dr. Nadir BETTACHE	Chargé de Recherche	CNRS UMR 5247 (Montpellier)	Directeur de thèse
Dr. Sébastien ULRICH	Chargé de Recherche	CNRS UMR 5247 (Montpellier)	Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Aventure, c'est le terme que j'utiliserais pour décrire ma thèse. Une très belle aventure, qui a été codirigée par le Docteur **Nadir Bettache** et le Docteur **Sébastien Ulrich** à l'institut des Biomolécules Max Mousseron et qui s'est achevée après trois années de recherche effectuées au sein des équipes « Glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique » et « Glycochimie et reconnaissance moléculaire ».

Avant tout, je tenais à formuler mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner mes travaux de thèse. Tout mon respect et ma plus grande gratitude vous sont exprimés. Je remercie le Professeur **Chantal Pichon** et le Docteur **Ling Peng** qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je tiens à remercier également le Docteur **Sandrine Sagan** d'avoir accepté le rôle d'examineur.

Je remercie également les membres du jury du comité de thèse, le Docteur **Jean-Olivier Durand** et le Professeur **Joël Chopineau**, pour m'avoir donné la chance de bénéficier de leur grande expertise. Merci pour tous vos conseils et vos remarques pertinentes qui ont permis de faire avancer mon projet.

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit j'ai compris que la thèse est loin d'être un travail individuel. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes. Leur générosité, leur bonne humeur et leur intérêt à l'égard de ma recherche ont permis de me faire avancer dans ce parcours de « récipiendaire ». Pour cela, je remercie tous les membres de mes deux équipes ainsi que les collaborateurs qui ont participé de près ou de loin à cette thèse.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mes co-directeurs de thèse : **Nadir** et **Sébastien**. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour vos multiples conseils et pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également vous dire à quel point j'ai apprécié votre disponibilité et votre respect des délais serrés de relecture des documents que je vous ai adressés. Cette thèse n'aurait jamais eu une belle image sans vos efforts. C'était un réel plaisir de travailler avec vous. **Nadir**, merci encore une fois de m'avoir tout d'abord accueillie comme étant un membre de ta famille, sans oublier ta gentillesse, ta disponibilité et surtout tes judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Je te remercie d'avoir partagé

avec moi ta passion pour la recherche. Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans toi, alors merci pour tout. Un immense merci à toi **Sébastien**. Même si je n'étais pas chimiste, tu m'as acceptée avec les compétences que je possédais. Tu m'as accueillie dans ton équipe, encadrée et formée. Ta rigueur, ta passion et ta détermination dans le travail sont un exemple pour tous. Merci pour l'opportunité que tu m'as accordée. Grâce à toi, j'ai eu la chance d'acquérir des compétences en chimie qui ont permis d'élargir mes connaissances scientifiques.

A présent, j'exprime toute ma reconnaissance à **Magali**, la chef chef idéale et la machine de guerre qui est toujours à l'écoute, prête à t'aider même si elle est dépassée par le travail. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ma thèse et surtout cette dernière année qui a été plus compliquée que prévu. Courir avec toi à Montmaur était un vrai challenge pour moi, même si je n'ai jamais pu te rattraper en trois ans. Merci pour tes précieux conseils scientifiques et ton grand sens de l'humour qui anime le labo.

Je souhaite également remercier **Marcel** et **Alain** pour votre grande expertise scientifique qui m'a beaucoup apporté.

A **Christophe** a.k.a CNG a.k.a le « plus ou moins » jeune thésard. C'était un réel plaisir de travailler à tes côtés. Mon « desk-mate » qui me faisait rire au moins une fois par jour. C'est bien à cause de toi que la rumeur de bavarde est tombée sur moi... Merci pour tous tes conseils de chimie et ta bienveillance. Je te dédie cette thèse afin de fêter tes « 50 ans » comme il se doit... et n'oublie pas RAM c'est R.A.M.. A **Lamiaa**, Madame tout va bien ! Dès le premier jour, j'ai compris que tu serais la grande sœur que je n'avais pas ici. Travailler avec toi en binôme était un vrai plaisir. Merci pour toutes les connaissances scientifiques que tu m'as transmises et qui ont permis de faire avancer mon projet, merci pour ta positivité, ta bonne humeur et surtout pour « la manip du siècle ».

A **Laure**, ma réelle gestion de stress. Merci d'avoir toujours été de mon côté quand la pression montait. Merci pour tous tes conseils professionnels et personnels. Tu es une femme de caractère et une maman au top. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne l'oublierai jamais. A présent, je souhaite remercier **Morgane** « l'impétrante » qui m'a transmis ses astuces et ses connaissances les plus pointues en termes de culture cellulaire et de rédaction. Je suis très heureuse d'avoir partagé avec toi le statut de thésarde. Merci d'avoir couru à mon rythme de mémé à Montmaur et surtout de m'avoir protégée des chiens... Je te souhaite que du bonheur dans ta vie personnelle, tu as fait le bon choix, sois-en sûre ! « Vive les mariés »

A **Marie**, la femme la plus gentille que j'ai connue, une vraie « Warrior » mais aussi connue pour son empathie pour les oranges-outans. Je te remercie pour toute la bienveillance, ton écoute et ton grand sens de l'humour. Merci pour ton aide précieuse et tout ce que tu m'as appris durant ces années. Grâce à ta détermination, j'ai pu rester plus au moins « fit ». Je n'oublierai jamais nos bons moments ensemble au sport avec Gym Direct. Ne t'inquiète pas, je reviens en force. Un grand merci à **Ilaria**, la renommée pâtissière, l'experte en souris et dans ses temps libres ma diététicienne et ma coach sportive. Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi.

A **Khaled**, le roi des falafels et du taboulet. Sans tes « skills » en informatique, je n'aurai jamais pu entamer la rédaction de ma thèse à temps. Merci pour ton aide en chimie notamment dans toutes les caractérisations MS ainsi que tous tes conseils qui m'ont permis d'avancer dans mes expériences. Je remercie également **Geoffrey**, le geek du labo qui m'a permis d'achever ma rédaction de thèse dans de meilleures conditions grâce à ses supers logiciels. A **Braham**, mon voisin du bureau avec d'excellents goûts musicaux...ou pas. Merci pour tous ces bons moments, je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse.

A **Denis**, Monsieur glouton qui est toujours dans son régime imaginaire. Ne perds pas espoir, tu vas réussir un jour... Je remercie également les dernières recrues de l'équipe : **Kamel** « el profesor » et **Mélanie** la « chef du Mr cuisine » qui nous régalaient tout le temps.

Je remercie, **Corentin**, **Marine** et **Marianne** pour votre sympathie et bonne humeur. **Anastasia** et son amour pour le monde des princesses, merci pour tous tes conseils.

A présent, je tiens à remercier **Yannick**, le boss des peptides. Ton humour m'a fait apprécier chaque journée passée au labo. Merci pour ton aide précieuse pendant mes manipulations en chimie. Je remercie également **Marie L.** pour m'avoir fait bénéficier de sa grande expertise, merci pour tes conseils scientifiques. Je remercie les petits chimistes de l'équipe : **Maëva** pour tout le travail que nous avons accompli ensemble. **Alexandra**, **Emilie**, **Irene**, **Dandan**, **Esteban** et **Dorian** pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Je vous souhaite à tous une bonne continuité dans vos parcours professionnels.

Je remercie également le professeur **Alberto Marra** de m'avoir donné la chance d'assister aux cours de chimie des sucres qui m'ont permis d'élargir mon savoir scientifique. A **Karine** et **Magalie L.** vous êtes des femmes en or, merci pour tout.

A **Chico Do brasil** qui a sauvé mes dernières expériences grâce à ses supers filtres.

A ma famille d'accueil montpelliéraine, la famille **Bettache**, j'aimerais remercier plus particulièrement **Safia** d'avoir été présente tout le temps lors de mon arrivée à Montpellier.

Il m'est impossible de ne pas avoir une immense pensée à ma famille **Laroui** et ma belle-famille **Boukrissa** qui m'ont soutenue et encouragée pendant cette thèse, merci pour tout l'amour que vous me donnez. Vos mots et vos réconforts m'ont permis d'aller jusqu'au bout. Je vous dédie ce modeste travail pour exprimer ma plus profonde reconnaissance et mon amour.

Papa, Maman, je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et qui m'a permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Vous êtes une source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice, je vous aime.... *Vous me manquez énormément....*

A mes sœurs, **Imène** et **Hadjer**, merci pour vos pensées, pour vos messages ainsi que pour les fous rires infinis qui arrivaient à me faire déstresser et oublier la pression du travail. Vous êtes des sœurs en or, restez comme vous êtes. Je vous aime. A **Amine** et **Hakim**, mes beaux-frères, merci pour tous ces moments partagés. Une pensée à mes petits neveux et nièces : **Abdelhadi** et **Manel**, un gros bisou de la part de votre tata Nina.

A mes beaux-parents qui sont toujours présents quand il le faut et qui m'ont toujours encouragée à poursuivre mon parcours professionnel. A mon beau-frère **Aymen** et ma belle-sœur **Sarah**. Vous êtes le sang pour moi, la vraie famille.

A mes tantes, oncles, cousins et cousines maternels et paternels. Merci pour tout, merci d'être toujours présents.

Je remercie également tous mes amis qui étaient toujours là pour moi dans les meilleurs et les pires moments. Une attention particulière à mon amie **Kamar**, ma « roommate » en pharma et mon binôme de choc. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble pendant nos 6 ans de pharmacie et pour les fous rires nocturnes lors des révisions des examens. Je te souhaite que du bonheur dans ta vie professionnelle et personnelle.

Enfin, je finis ces remerciements par toi **Fawzi**, l'homme de ma vie et le mari que j'ai toujours rêvé d'avoir. Depuis le jour où je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu voulais toujours le meilleur pour moi. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés. Merci d'être la personne que tu es. *Je t'aime.*

Liste des publications et communications

Publications :

1. **Laroui N**, Cubedo N, Rossel M, Bettache N. Improvement of Cell Penetrating Peptide for Efficient siRNA Targeting of Tumor Xenografts in Zebrafish Embryos. *Adv. Ther.*, vol. 3, no 2, p. 1900204, févr. 2020.
2. Simon M[≠], **Laroui N[≠]**, Heyraud M, Laconde G, Ali LMA, Boubiaux K, et al. Hydrocarbon-stapled peptide-based nanoparticles for siRNA delivery. *Nanomaterials*, vol. 10, no 12, Art. no 12, déc. 2020.
3. **Laroui N[≠]**, Coste M[≠], Su D, Ali LMA, Bessin Y, Barboiu M, et al. Cell-selective siRNA delivery using glycosylated dynamic covalent polymers self-assembled in situ by RNA-templating. *Angew. Chem. Int. Ed.*, p. anie.202014066, déc. 2020.
4. **Laroui N**, Coste M, Lichon L, Bessin Y, Gary-Bobo M, Pratviel G, et al. Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes. *Int J Pharm.* oct 2019;569:118585.
5. Delorme V, Lichon L, Mahindad H, Hunger S, **Laroui N**, Daurat M, et al. Reverse poly(ϵ -caprolactone)-g-dextran graft copolymers. Nano-carriers for intracellular uptake of anticancer drugs. *Carbohydr Polym.* mars 2020;232:115764.

Communications :

Laroui N et al. Cell-selective siRNA delivery using glycosylated dynamic covalent polymers self-assembled in situ by RNA-templating.

- **Journée de l'école doctorale CBS2** : Poster (31 Mai 2018) Montpellier.
- **Congrès Science Chimique Française** : Poster (2 Juillet 2018) Montpellier.

Laroui N et al. Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes.

- **Congrès Cancéropole Grand Ouest (GSO)** : Communication orale + Poster (21-23 Novembre 2018) La grande Motte Montpellier.
- **Congrès Société française de la nano médecine (SFNano)** : Poster (3-5 Décembre 2018) Montpellier.
- **GSO-journée méditerranée jeune chercheur** : Communication orale (16-18 Octobre 2019) Montpellier.

Résumé

Le développement de thérapies géniques ciblées représente un défi majeur en cancérologie qui se heurte souvent à des problèmes de délivrance. Les systèmes de délivrance actuels génèrent de nombreux effets indésirables, dont beaucoup sont dus à des interactions non spécifiques. Ainsi, l'utilisation de nano-vecteurs pour la délivrance ciblée de siRNA devrait permettre de répondre à ces besoins cliniques. L'objectif général de cette thèse porte sur la conception et l'étude de nano-vecteurs de siRNA pour cibler et traiter des pathologies cancéreuses. Le premier axe de recherche est consacré à l'étude de peptides modifiés pour la délivrance du siRNA. Ce travail de thèse visait à améliorer la vectorisation et l'internalisation du siRNA dans les cellules cibles. Pour cela, deux types de peptides ont été développés : i) des CPP (Cell Penetrating Peptides) fonctionnalisés par une séquence de ciblage dérivée de la laminine—ciblant les cellules du cancer du sein—et ii) des peptides agrafés qui contraignent une structure secondaire en hélice α permettant d'augmenter la résistance à la protéolyse et favoriser l'internalisation cellulaire. Le deuxième axe s'est orienté vers le développement d'une nouvelle génération de vecteurs obtenus par auto-assemblage. Deux stratégies ont été explorées : i) une approche d'assemblage dynamique covalent pour développer des polymères dynamiques covalents (PDC) obtenus par un processus d'adaptation à la cible siRNA et ii) une approche d'assemblage supramoléculaire de porphyrines cationiques induits par le siRNA. La première stratégie a permis, *via* la fonctionnalisation des PDC par du *D*-mannose, de démontrer une vectorisation ciblée de cellules du cancer colorectal et la seconde stratégie a conduit au premier exemple de thérapie duale combinant siRNA et thérapie photo-dynamique basé sur des petites molécules.

Mots-clés : Cancer, siRNA, nano-vecteurs, ciblage thérapeutique, auto-assemblage

Abstract

The development of targeted gene therapies represents a major challenge in oncology that is hampered by delivery issues. Current delivery systems generate many side effects, many of which are due to off-target interactions, and the use of nano-vectors for targeted delivery of siRNA is a promising approach to tackle this challenge. The general objective of this thesis was to design and study original nano-vectors of siRNA for targeting and treating cancer. The first line of research was dedicated to the study of modified peptides for the siRNA delivery. This work aimed to improve the internalization of siRNA in target cells. For this, two types of peptides have been developed: i) CPPs (Cell Penetrating Peptides) functionalized with a targeting sequence derived from laminin – targeting breast cancer cells, and ii) stapled peptides enforcing an α helical secondary structure which endow enhanced stability towards proteolysis and improved cell uptake. The second axis focused on the development of a new generation of nano-vectors obtained by self-assembly. Two strategies have been described: i) a dynamic covalent self-assembly approach to develop Dynamic Covalent Polymers (DCPs) through a siRNA-templated process, and ii) ii) a supramolecular self-assembly approach of cationic porphyrins directed by the templating siRNA. The first strategy led, via functionalization of the DCPs with *D*-mannose, to the targeted delivery of colorectal cancer cells and the second strategy led to the first example of dual therapy combining siRNA and photodynamic therapy achieved using small molecules.

Keywords: Cancer, siRNA, nano-vectors, therapeutic targeting, self-assembly

Table des matières

<i>Liste des publications et communications</i>	5
<i>Avant-propos</i>	11
<i>Abréviations</i>	13
<i>Liste des figures</i>	18
<i>Liste des tableaux</i>	20
<i>Partie I : introduction générale</i>	21
<i>I) Le cancer</i>	22
1. Définition	22
2. Épidémiologie du cancer	23
3. Facteurs de risque.....	24
4. Genèse et développement du cancer	25
5. Traitements actuels contre le cancer	30
5.1. La chirurgie	31
5.2. La radiothérapie.....	31
5.3. La chimiothérapie	31
5.4. Les thérapies ciblées.....	32
5.5. La thérapie photo-dynamique.....	34
5.5.1. Principe et mécanisme.....	34
5.5.2. Utilisation en clinique.....	36
6. Les enjeux scientifiques pour les thérapies anticancéreuses.....	38
<i>II) La thérapie génique : du mécanisme naturel à l'outil de recherche</i>	40
1. Les acides nucléiques comme médicaments.....	41
1.1. L'ADN plasmidique.....	41
1.2. Les oligonucléotides (ON)	42
1.2.1. Les oligonucléotides anti-sense (ASO).....	42
1.2.2. Les oligonucléotides triple hélice (TFO).....	45
1.2.3. Les oligonucléotides agissant sur les protéines.....	45

1.3.	Les ARN	48
1.3.1.	Les ARNm.....	48
1.3.2.	Les ribozymes	50
1.3.3.	Les réplicons	50
1.3.4.	Les saRNA	50
1.4.	Les ARN interférents.....	51
1.4.1.	Les siRNA	53
1.4.2.	Les miRNA.....	62
1.4.3.	Les piRNA.....	65
2.	Les nucléases artificielles pour l'édition du génome	66
3.	Obstacles à la délivrance des acides nucléiques	66
III)	<i>Vectorisation du siRNA</i>	<i>69</i>
1.	Généralités sur le concept de vectorisation.....	69
2.	Méthodes de vectorisation	69
2.1.	Les méthodes physiques.....	69
2.2.	Les vecteurs pour la délivrance du siRNA	72
2.2.1.	Les vecteurs viraux.....	73
a.	Les adénovirus	74
b.	Les virus associés aux Adénovirus AAV	74
c.	Les rétrovirus.....	75
2.2.2.	Les vecteurs synthétiques.....	76
2.2.2.1.	Les conjugués du siRNA.....	76
a.	Conjugaison d'un siRNA à des lipides	77
b.	Conjugaison d'un siRNA à des peptides	78
c.	Conjugaison d'un siRNA à des ligands	79
d.	Conjugaison d'un siRNA à des polymères.....	81
e.	Conjugaison d'un siRNA à des nanoparticules	84
2.2.2.2.	Les complexes supramoléculaires du siRNA	87
a.	Les lipides cationiques	87
b.	Les peptides cationiques.....	90
c.	Les polymères cationiques	94
d.	Les vecteurs auto-assemblés	100
IV)	<i>Ciblage thérapeutique du cancer</i>	<i>104</i>

1. Ciblage passif.....	104
2. Ciblage actif.....	106
2.1. Les carbohydrates	107
2.2. Les peptides	110
2.3. L'acide Foliq (Vitamine B9)	113
2.4. La transferrine	114
2.5. Récapitulatif des agents de ciblage pour la vectorisation de siRNA	115
<i>Partie II : Description des travaux et résultats</i>	<i>117</i>
<i>Chapitre I : Fonctionnalisation de CPP pour la vectorisation ciblée du siRNA</i>	<i>118</i>
1. Contexte et objectif	118
2. Aperçu des principaux résultats	119
3. Conclusion	137
<i>Chapitre II : Stapled peptides pour la délivrance du siRNA</i>	<i>138</i>
1. Contexte et objectifs.....	138
2. Aperçu des principaux travaux	139
3. Conclusion et perspectives.....	160
<i>Chapitre III : Auto-assemblage de polymères dynamiques covalents pour la vectorisation ciblée du siRNA.</i>	<i>162</i>
1. Contexte et objectifs.....	162
2. Aperçu des principaux travaux	164
3. Conclusion et perspectives.....	192
<i>Chapitre IV : Auto-assemblage supramoléculaire de complexes porphyrine-siRNA pour une thérapie duale.</i>	<i>193</i>
1. Contexte et objectifs.....	193
2. Aperçu des principaux travaux	194
3. Conclusion et perspectives.....	206
<i>Partie III : Discussion générale et perspectives</i>	<i>207</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>213</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>259</i>

Avant-propos

Ayant obtenu un doctorat en pharmacie à la Faculté de Pharmacie d'Oran en Algérie, j'ai pu bénéficier d'une bourse de recherche du ministère Algérien de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique qui m'a permis de réaliser cette thèse au sein de l'institut des biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier, où j'ai rejoint les équipes « Glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique » et « Glycochimie et reconnaissance moléculaire », sous la co-direction des Dr. Nadir Bettache et Dr. Sébastien Ulrich.

Une multitude de molécules thérapeutiques sont obtenues grâce à la chimie et aux biotechnologies. A l'heure actuelle, le succès de ces biomédicaments est représenté par la place qu'ils occupent dans le développement clinique avec près de 40% de produits en Europe [1]. Ainsi, l'IBMM a pour mission de développer de nouveaux médicaments et de nouvelles molécules bioactives grâce à son expertise dans les domaines des biomolécules essentielles : lipides, sucres, nucléotides, acides aminés et bio-polymères. Cet institut se situe à la frontière de plusieurs domaines scientifiques qui concernent la synthèse chimique et l'étude des propriétés biologiques, pharmacologiques et toxicologiques des biomolécules essentielles afin d'étudier leur mécanisme d'action et mener les plus prometteuses jusqu'à leur développement clinique.

L'application thérapeutique des acides nucléiques tel que le siRNA (small interfering RNA) nécessite une délivrance intracellulaire efficace et ciblée, pour interagir avec la machinerie d'interférence dans la cellule cible et le tissu responsable de la pathologie. Chacun de ces niveaux de ciblage constitue un obstacle important. Pour surmonter ces barrières, plusieurs stratégies ont été développées, telles que des modifications chimiques de siRNA, des systèmes de délivrance d'acide nucléique viral et non viral. C'est dans cette optique non virale que s'inscrit les activités majeures des équipes « Glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique » et « Glycochimie et reconnaissance moléculaire » présentant ainsi une approche pluridisciplinaire pour développer de nouveaux nanovecteurs et intégrer des cibles biologiques dans un contexte de vectorisation de siRNA pour la thérapie anticancéreuse. En effet, l'utilisation de nanovecteurs multifonctionnels dans le cadre de la vectorisation d'acides nucléiques représente, notamment pour la thérapie anticancéreuse, un traitement du futur.

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance de travailler avec la plupart des collaborateurs des deux équipes, ce qui m'a permis d'élargir mon domaine de connaissances scientifiques et avoir une perception plus claire sur l'utilisation des nano-systèmes, allant de la synthèse chimique jusqu'aux tests biologiques sur lignées cellulaires et même *in vivo* sur des embryons de *zebrafish*. Cette implication m'a permis d'être co-auteur de quatre articles scientifiques, qui sont commentés dans ce manuscrit. Un 5^{ème} article portant sur le développement de nanoparticules délivrant la doxorubicine dans un contexte de chimiothérapie du cancer est également présenté en annexe. Ce travail fait partie d'un projet collaboratif au sein de notre institut, dans lequel j'ai contribué aux expériences de délivrance de drogue et plus particulièrement développé des techniques d'immunofluorescence.

Abréviations

AAV	Adeno-Associated Virus
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdV	Adénovirus
AGO2	Argonaute
AH	Acide hyaluronique
ALA	Acide δ -aminolévulinique
ALAS1	Aminolévulinate synthase 1
AMO	Antagonistes de miRNA
Anti-miR	Antagonistes de miRNA
apoB	Apolipoprotéine B
ARCA	Anti-reverse cap analogue
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASGPR	Récepteur ASialoGlyco-Protein
ASO	Oligonucléotides Anti-sense
ATP	Adénosine triphosphate
AuNP	Nanoparticules d'Or
BAK	Bcl2-antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region- Abelson
BHE	Barrière hématoencéphalique
c-myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CAF	Cancer-associated fibroblast
CBS	Carbosilane
CEA	Carcinoembryonnaire
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHS	Chalcone synthase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNT	Carbon nanotube
CPP	Cell penetrating peptide
CRISPR-Cas	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- Caspase
CuAAC	Cycloaddition catalysées par le cuivre
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCL	Dynamic covalent libraries
DCP	Dynamic covalent polymers
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DLS	Dynamic light scattering
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DOPC	1,2-dioléoyl sn-glycéro-3- phosphatidylcholine
DOPE	Dioléoyl phosphatidyl éthanolamine
DOTMA	N- [1- (2,3 dioléyloxy) propyl-N, N, N-triméthylammonium
dsRNA	Double stranded RNA
EGF	Epidermal Growth Factor
EphA2	Récepteur 2 de l'éphrine de type A
EPR	Effet de perméabilité et de rétention amélioré
EWS – FLI1	Activateur transcriptionnel dans la tumorigenèse de la famille de tumeurs d'Ewing
FDA	Food and drug administration
GalNAc	N-Acetylgalactosamine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Glut-1	Glucose transporter -1
GRO	Oligonucléotide riche en guanine
hATTR	hereditary Transthyretin-mediated Amyloidosis
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
Hsp27	heat shock protein

HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK / STAT	Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KSP/KIF11	kinesin spindle protein /kinesin family member 11
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LMA	Leucémie myéloïde aiguë
LRP/LR	Laminin Receptor Precursor/Laminin Receptor
MEC	Matrice extracellulaire
MF	Mycose fongique
MID	Middle
miRNA	Micro RNA
MNP	Magnetics nanoparticles
MXD3	MAX Dimerization Protein 3
NCI	National Cancer Institute
NCL	Nucléoline
NHS	1-hydroxypyrrolidine-2,5-dione
NIR	Proche infrarouge
NLS	Signal de localisation nucléaire
ON	Oligonucléotides
PAMAM	Polyamidoamine
PAZ	PIWI/Argonaute/Zwille
Pb	Paires de base
PBAVE	Polyvinyl ether
PBG	Porphobilinogène
PCI	Internalisation photochimique
PD1/PDL1	Program death1/ Program death ligand1
PDC	Polymères dynamiques covalents
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFRβ	Platelet-derived growth factor Beta receptor

PDT	Photodynamic therapy
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PI3K / AKT	Phosphatidylinositol-3-Kinase and Protein Kinase B
piRNA	PIWI-interacting RNA
PIWI	P-element-induced Wimpy Testes
PLGA	Polyacide lactique-co-glycolique
PLK1	Polo-like kinase 1
PLL	Poly(L-lysine)
pré-miRNA	Précurseur de miRNA
pri-miRNA	miRNA primaires
PrPc	Cellular prion protein
PS	Photosensibilisateur
PSMA	Prostate specific membrane antigen
PTD	Protein transduction domain
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
QD	Quantum dots
Rb	Retinoblastoma protein
RES	Système réticuloendothélial
RHA	ARN hélicase A
RISC	RNA induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RNAi	Interférence d'ARN
RNP	Ribonucléoprotéine
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography
saRNA	Small activating RNA
SCID-X1	Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
LNP	Lipid nanoparticles

SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SSO	Splice Switching Oligonucleotides
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TAT	Trans-activateur de la protéine de transcription
Tf	Transferrine
TFO	Triplex-forming oligonucleotides
TfR	Récepteur de transferrine
TIL	Lymphocytes infiltrant les tumeurs
TME	Microenvironnement tumoral
TNF- α	Facteurs de nécrose tumorale-alpha
TP53	Tumor protein 53
TRBP	Transactivating Response RNA Binding-Protein
TTR	Transthyréline
TWIST	Twist-related protein
UV	Ultra-violet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZFN	Zinc finger nucleases

Liste des figures

Figure 1 : Répartition mondiale du taux d'incidence de cancer en 2018 [3].	23
Figure 2 : Caractéristiques acquises par la cellule pour devenir tumorale. Adapté de la référence [9].	26
Figure 3 : Rôle de l'IAP dans l'inactivation de l'apoptose [12].	27
Figure 4 : le microenvironnement tumoral [19].	30
Figure 5 : Schéma illustrant la PDT selon le principe du diagramme de Jablonski. Adapté de la référence [28].	35
Figure 6 : Profondeur de la propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus. Adapté des références [33], [34].	36
Figure 7 : Répartitions des essais cliniques en thérapie génique dans le monde [43].	41
Figure 8 : Un aperçu des modifications générales et des différentes générations d'oligonucléotides antisense (ASO) [62].	44
Figure 9: Illustration du saut d'exon de l'ARNm de Bcl-x [65].	45
Figure 10 : Le principe générale du processus SELEX [73].	46
Figure 11 : Mécanisme d'action des leurres d'ADN [62].	47
Figure 12 : Phénomène de twitching : Inhibition du gène codant pour le mouvement musculaire normal par l'introduction de l'ARN double brin [103].	52
Figure 13 : Structure du siRNA. Adapté de la référence [106].	53
Figure 14 : La voie d'interférence du siRNA. Adapté de la référence [127].	56
Figure 15 : La phase nucléaire et cytoplasmique de la biogenèse des miRNA. Adapté de la référence [167].	63
Figure 16 : Mécanisme de régulation de l'extinction génique par l'interférence à ARN [181].	65
Figure 17 : Les barrières biologiques rencontrées après la délivrance du siRNA [190].	67
Figure 18: Les vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique dans le monde jusqu'à décembre 2019 [207].	73
Figure 19: Les différentes classes de vecteurs viraux utilisés pour la délivrance d'ARN interférents. Adapté de la référence [208].	73
Figure 20: La structure chimique du conjugué cholestérol siRNA. Adapté de la référence [232].	77

Figure 21: Stratégie de conjugaison CPP-siRNA par des liaisons stables ou des liaisons clivables. Adapté de la référence [240].	79
Figure 22: Les composants critiques du Poly conjugué dynamique de siRNA proposé par Rozema et al. Adapté de la référence [255].	83
Figure 23 : Liposome cationique et siRNA formant un lipoplexe par liaison électrostatique. Adapté de la référence [283].	89
Figure 24 : Schéma représentatif des Stapled peptides. Adapté de la référence [313].	93
Figure 25 : L'influence de la masse molaire de B-PEI sur la stabilité, la formation et l'internalisation des polyplexes à base de siRNA [324].	96
Figure 26: Stratégie du système dynamique covalent [354].	102
Figure 27 : Principe de polymérisation oxydative assistée par le siRNA : formation de Nanocaplets/siRNA associés à la transferrine. Adapté de la référence [358].	103
Figure 28 : Ciblage actif et passif par les nanoparticules. Adapté de la référence [369].	105
Figure 29: Structure du récepteur mannose. Adapté de la référence [379].	108
Figure 30: Schéma représentatif du récepteur laminine 37/67 kDa [399]	112
Figure 31: Structure chimique de l'acide folique.	113
Figure 32 : Représentation schématique de stapled peptides pour la délivrance de siRNA ..	160
Figure 33 : Schéma représentant l'assemblage dynamique covalent des 2 générations de PDC pour la complexation de l'ADN et la délivrance du siRNA.	163
Figure 34 : Représentation schématique des tétra-peptides Ald1, Ald2 et Ox-Arg3-Hyd.....	164
Figure 35 : Synthèse des acides aminés modifiés : a) Fmoc-L-Lys [acide N-4-pentynoïque] -OH. b) Fmoc-L-Lys [Boc-L-Ser (OtBu)] -OH.	166
Figure 36 : Représentation schématique de la thérapie combinée : PDT et thérapie d'interférence	194
Figure 37 : Les différents nano-vecteurs pour la délivrance de siRNA utilisé dans cette étude.	208

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des agents chimio-thérapeutiques selon leurs mécanismes d'action.	32
Tableau 2 : Exemples de photosensibilisateurs utilisés en clinique dans le traitement du cancer.	37
Tableau 3: Liste non exhaustive des essais cliniques utilisant des vaccins d'ARNm pour le traitement du cancer.	49
Tableau 4 : les différentes modifications chimiques du siRNA.....	57
Tableau 5: Une sélection d'essais cliniques en cours utilisant la stratégie siRNA.....	62
Tableau 6: Exemples de systèmes d'administration de siRNA à base de CPP formant des complexes par liaison électrostatique.....	93
Tableau 7 : Liste non exhaustive des différents systèmes de ciblage actif pour la vectorisation du siRNA.....	116

Partie I : introduction générale

Introduction générale

L'introduction générale de la thèse présente dans une première partie le cancer en décrivant la physiopathologie, les statistiques mondiales et les thérapies actuelles. La partie 2 concerne la thérapie génique comme thérapie potentielle pour le cancer. La partie 3 décrit les différents vecteurs utilisés pour la délivrance de siRNA dans un contexte de thérapie anticancéreuse. Enfin dans la dernière partie de l'introduction, nous nous sommes intéressés aux différents ciblage thérapeutiques du cancer.

I) Le cancer

1. Définition

Le cancer est une pathologie qui se manifeste par la prolifération rapide et anarchique des cellules échappant aux mécanismes physiologiques régulés d'apoptose et de croissance cellulaire. Ces cellules cancéreuses peuvent envahir le tissu sain environnant, mais aussi se diffuser dans d'autres organes sous forme de métastases, ce qui conduit souvent à des formes graves de cancer difficiles à traiter avec les technologies actuelles.

Le cancer regroupe plusieurs types de tumeurs malignes qui se différencient entre elles en fonction du tissu dans lequel elles se répandent.

- Les lymphomes qui se développent dans les ganglions et vaisseaux lymphatiques.
- Les leucémies qui se développent dans la moelle osseuse.
- Les sarcomes sont des cancers développés à partir des tissus conjonctifs, principalement les muscles et les os.
- Les carcinomes apparaissent à partir de l'épithélium, au niveau du revêtement interne ou externe de certains organes (peau, poumon, œsophage...).
- Les adénocarcinomes apparaissent également à partir de l'épithélium mais sont d'origine glandulaire avec fonction sécrétrice (sein, prostate, côlon...) [2].

2. Épidémiologie du cancer

Selon « Global Cancer Statistics », le cancer est un problème majeur de santé publique. Il constitue la deuxième cause de décès dans le monde, avec 18.1 millions de cas et 9.6 millions de décès recensés en 2018 [3] (Figure 1).

En France, 382 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2018 (54% chez les hommes et 46% chez les femmes) et 157 400 décès ont été enregistrés [4].

Chez l'homme, le cancer de la prostate est considéré comme le plus fréquent (50 430 nouveaux cas estimés en 2015), devant le cancer du poumon (31 231 cas estimés en 2018) et le cancer colorectal (23 216 cas estimés en 2018). Chez la femme, c'est le cancer du sein qui est le plus répandu (58 459 cas estimés en 2018), devant le cancer colorectal (20 120 cas) et le cancer du poumon (15 132 cas).

En termes de mortalité, le cancer du poumon prend la première place chez l'homme (22 761 décès en 2018), devant le cancer colorectal (9 209 décès) et le cancer de la prostate (8 115 décès). Chez la femme, le cancer du sein est la première cause de décès (12 146 décès), devant le cancer du poumon (10 356 décès) et le cancer colorectal (7 908 décès) [5].

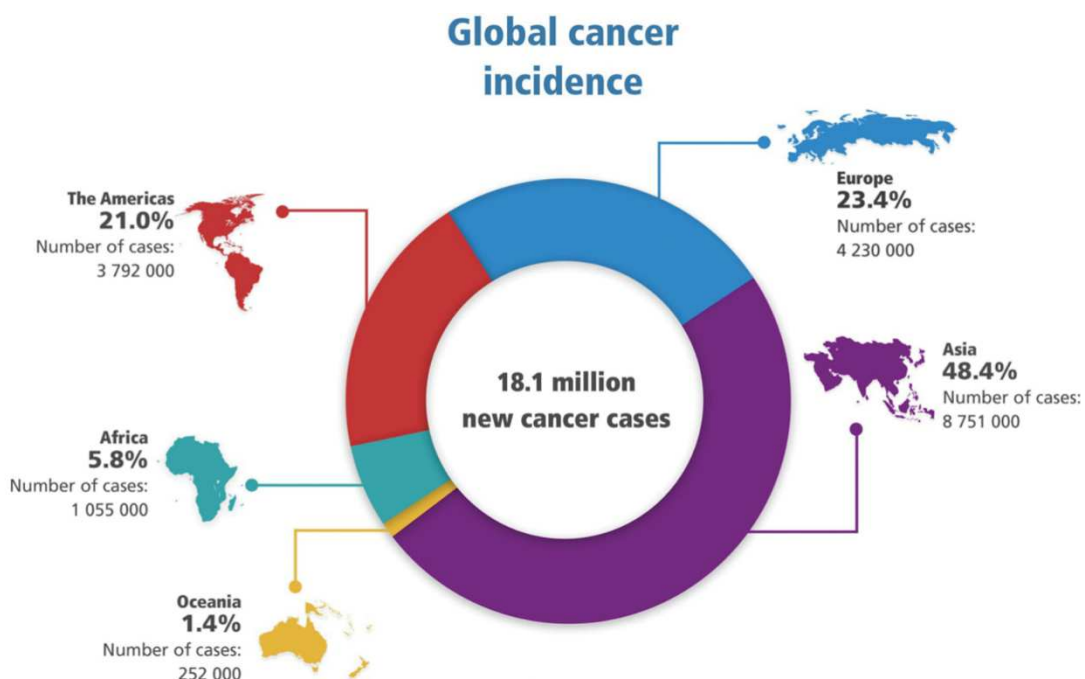


Figure 1 : Répartition mondiale du taux d'incidence de cancer en 2018 [3].

3. Facteurs de risque

Le risque de développer un cancer dépend de nombreux facteurs qui sont globalement similaires dans le monde. Cependant leurs prévalences varient selon la région et le pays, c'est en partie pourquoi les taux globaux d'incidence du cancer et les types de cancer les plus courants varient également selon la région et le pays.

Les facteurs de risque de cancer sont initialement identifiés dans les études épidémiologiques où les scientifiques comparent les personnes cancéreuses aux personnes saines. Parmi ces facteurs de risque on retrouve [6], [7] :

- L'âge avancé, qui est le facteur de risque le plus important pour le cancer en général et pour de nombreux types de cancer individuels. Les études épidémiologiques du NCI (National Cancer Institute) montrent que l'âge médian d'un diagnostic de cancer est de 66 ans.
- La consommation d'alcool, qui peut augmenter le risque de cancer de pancréas, de l'œsophage, du larynx, du foie et du sein. La consommation d'alcool est à l'origine d'environ 6% des décès dans le monde. Le risque de cancer est amplifié pour ceux qui combinent l'alcool et le tabac.
- Le tabagisme, qui est une des principales causes de néoplasie du poumon, d'urothélium vésicale et de décès par ces cancers. Les personnes qui sont régulièrement à proximité de la fumée de tabac ambiante (tabagisme passif) ont un risque accru de cancer, car les fumées secondaires de tabac contiennent de nombreux produits chimiques qui endommageraient l'ADN.
- Les personnes obèses, qui peuvent avoir un risque accru de plusieurs types de cancer, y compris les cancers du sein chez les femmes en post ménopause, du côlon, du rectum, de l'endomètre, des reins, du pancréas et de la vésicule biliaire.
- Le rayonnement ionisant qui a suffisamment d'énergie pour endommager l'ADN et provoquer le cancer. Le rayonnement ionisant comprend le radon, les rayons X, les rayons gamma et d'autres formes de rayonnement à haute énergie.
- L'exposition aux rayons ultra-violet UV, (soleil, lampes solaires...) qui provoque un vieillissement précoce de la peau et des lésions cutanées pouvant entraîner un mélanome.

- Les œstrogènes, qui sont des cancérigènes connus chez l'homme. Bien que ces hormones jouent un rôle physiologique essentiel chez les femmes et les hommes, elles ont également été associées à un risque accru de certains cancers.
- Certains agents infectieux, notamment les virus (papillomavirus 16 et 18), les bactéries et les parasites (la bilharziose), qui sont considérés comme facteurs de risque cancérigène. Certains virus peuvent perturber la signalisation entraînant une croissance et une prolifération cellulaire incontrôlée. De plus, certaines infections affaiblissent le système immunitaire.

Le facteur héréditaire, l'inflammation chronique, les substances chimiques telles que l'amiante, le benzène, le formaldéhyde peuvent également augmenter le risque de développement d'un cancer.

4. Genèse et développement du cancer

Le développement du cancer ou cancérogenèse est l'ensemble des phénomènes qui transforment les cellules saines en cellules cancéreuses. Ce processus s'effectue en 3 étapes : initiation, prolifération et progression. Ce concept a été démontré pour la première fois par Berenblum et Schubik en 1948 [8].

La phase dite d'**initiation** peut être provoqué par un agent dit mutagène ou oncogène entraînant une mutation génétique irréversible au niveau de la cellule saine. Ces modifications du génome n'ont pas d'effet détectable et peuvent rester inapparentes pendant une longue période. À ce niveau, la cellule initiatrice ne répond plus à sa fonction biologique et par conséquent a acquis la capacité de se diviser à l'infini en dépassant la limite de Hayflick « cellules immortelles et très prolifératives ».

Cette cellule dite dorénavant cancéreuse a développé 6 critères spécifiques qui ont été identifiés par Hanahan et Weinberg [9], [10] (Figure 2).

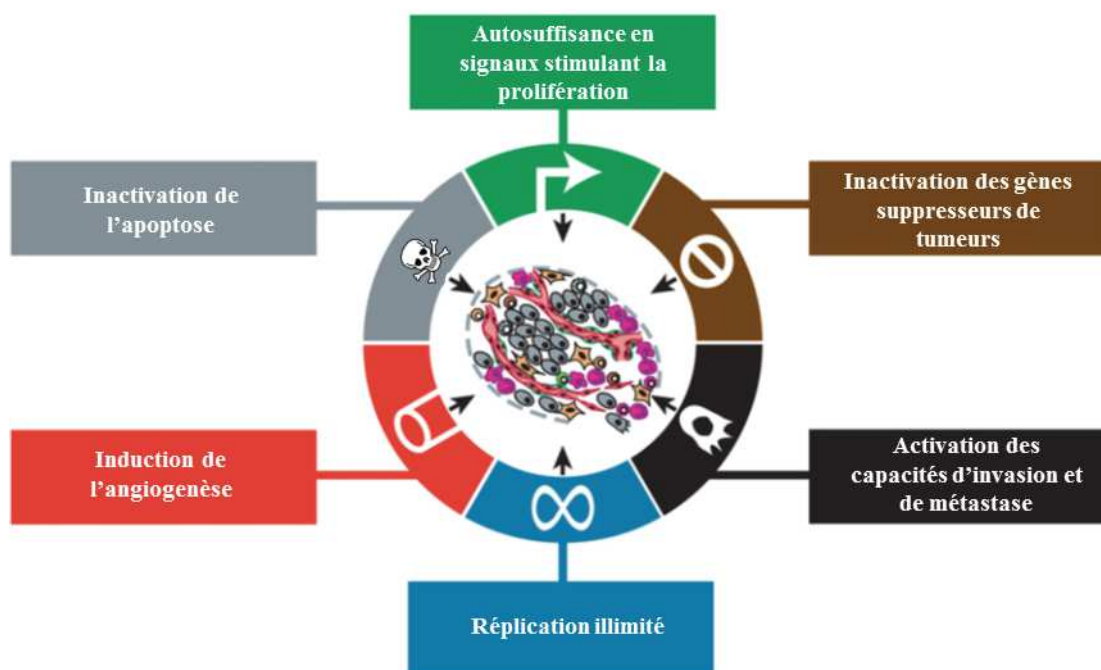


Figure 2 : Caractéristiques acquises par la cellule pour devenir tumorale. Adapté de la référence [9].

La première caractéristique acquise est **l'autosuffisance en signaux stimulant la croissance cellulaire**. En effet, à la différence de la cellule saine, la cellule cancéreuse est capable d'auto-sécréter des facteurs de croissance essentiels à sa prolifération rapide tels que le « platelet-derived growth factor » PDGF ou le « transforming growth factor » TGF α . De plus, les cellules tumorales surexpriment des récepteurs de ces facteurs de croissance afin d'être plus hypersensibles.

Les cellules cancéreuses peuvent **inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs**, en effet, elles deviennent insensibles aux mécanismes de retro-contrôle négatif.

Les protéines TP53 « Tumor protein 53 » et RB « Retinoblastoma protein » permettent la régulation du cycle cellulaire et déclenchement de l'apoptose pour les cellules saines, cependant les cellules tumorales échappent à ce processus par divers mécanismes. Nous y reviendrons plus tard.

Le troisième critère est **la résistance à la mort programmée des cellules**. L'apoptose est un processus physiologique cellulaire déclenché dans une situation de stress (hypoxie, acidification du pH intracellulaire...). Ce mécanisme hautement régulé est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.

L'apoptose se caractérise par un équilibre entre les facteurs pro et anti-apoptotiques. BAX et BAK font partie des protéines pro-apoptotiques qui permettent une fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine entraînant la libération du cytochrome C ; un activateur des caspases. Enfin, ce processus s'achève par une formation de fragments cellulaires appelés corps apoptotiques.

A contrario, la protéine Bcl-2 fait partie des facteurs anti-apoptotiques, son rôle est de se fixer sur les protéines pro-apoptotiques (BAX, BAK) afin d'assurer l'équilibre et la régulation de croissance cellulaire. La cellule tumorale entraîne une dérégulation de l'homéostasie favorisant le côté anti-apoptotique. Ceci dit, le mécanisme demeure complexe, Roy *et al.* [11] ont démontré que les IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) permettent d'inactiver l'apoptose en inhibant la caspase 3 et la caspase 7 ; des protéases à cystéine (Figure 3).

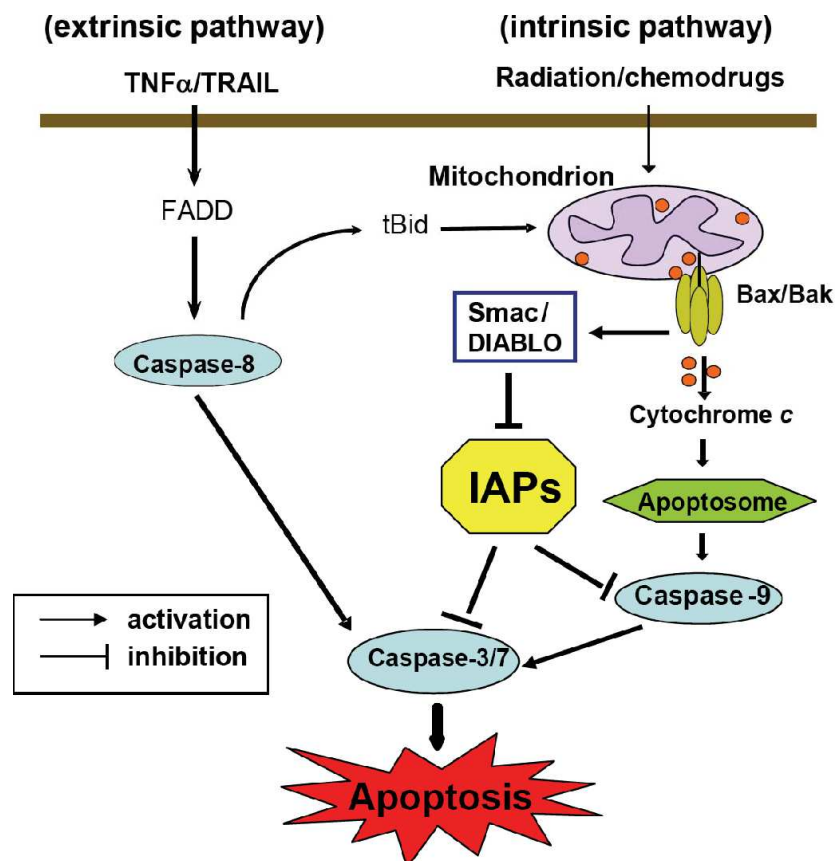


Figure 3 : Rôle de l'IAP dans l'inactivation de l'apoptose [12].

De plus, derrière ces trois critères cités précédemment, la cellule cancéreuse acquiert la capacité de **réplication illimitée**, à l'inverse des cellules saines qui quant à elles, se multiplient avec un nombre limité et ensuite passent en apoptose ou en sénescence, les cellules tumorales sont « immortelles ».

À ce stade, la cellule cancéreuse passe en phase de **prolifération** ou promotion qui peut être amplifiée par des agents dits promoteurs (ester de phorbol par exemple), on parle maintenant de dysplasie suivie de carcinome *in situ* car la membrane basale n'est pas altérée et la tumeur reste localisée.

À cette étape, la tumeur acquiert le critère **d'induction de néo-angiogénèse**. En effet, les tumeurs présentent une variation importante au niveau de la structure et des propriétés des vaisseaux sanguins angiogéniques. Afin d'assurer tous les besoins en apport et l'élimination de déchets, la tumeur stimule la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Pour se faire, elles sécrètent des facteurs angiogéniques tel que VEGF (Vascular endothelial growth factor) permettant la prolifération rapide des cellules endothéliales [13], [14].

Ce critère reste indispensable pour la tumeur afin de passer à la phase de **progression**. En effet, l'induction d'angiogénèse accorde à la tumeur **une capacité de métastase et d'invasion**. La cascade métastatique représente un processus multi-étapes qui comprend l'invasion au niveau local des cellules avoisinantes, l'entrée dans le système vasculaire suivie de la sortie des cellules cancéreuses de la circulation et la colonisation au niveau des sites distaux [15]. Pour résumer, ce processus implique : i) La grande capacité de migration cellulaire par le biais des modifications du cytosquelette. ii) La production de collagènes, laminines... entraînant une modification de dégradation/production de matrice extracellulaire. iii) La diminution de la cohésion cellulaire par l'effet des cadhérines.

De récents progrès ont ajouté deux caractéristiques émergentes à cette liste. Cependant l'idée est encore controversée quant à leur véritable implication dans le développement tumoral, comparée à celles des six autres critères.

Le premier critère émergent est **la reprogrammation du métabolisme énergétique** : En effet, la prolifération cellulaire souvent incontrôlée implique non seulement un contrôle dérégulé de la prolifération cellulaire, mais également des modifications du métabolisme énergétique afin d'alimenter la croissance et la division cellulaire. Dans des conditions d'aérobie, les cellules normales transforment le glucose en pyruvate par glycolyse et ensuite en dioxyde de carbone dans les mitochondries. Dans des conditions d'anaérobie, la glycolyse est favorisée et relativement peu de pyruvate est envoyé vers les mitochondries consommatrices d'oxygène.

Paradoxalement, les cellules cancéreuses transforment le glucose en pyruvate beaucoup plus dans les conditions d'anaérobie.

Cette observation a été nommée l'effet de Warburg [16]. La transformation du pyruvate en acide lactique est très faible en apport d'énergie contenue dans le glucose par rapport à la respiration. Étonnamment, la prolifération cellulaire rapide dans les cellules cancéreuses consomme beaucoup d'énergie. Ces cellules compensent le mauvais rendement énergétique de la fermentation en augmentant considérablement l'entrée de glucose dans la cellule grâce à la surexpression du transporteur de glucose [Glut-1].

Le deuxième critère émergent est **la résistance à la destruction immunitaire** : dans certains types de tumeurs dits non immunogènes, les cellules cancéreuses arrivent à échapper à la surveillance du système immunitaire de différentes manières. Notamment, l'absence de production du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité), ce qui cause une abolition de présentation d'antigènes à leur surface. De ce fait, les cellules cancéreuses deviennent invisibles et ne peuvent plus être éliminées par les lymphocytes effecteurs. On pourra donc considérer que l'échappement à la réponse immunitaire est un critère important acquis par la cellule initiatrice.

- **Microenvironnement tumoral**

Les cancers ne sont pas seulement des masses de cellules malignes, mais aussi des organes très complexes. En effet, la tumeur n'agit pas seule, de nombreuses autres cellules sont recrutées et peuvent être corrompues par les cellules transformées. Les interactions entre les cellules malignes et non transformées créent le microenvironnement tumoral (TME) ou stroma [10], [17], [18].

Les éléments cellulaires du stroma sont essentiellement : les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires telles que les macrophages. Sous des conditions d'hypoxie, les tumeurs sécrètent des facteurs tels que les VEGF afin de stimuler les cellules endothéliales nécessaires à l'angiogenèse. De plus, en sécrétant le PDGF, la tumeur peut activer les fibroblastes et les transformer en CAF (cancer associated fibroblasts) favorisant ainsi la prolifération et la survie tumorale (Figure 4).

La matrice extra cellulaire (MEC) est la charpente du stroma tumorale, elle est constituée principalement de protéines et glycoprotéines comme la laminine, l'élastine, le collagène... mais également des facteurs de croissances tels : TGF α qui assisterait la croissance et l'invasion cellulaire.

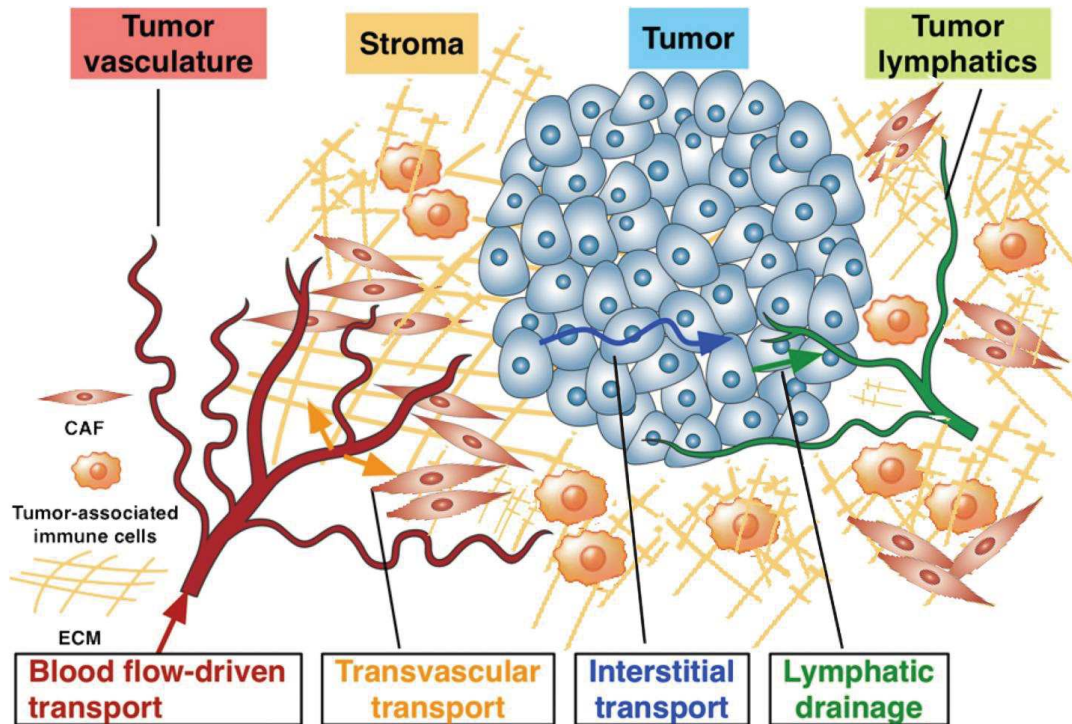


Figure 4 : le microenvironnement tumoral [19].

Dans ce contexte, le microenvironnement tumoral joue un rôle primordial dans l'inactivation du système immunitaire. En effet, les points de contrôle immunitaires et leurs ligands correspondants tels que PD1/PDL1 (Program death1/ Program death ligand1) sont fréquemment surexprimés dans le microenvironnement tumoral de diverses tumeurs malignes [20]. Ils représentent des barrières importantes pour l'induction d'une réponse immunitaire efficace anti-tumorale. Ainsi, les interactions entre les points de contrôle immunitaires et leurs ligands inactiveraient les lymphocytes T impliqués dans les réponses immunitaires [20].

5. Traitements actuels contre le cancer

Le dépistage du cancer correspond à la meilleure solution de prévention et de prise en charge précoce de cette pathologie. Les programmes de dépistage varient selon le type de cancer, je citerai l'exemple du cancer du sein où le dépistage consiste à réaliser une mammographie chaque 2 ans suivie d'un examen clinique à partir de 45 ans.

Une fois que le diagnostic du cancer est confirmé, on a recours à plusieurs types de traitements qui seront adaptés à chaque cas.

5.1. La chirurgie

Lorsque la tumeur le permet, la chirurgie reste le traitement de choix. On l'appelle : tumorectomie. Ce traitement consiste à une ablation partielle ou totale de la tumeur et des tissus voisins comprenant d'éventuels ganglions lymphatiques. Cette thérapie est souvent suivie de radiothérapie et/ou de chimiothérapie afin d'éradiquer les cellules cancéreuses résiduelles. Elle peut être également précédée de ces deux derniers traitements dans le but de réduire la masse tumorale.

5.2. La radiothérapie

Cette thérapie utilise des rayonnements ionisants qui permettent la destruction locale des cellules cancéreuses. À fortes doses, la radiothérapie élimine les cellules cancéreuses ou ralentit leur croissance en endommageant leur ADN. Ce processus entraîne un arrêt de division ou une mort cellulaire. Cependant, la radiothérapie peut générer des effets secondaires en affectant les tissus sains environnant par les radiations.

5.3. La chimiothérapie

Ce traitement consiste à administrer un ou plusieurs médicaments anticancéreux (agents chimio-thérapeutiques) par voie systémique afin de lutter contre le développement des cellules néoplasiques ou de provoquer leurs destructions. Selon le mécanisme d'action, il existe 4 classes d'agent chimio-thérapeutique (Tableau 1).

	Exemples de molécule	Mécanisme d'action
Les agents alkylants	- Cisplatine (Cisplatyl®) -Chlorambucil (Chloraminophène®) -Carmustine (Bicnu®)	Intercalants de l'ADN, s'insèrent entre les brins d'ADN et créent des liaisons inter-brins formant des radicaux alkyles, qui empêchent le processus de réplication d'ADN
Les modificateurs de l'ADN	-Doxorubicine (Adriblastine®) -Topotecan (Hycamtin®)	Inhibiteurs des enzymes topoisomérases qui maintiennent la structure de l'ADN.
Les antimétabolites	- Pentostatine (Nipent®) -5-Fluorouracile (Fluorouracile®)	Substituent les nucléotides naturels utilisés pour la synthèse d'ADN par d'autres nucléotides synthétiques similaires mais inefficaces, qui empêchent la division cellulaire.
Les poisons du fuseau	-Vinblastine (Velbe®) -Paclitaxel (Taxol®)	Antimitotiques, qui empêchent la formation du fuseau chromatique. Ainsi, les cellules restent bloquées au stade de la mitose et ne peuvent plus se diviser.

Tableau 1: Classification des agents chimio-thérapeutiques selon leurs mécanismes d'action.

La chimiothérapie est efficace sur les cellules qui se développent et se divisent activement. Cependant, elle ne fait pas la différence entre les cellules cancéreuses et les cellules normales à profil de division rapide (qui se retrouvent dans les follicules pileux par exemple), ce qui engendre de nombreux effets secondaires sévères et rend ainsi nécessaire le développement de thérapies ciblant sélectivement les tissus et cellules cancéreuses [21].

5.4. Les thérapies ciblées

À l'heure actuelle, les thérapies ciblées utilisées en cancérologie reposent sur des substances qui bloquent la croissance et la prolifération du cancer en interférant avec des molécules

spécifiques considérées comme les cibles moléculaires. À la différence de la chimiothérapie, les thérapies ciblées agissent sur des mécanismes oncogéniques comme des cibles moléculaires associées à la cellule cancéreuse ou au stroma.

- **L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie consiste à utiliser des molécules qui réduisent la quantité d'hormones dans le corps en bloquant leurs récepteurs spécifiques afin de ralentir ou d'arrêter la croissance du cancer. Ce type de thérapie n'est spécifique qu'aux tumeurs hormonosensibles comme le cancer du sein dont la croissance est stimulée par les hormones telles que les œstrogènes ou la progestérone.

Le premier traitement anticancéreux ciblé développé fut le tamoxifène (Nolvadex®) dans les années 1970 [22]. Le tamoxifène se lie au récepteur des œstrogènes modulant par conséquence son activité.

L'hormonothérapie peut être combinée à d'autres traitements, elle permet la réduction de la taille d'une tumeur avant la chirurgie. C'est ce qu'on appelle la thérapie néo-adjuvante.

- **L'immunothérapie**

L'immunothérapie consiste à utiliser le système immunitaire pour éliminer les cellules cancéreuses. Ce système immunitaire a la capacité de détecter les cellules tumorales comme des envahisseurs pour l'organisme et les détruire. Cependant les cellules tumorales sont capables de détourner les points de contrôle des cellules immunitaires en se liant à ces cellules immunitaires *via* des récepteurs spécifiques entraînant l'inactivation de la cellule immunitaire. L'immunothérapie apprend au système immunitaire à les reconnaître et à les détruire grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle qui vont permettre l'activation de la cellule immunitaire et par conséquent l'élimination des cellules tumorales.

La deuxième stratégie d'immunothérapie repose sur le ciblage des cellules cancéreuses. Ce traitement consiste à l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui ciblent directement les cellules tumorales afin de bloquer leur croissance et de les détruire. Dans le cas du cancer du sein HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) positif, les cellules cancéreuses vont surexprimer le récepteur HER2 (un récepteur au facteur de croissance EGF) qui peut être essentiellement activé à cause d'une substitution d'une valine par un acide glutamique dans le domaine

transmembranaire [23]. L'immunothérapie dans ce cas vise à bloquer les signaux cellulaires déclenchés par la surexpression de ce récepteur HER2.

Le Trastuzumab (Herceptin®) a été la première molécule mise sur le marché. C'est un anticorps monoclonal bloquant la partie extracellulaire du récepteur HER2 [24], [25].

Cependant, des limitations ont été observées lors des thérapies ciblées : i) Certaines cibles moléculaires spécifiques des cellules tumorales n'ont pas été encore identifiées. Cependant certaines tumeurs ne bénéficient pas de thérapie ciblée. ii) Apparition d'effets secondaires mais qui restent moins sévères que la chimiothérapie (problème d'hypertension, de coagulation...). iii) Des phénomènes de résistance peuvent se développer aux médicaments ciblés entraînant une perte totale d'efficacité du traitement.

5.5.La thérapie photo-dynamique

5.5.1. Principe et mécanisme

La thérapie photo-dynamique (PDT) est une méthode alternative pour le traitement ciblé d'une variété de maladies qui nécessitent l'éradication de cellules pathologiques. Ce concept est né au début du XX^{ème} siècle avec les travaux de Niels Finsen [26]. Cependant, l'application de la PDT pour le traitement anticancéreux est récente.

La PDT est un processus qui nécessite d'abord l'exposition du tissu cancéreux à un photosensibilisateur (PS) comme des porphyrines par exemple, administré par voie topique ou intraveineuse, selon l'emplacement des tissus ciblés [27]. Le PS s'accumule plus au moins spécifiquement dans les cellules cancéreuses et la zone tumorale est par la suite irradiée avec de la lumière à une longueur d'onde d'excitation du PS.

La photo-activation du PS est à l'origine d'une cascade de réaction [28]:

- 1- Les photons d'énergie sont absorbés par le PS qui est alors excité et stimulé de l'état fondamental (S_0) à l'état excité (S_n) de niveau d'énergie supérieur.
- 2- Le PS va ensuite repasser à un état singulet excité (S_1) de plus basse énergie que S_n . Cet état est très court ; de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-7} seconde. Une conversion vers un « état triplet » qui possède une durée de vie plus longue de l'ordre de 10^{-6} à 1 seconde se produit alors.
- 3- Enfin, le retour à l'état fondamental se passe suivant deux mécanismes possibles : i) radiatif, en émettant un photon ou ii) non-radiatif en transférant l'excès d'énergie aux

molécules avoisinantes. Ce dernier processus peut se produire suivant deux types de réactions qui conduisent à la production d'espèces cytotoxiques :

- i) Les réactions d'oxydoréduction indirecte de **type I** où le PS réagit avec les biomolécules, par un transfert d'atome d'hydrogène (électron) afin de former des radicaux. Ces derniers réagissent avec l'oxygène moléculaire pour générer d'espèces réactives oxygénées (ROS), conduisant ensuite à la production d'un stress oxydatif et finalement à la mort cellulaire.
- ii) Les réactions de **type II** qui transfèrent directement l'énergie à l'oxygène dans la cellule pour former l'oxygène singulet (1O_2) (un sous-ensemble de ROS) (Figure 5).

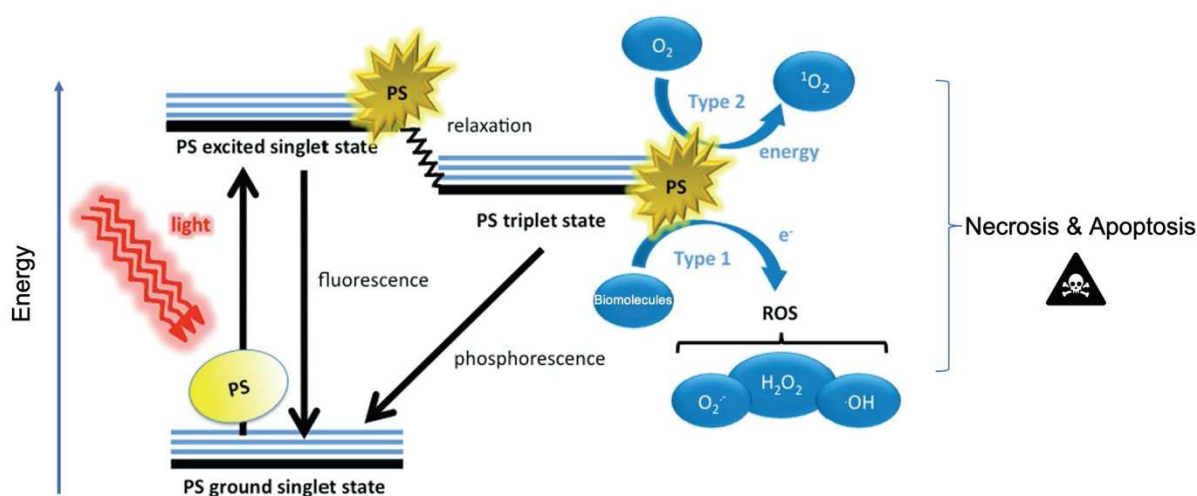


Figure 5 : Schéma illustrant la PDT selon le principe du diagramme de Jablonski. Adapté de la référence [29].

Les réactions de type I et de type II peuvent se produire simultanément et de manière compétitive et le rapport entre ces processus dépend du type du PS utilisé et des concentrations de substrat et d'oxygène. La réaction de type II semble cependant jouer un rôle central dans la cytotoxicité, en raison de l'interaction très efficace de l'oxygène singulet avec diverses biomolécules. L'oxygène singulet (1O_2) a une durée de vie inférieure à $3,5 \mu\text{s}$ en milieu aqueux et ne peut diffuser que $0,01\text{--}0,02 \mu\text{m}$ pendant cette période [30]. Néanmoins, il est très toxique pour les cellules car il est responsable de l'oxydation d'acides aminés et des lipides membranaires insaturés conduisant à une destruction des organites et des membranes plasmiques et par conséquent à une mort cellulaire par nécrose [31]. En outre, l'oxygène singulet peut être responsable du relargage du cytochrome C dans la

mitochondrie qui activerait le phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée dont le mécanisme est plus lent que celui de la nécrose) [32].

La PDT agirait également sur la vascularisation tumorale en privant la tumeur d'oxygène et de nutriments nécessaires à sa survie. Ce qui va induire une réponse inflammatoire et immunitaire contre les cellules cancéreuses et les métastases éventuelles [33].

5.5.2. Utilisation en clinique

La PDT a été appliquée à une variété de tissus accessibles à la lumière, y compris la peau, la rétine, l'arbre bronchique et la majorité du tractus gastro-intestinal pour le traitement des cancers [28]. Ainsi, le PS est l'élément crucial de la PDT, il doit être localisé sur le site de l'action photodynamique, absorber les longueurs d'onde appropriées de la lumière et produire la réponse biologique souhaitée. En fonction de sa longueur d'onde d'excitation, plusieurs paramètres, notamment l'efficacité de la PDT peuvent changer. En effet, à des longueurs d'onde visibles plus courtes (lumière bleue), l'efficacité peut être limitée en raison de la faible pénétration tissulaire ainsi que des dommages d'ADN qui peuvent être produits. Pour cela, il est préférable que le PS absorbe la lumière dans le rouge ou le proche infrarouge (600 – 800 nm) afin de traiter les tissus cancéreux plus en profondeur (jusqu'à 3 mm voir plus) [33] (Figure 6).

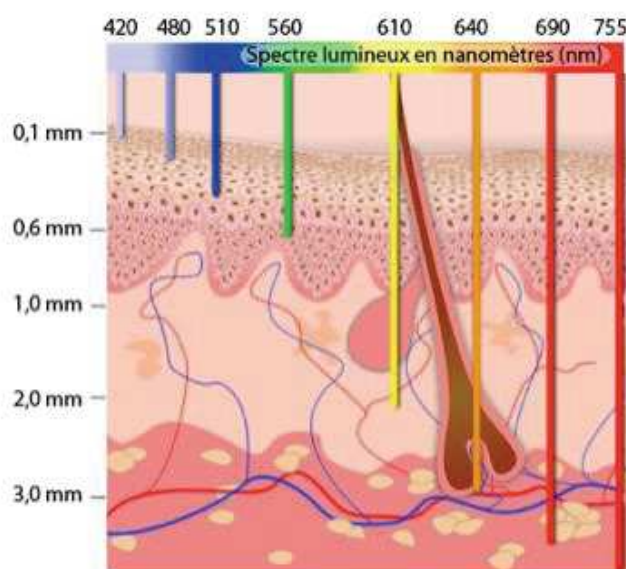


Figure 6 : Profondeur de la propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus. Adapté des références [34], [35].

Cependant, en raison de leurs propriétés photochimiques et de leurs toxicités liées à l'irradiation mono-photonique, seulement quelques PS ont obtenu une approbation officielle et sont utilisés en clinique [36] (Tableau 2).

Nom commercial du PS	Famille chimique	Type de cancer	λ excitation (nm)
Photofrin®	Dérivé d'hématoporphyrine	Poumon, œsophage, vessie, cerveau, ovaire, canal biliaire	630
Visudyne®	Dérivé de benzoporphyrine	Pancréas, sein	689
Foscan®	Tétra hydroxyphényl chlorine	Tête et cou, poumon, cerveau, canal biliaire	652
Levulan®	Acide 5-aminolévulinique	Peau, vessie, cerveau, œsophage	635
Metvix®	Acide 5-aminolévulinique methyl ester	Peau	630
Hexvix®	Acide 5-aminolévulinique hexyl ester	Cellules basales	375–400
Lutex®	Lutéium texaphyrine	Sein	732
Photochlor®	HPPH Chlorine	Tête et cou, œsophage, poumon	665

Tableau 2 : Exemples de photosensibilisateurs utilisés en clinique dans le traitement du cancer.

Comme cité précédemment, la préoccupation la plus courante concernant l'utilisation clinique de la PDT est la pénétration limitée de la lumière. Pour cela, un des challenges actuels est d'augmenter la profondeur de pénétration lumineuse afin de traiter des tumeurs profondes et d'éviter les dommages collatéraux. De plus, il a été montré que l'utilisation de l'oxygène pour la PDT dans un microenvironnement tumoral peut conduire à une hypoxie tumorale, déclencher la cascade de signalisation médiée par le facteur inductible par l'hypoxie et libérer des facteurs de croissance pro-angiogéniques, qui sont responsables de la survie des cellules cancéreuses ou des phénomènes de récurrence [37]. Le développement d'approches thérapeutiques indépendantes de l'oxygène est nécessaire pour améliorer le traitement en combinaison avec la PDT. En effet, il a été prouvé que les thérapies combinées utilisant plusieurs approches thérapeutiques peuvent augmenter de manière synergique l'activité anticancéreuse tout en réduisant les doses de chaque agent et minimisant ainsi les effets secondaires. En effet, la formulation des porphyrines qui

assure la complexation d'agent thérapeutique peut surmonter les limitations supplémentaires de la PDT médiée par la porphyrine, y compris les faibles profondeurs de pénétration tissulaire qui limitent la PDT aux lésions superficielles mais également assurer une application synergique de plusieurs thérapies pour un meilleur effet avec des dommages collatéraux réduits. De ce fait, la thérapie génique en combinaison avec la PDT offre une opportunité d'ajuster les traitements du cancer afin d'obtenir un meilleur effet thérapeutique [38].

Dans ce même contexte, la mise en œuvre de procédés biphotoniques s'est avérée être une solution à ces inconvénients. En effet, ces nouveaux PS qui peuvent absorber deux photons en même temps et être activés avec de très brèves impulsions laser de faible puissance dans le proche infrarouge permettent une pénétration plus profonde dans les tissus (jusqu'à 2 cm) et une réduction des photo-dommages sur les tissus environnants de la tumeur. Ceci est du fait que l'irradiation a lieu seulement au point focal contrairement à l'excitation mono-photonique où l'irradiation se fait tout au long de la trajectoire du laser [39].

6. Les enjeux scientifiques pour les thérapies anticancéreuses

Le cancer est une pathologie extrêmement complexe résultant de plusieurs facteurs combinés : une tumeur qui auto-stimule sa prolifération grâce à l'expression de facteurs, stimule une angiogenèse anarchique pour subvenir à ses besoins, échappe aux réponses immunitaires visant à l'éliminer, échappe à l'apoptose, reprogramme son mécanisme énergétique et manipule son environnement pour se développer. Cependant, les traitements contre le cancer ont actuellement affiché un taux de réussite très faible dans les essais cliniques. En effet, des mécanismes de résistance se développent, des effets indésirables sévères apparaissent ou même des échecs thérapeutiques peuvent se produire.

Au regard de ces contraintes, la mise à disposition de nouveaux traitements plus favorables et avec une tolérance acceptable est indispensable afin d'améliorer la survie ainsi que la qualité de vie des patients. Pour cela, l'amélioration de ces thérapies ciblées est un enjeu majeur qui nécessite le développement de nouvelles stratégies adaptées ciblant préférentiellement des mécanismes d'action biologiques responsables du développement du cancer. A l'heure actuelle, les recherches s'orientent vers « la nanomédecine », de manière plus spécifique dans la conception de nano-vecteurs pour l'encapsulation et la délivrance contrôlée d'agents thérapeutiques vers les cellules cancéreuses. Cette approche est inspirée du concept de l'immunologiste et médecin allemand Paul Ehrlich exprimant la théorie de « Magic Bullet »

[40] : la balle magique capable de transporter efficacement des molécules à l'intérieur de l'organisme avec des propriétés de ciblage spécifique.

II) La thérapie génique : du mécanisme naturel à l’outil de recherche

Le développement de la recherche ainsi que les progrès en biologie moléculaire ont contribué à une meilleure compréhension des fonctionnements des pathologies comme les mécanismes de cancérogenèse. Le principe montrant que le cancer est médié par une aberration somatique dans le génome hôte a permis de découvrir de nouvelles approches thérapeutiques telles que la thérapie génique. Ces approches se basent sur la manipulation génétique pour améliorer la régression du cancer et trouver un remède potentiel pour la maladie.

La thérapie génique comprend le transfert d’un matériel génétique dans une cellule hôte. À la différence des médicaments conventionnels qui agissent sur l’activité et le fonctionnement d’une protéine, les gènes thérapeutiques interviennent plus en amont, à la source du dysfonctionnement [41].

L’introduction du gène fonctionnel dans la cellule hôte repose sur 3 principes : i) remplacer un gène muté non fonctionnel, ii) inactiver ou supprimer l’expression d’un gène muté [42], iii) introduire ou exprimer un gène conduisant à la surexpression d’une protéine réparatrice. Pour induire un gène fonctionnel dans l’organisme, il existe deux principales voies: *in vivo* (administrer le matériel génétique directement dans l’organisme à l’aide d’un vecteur) et *ex vivo* (modifier génétiquement les cellules cibles prélevées chez le patient et les ré-administrer dans son organisme) [43].

À l’origine, l’utilisation de la thérapie génique concernait le traitement des pathologies génétiques héréditaires telles que la myopathie de Duchenne, la mucoviscidose, l’hémophilie... A l’heure actuelle, cette méthode ouvre des possibilités pour un grand nombre de maladies acquises y compris les maladies neurodégénératives et le cancer [41], [44].

La validation du premier essai de thérapie génique a été effectuée par l’équipe de Rosenberg en 1989 [45]. L’objectif consistait à modifier le gène codant pour la résistance à la néomycine dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) pour les patients atteints de mélanome avancé. À ce jour, près de 2 600 essais cliniques de thérapie génique sont en cours ou ont été approuvés dans le monde [44]. La plupart de ces essais cliniques visaient le traitement du cancer (65 % de tous les essais de thérapie génique). Cela indique que des traitements sûrs

et efficaces contre cette maladie sont toujours manquants et qu'il existe un réel besoin clinique. (Figure 7).

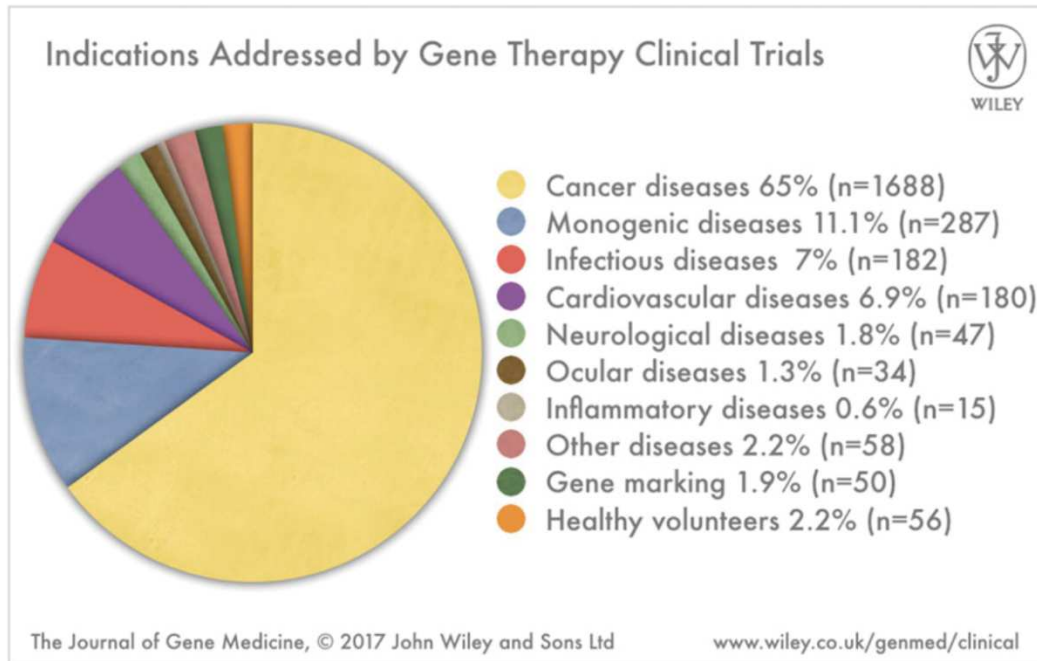


Figure 7 : Répartitions des essais cliniques en thérapie génique dans le monde [44].

1. Les acides nucléiques comme médicaments

Les acides nucléiques sont apparus comme étant des outils pharmaceutiques avec un fort potentiel d'action. Ils comprennent des ADN plasmidiques, des oligonucléotides et des ARN. En raison de leur potentiel de contrôle spécifique d'expression des gènes, un grand nombre d'essais cliniques impliquant les fragments d'acide nucléique sont en cours et les efforts persistants de ces travaux ont abouti à leurs approbations par la FDA (Food and Drug Administration).

1.1. L'ADN plasmidique

Le plasmide représente la forme la plus simple pour introduire un gène dans le noyau cellulaire. Il est constitué d'une molécule d'ADN double brin circulaire dont la taille varie de 1000 à 200 000 paires de base (Pb), ils se trouvent dans pratiquement toutes les espèces bactériennes où ils codent généralement pour des protéines engendrant une résistance aux antibiotiques [46]. Pour traiter le cancer, l'ADN plasmidique peut coder pour une protéine thérapeutique. Je citerai l'exemple de la protéine p53 codée par le gène suppresseur de tumeur qui est muté dans 50% des cancers humains [47]. La réactivation de la protéine p53 après

transfection du gène correspondant permettra la restauration de l'activité apoptotique des cellules cancéreuses. En effet, l'équipe de Kim a démontré une réduction du volume tumoral de 60% dans un modèle de cancer ovarien chez la souris après délivrance de plasmide codant pour la protéine p53 [48].

De plus, on retrouve ce système dans la stratégie dite « gènes suicides ». Cette approche consiste à l'introduction des gènes codant pour des enzymes, qui catalysent la conversion des substrats non toxiques (prodrugs) en composés toxiques. L'enzyme HSV-TK (Herpès Simplex Virus Thymidine Kinase), non présente dans les cellules humaines, transforme le ganciclovir (non toxique) en ganciclovir triphosphate, ceci entraînera une inhibition de l'ADN polymérase et une terminaison de l'élongation de l'ADN lors de la division cellulaire pour enfin induire à l'apoptose[49]. De nombreux essais cliniques ont montré une efficacité dans le traitement du cancer en utilisant cette stratégie, y compris le cancer de prostate [50], et le glioblastome [51], [52].

Dans ce contexte, pour améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale, plusieurs recherches ont combiné des cytokines inflammatoires dans la stratégie de vaccination par ADN [53]. L'interleukine IL-12 et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) sont l'une des cytokines les plus efficaces pour le traitement du cancer. En effet, le groupe de Wagner a montré que la délivrance d'ADN plasmidique codant pour le TNF- α pouvait entraîner une réduction totale des tumeurs chez plus de 60 % d'animaux traités [54].

1.2. Les oligonucléotides (ON)

La découverte historique de l'ADN comme matériau héréditaire par Avery *et al.* en 1944 [55], a ouvert la voie à notre compréhension et à notre utilisation actuelles des acides nucléiques, y compris le développement de thérapies oligonucléotidiques.

Les oligonucléotides sont apparus comme étant des outils thérapeutiques avec une forte capacité d'action, ils peuvent modifier les séquences d'acide nucléique altérées au niveau de l'ARN ou de l'ADN. À ce jour, il existe six médicaments approuvés par la FDA basés sur la thérapie par oligonucléotides [56].

1.2.1. Les oligonucléotides anti-sense (ASO)

Les oligonucléotides antisense (ASO) sont des séquences de 18 à 21 nucléotides qui ciblent spécifiquement leurs séquences d'ARNm complémentaires et inhibent par la suite la

biosynthèse ultérieure des protéines. Cet effet peut être réalisé par deux mécanismes majeurs : i) la RNase H reconnaît l'hétéroduplex ASO-ARNm et clive l'ARNm cible, ii) lors du ciblage de l'ARNm, le duplex inhibe par encombrement stérique la traduction en bloquant les machines ribosomales [57]–[59].

Les oligonucléotides naturels ont une mauvaise biodistribution, sont rapidement dégradés par les nucléases endogènes et ont une utilisation clinique limitée. Pour cela, les recherches se sont concentrées sur des modifications chimiques des fonctionnalités de l'ADN – ARN naturel (Figure 8) et ont abouti à des progrès significatifs vers l'établissement des ON comme agents thérapeutiques viables. Les ASO de première génération sont constitués d'oligodésoxynucléotides phosphothioates [60]: un atome de soufre est remplacé par un atome d'oxygène, conférant plusieurs avantages, dont l'amélioration de la résistance aux nucléases. Cependant, ces molécules se lient de manière non spécifique à certaines protéines sériques, induisant ainsi une toxicité cellulaire et d'effets secondaires[61].

Ces dernières limites ont donné naissance à des ASO de deuxième génération, qui présentent des modifications alkyles en position 2' du ribose. Elles sont plus spécifiques et moins toxiques que les molécules modifiées par le phosphothioate [62]. Néanmoins, en raison des changements conformationnels induits par ces modifications, l'effet inhibiteur est principalement dû au blocage de la machinerie de traduction, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité de l'inhibition [63].

Les ASO de troisième génération contiennent de nombreuses modifications au sein du cycle ribose et / ou du squelette phosphate [64]. Ces agents modifiés se sont révélés efficaces en termes d'affinité d'hybridation et de spécificité de liaison à la séquence cible. De plus, ils ont une stabilité biologique élevée et sont résistants aux nucléases.

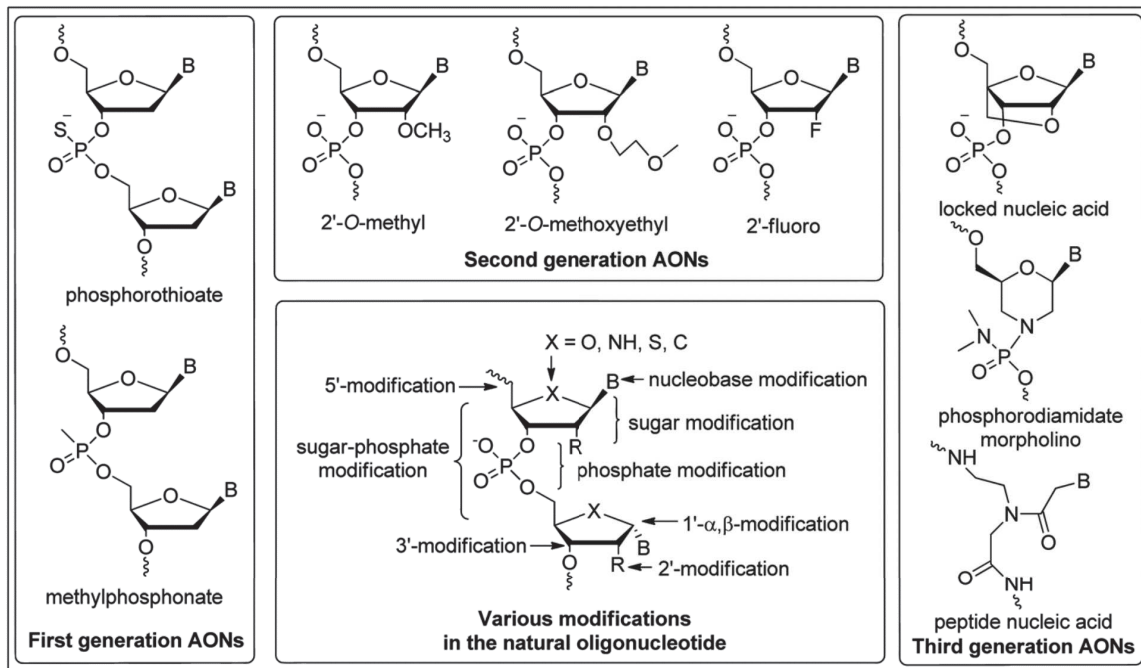


Figure 8 : Un aperçu des modifications générales et des différentes générations d'oligonucléotides antisense (ASO) [65].

Le premier ASO qui a été approuvé par la FDA est le nucléotide de première génération Fomivirsén (Vitravene) en 1998, conçu pour traiter les rétinites au cytomégalo virus chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) [66]. Actuellement, le Custirsén (OGX-011), un ASO ciblant la clusterine, est en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase III pour le traitement des cancers de la prostate [67].

- **Les SSO: Splice Switching Oligonucleotides**

Les SSO sont une classe d'oligonucléotides antisense qui sont utilisés pour manipuler les épissages alternatifs afin d'obtenir un bénéfice thérapeutique. En général, cette stratégie consiste à agir sur l'épissage de l'ARNm permettant de « sauter » un exon muté afin de restaurer l'épissage correct d'un transcrite épissé de manière aberrante. Une étude a montré que l'épissage induit par des SSO sur l'ARNm Bcl-x impliqué dans la régulation de l'apoptose (Figure 9), peut entraîner une réduction de la charge tumorale *in vivo* dans un modèle murin de métastases pulmonaires de mélanome [68]. En effet, Bcl-x est une cible attractive pour les SSO, étant donné que pour chaque molécule de pré-ARNm affectée, un anti-apoptotique Bcl-xL est remplacé par un pro-apoptotique Bcl-xS. (Figure 9)

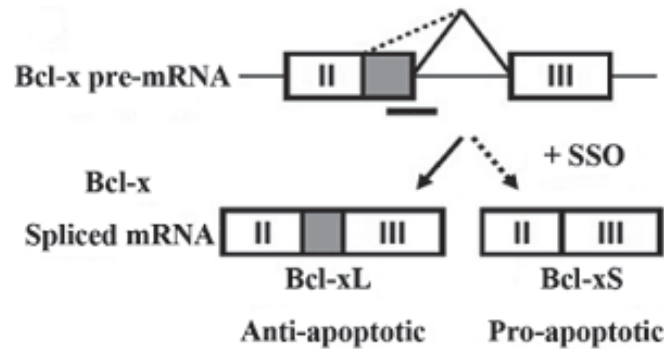


Figure 9: Illustration du saut d'exon de l'ARNm de Bcl-x [68].

1.2.2. Les oligonucléotides triple hélice (TFO)

La technologie Triplex est basée sur le potentiel des oligonucléotides simple brin contenant des séquences riches en purines/pyrimidines à se lier au sillon principal des duplex d'ADN formant des paires de Hoogsteen. Ce type d'appariement forme des liaisons spécifiques et stables [69]. Les TFO (Triplex-forming oligonucleotides) ont été initialement développés pour empêcher la transcription des gènes et éliminer son fonctionnement pathologique [70].

Des premiers résultats ont été obtenus pour le gène promoteur c-myc humain (un proto oncogène), où il a été constaté que la liaison d'un TFO riche en purine à la séquence d'homopurine-homopyrimidine 125 pb en amont du site de départ du promoteur bloquerait sa transcription *in vitro* [71]. De plus, d'autres oligonucléotides formant des triples hélices ont été utilisés pour le traitement du cancer, par exemple contre le gène c-met (Mesenchymal epithelial transition factor) dans le cas de l'hépatocarcinome [72].

Cependant, l'utilisation de cette stratégie reste limitée étant donné que les séquences naturelles capables de former des TFO sont assez rares dans le génome, ce qui diminue la possibilité de pouvoir cibler la plupart des promoteurs [73].

1.2.3. Les oligonucléotides agissant sur les protéines

- **Les aptamères**

Les aptamères (du latin *aptus*, pour s'adapter), également appelés « anticorps chimiques », sont des molécules d'ADN ou d'ARN synthétique simple brin, de 56 à 120 nucléotides de long, capable de se lier avec des protéines ou des petites molécules en reconnaissant et en adoptant une structure tridimensionnelle donnée, de la même façon que les anticorps. Les aptamères

peuvent être utilisés à des fins diagnostiques et thérapeutiques car ils peuvent interagir de manière ciblée avec biomarqueurs exprimés à la surface des cellules cancéreuses mais également se lier aux protéines et inhiber leur fonction cellulaire [74]. Ils sont isolés à partir d'un large pool d'acides nucléiques par un processus appelé Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, ou SELEX [75]. Cette méthode implique la sélection progressive, à partir d'une grande bibliothèque d'oligonucléotides double brin combinatoire, de ligands de protéines cibles avec une haute affinité par des cycles répétés de reconnaissance et d'amplification (Figure 10).

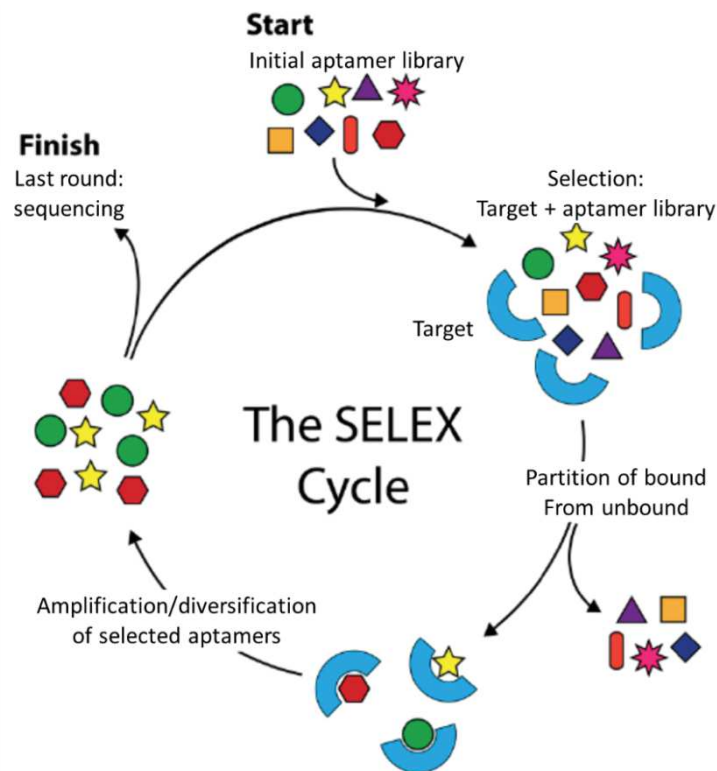


Figure 10 : Le principe générale du processus SELEX [76].

Ces aptamères représentent des alternatives intéressantes aux anticorps monoclonaux car ils sont non toxiques, non immunogènes, ont une bonne pénétration tissulaire, sont faciles à fabriquer, peuvent être modifiés facilement *in vitro* et peuvent être administrés par voie intraveineuse ou sous-cutanée [77].

L'AS1411 est un oligonucléotide riche en guanine (GRO) de 26 bases qui forme une structure G-quadruplex lui conférant une résistance aux nucléases cellulaires et sériques. Il

représente le premier aptamère passé en essais cliniques pour le traitement du cancer humain [78]. L'AS1411 se lie principalement à la protéine de nucléoline (NCL), qui est surexprimée à la surface des cellules endothéliales angiogéniques associées aux tumeurs. Une fois internalisé, il peut entraîner la réduction de la synthèse des protéines Bcl2 et probablement une induction de l'apoptose [79].

Cet aptamère a été cliniquement évalué pour la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et a montré des résultats prometteurs sans provoquer d'effets secondaires majeurs [80]. Cependant, les résultats des essais cliniques en phase II pour le traitement du carcinome rénal métastatique sont moins significatifs et restent mitigés [81].

- **Les leurres moléculaires d'ADN**

Les leurres d'ADN sont des ON phosphorothioates double brin synthétiques à haute affinité pour des protéines régulatrices, comme les facteurs de transcription. Contrairement aux aptamères, ils ne reconnaissent pas la structure tridimensionnelle des protéines mais se lient aux facteurs de transcription par des séquences spécifiques empêchant leur fixation sur l'ADN à transcrire (Figure 11).

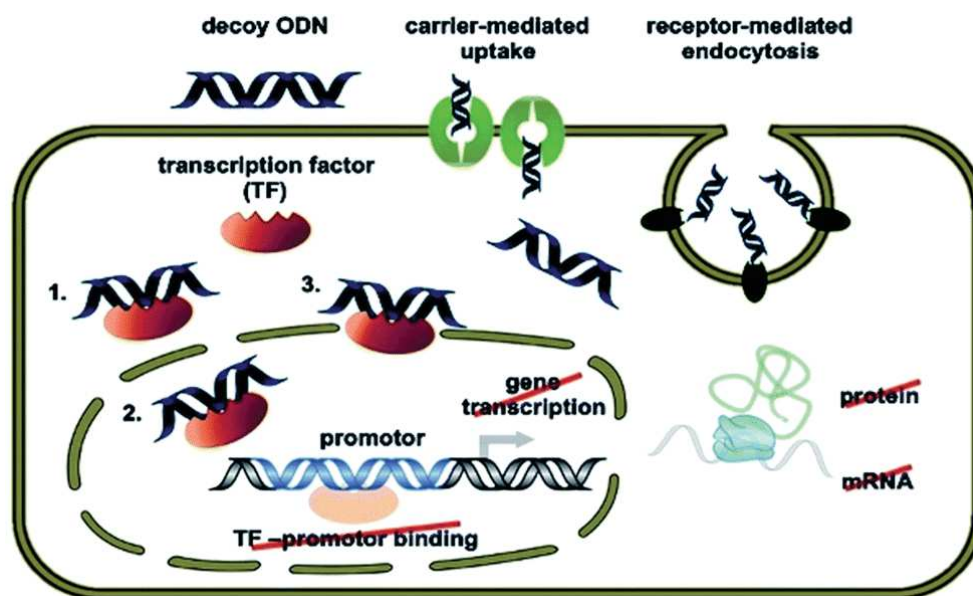


Figure 11 : Mécanisme d'action des leurres d'ADN [65].

Dans le cas du cancer, la stratégie du leurre moléculaire a été utilisée afin de leurrer le facteur de transcription STAT3, retrouvé surexprimé dans certains cancers (cancer du sein, de

l'ovaire...)). STAT3 est impliqué dans la régulation de gènes responsables de la prolifération et d'inhibition de l'apoptose tels que le Bcl_xL.

Les versions cycliques de leurre STAT3, qui sont résistantes aux nucléases sériques, ont montré une diminution d'expression des gènes régulés par STAT3 et ont supprimé la viabilité des cellules cancéreuses de la vessie *in vitro* [82]. De plus, une nouvelle génération de leurre STAT3 avec une séquence modifiée contenant deux sites de liaison à STAT3 permettant une meilleure discrimination entre STAT3 et STAT1 était efficace dans les cellules cancéreuses du côlon SW480 [82], [83]. Ces études montrent que le développement clinique des leurres STAT3 est très prometteur.

1.3. Les ARN

En vue des difficultés retrouvées dans la délivrance des acides nucléiques (ADN, oligonucléotides) au niveau nucléaire, les thérapies géniques utilisant des petits ARN sont considérées comme des thérapies souhaitables car ne nécessitant qu'une délivrance dans le cytosol.

1.3.1. Les ARNm

L'ARNm synthétique est devenu un outil de thérapie génique efficace. En effet, un large éventail d'applications thérapeutiques utilisant cette stratégie a été développé [84]. Ils sont conçus pour remplacer des ARNm mutés, être furtifs, stables, tout en maximisant l'expression des protéines ciblées. Effectivement, la présence intracellulaire prolongée de l'ARNm est une condition sine qua non afin que ce dernier soit efficace en thérapie génique. Pour se faire, les ARNm synthétiques possèdent des ARCA (anti-reverse cap analogue) à l'extrémité 5' qui leurs permettent une capacité de résistance aux clivages enzymatiques. Ces transcrits possèdent également à l'extrémité 3' une queue poly (A) d'environ 120 à 150 résidus adénosine [85]. Ainsi, ces modifications ont considérablement amélioré l'efficacité de la transfection de l'ARNm étranger dans les cellules hôtes [86], [87].

La première vague de thérapies par ARNm s'est concentrée sur son utilisation dans l'immunothérapie du cancer impliquant un transfert *ex vivo* de vaccinations et une administration localisée *in vivo* [88], [89]. L'objectif étant de stimuler le système immunitaire contre un antigène des cellules cancéreuses après transfection de l'ARNm.

Actuellement, plusieurs vaccins à ARNm sont testés en essais cliniques en association avec d'autres traitements pour l'application anticancéreuse. (Tableau 3) :

Identifiant NCT Clinicaltrial.gov	Description du traitement	Type de cancer	Phase d'étude
NCT04163094	Administration du vaccin ARNm W_ova1 avant et en combinaison avec la chimiothérapie (néo) adjuvante pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale.	Cancer de l'ovaire	Phase I
NCT03164772	Administration du vaccin ARNm BI 1361849 en combinaison avec l'immunothérapie (anti-PD-L1 [durvalumab]).	Cancer du poumon métastatique	Phase I/II
NCT02410733	Administration du vaccin ARNm Lipo-MERIT encapsulé dans des liposomes.	Mélanome	Phase I
NCT02316457	Administration du vaccin ARNm IVAC_W_bre1_uID et IVAC_W_bre1_uID/IVAC_M_uID encapsulé dans des liposomes.	Cancer du sein	Phase I

Tableau 3: Liste non exhaustive des essais cliniques utilisant des vaccins d'ARNm pour le traitement du cancer.

Dans d'autres applications thérapeutiques, beaucoup de candidats sont actuellement en phase II des essais cliniques, y compris les ARNm codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) pour traiter l'insuffisance cardiaque (phase II: **ARNm AZD-8601** AstraZeneca et Moderna) et le régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) (phase I: **ARNm MRT5005** TranslateBio) pour le traitement de la fibrose kystique [85].

1.3.2. Les ribozymes

Les ribozymes sont des ARN catalytiques découverts en 1980, pouvant agir comme des enzymes en l'absence totale de protéines [74]. En raison de leur capacité à s'hybrider à l'ARNm et à le cliver, les ribozymes naturels et synthétiques peuvent être utilisés pour supprimer spécifiquement la fonction des gènes en inhibant la synthèse des protéines cibles dans plusieurs applications, y compris le cancer et la virologie.

Il a été rapporté que les ribozymes ciblent une variété d'oncogènes dans le cancer colorectal. Un ribozyme type Hammerhead (en tête de marteau) a été conçu pour cliver préférentiellement l'ARNm de KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), oncogène dans des lignées cellulaires de cancer du côlon humain, entraînant une suppression de la croissance tumorale et une altération de l'expression du gène angiogénique [90].

Angiozyme™ a été le premier ribozyme évalué dans des essais cliniques. Il entraîne l'inhibition de l'angiogenèse en clivant l'ARNm du récepteur VEGF [74]. Les essais cliniques en phase I ont montré des résultats prometteurs dans la suppression de l'angiogenèse tumorale. L'angiozyme™ inhibe la croissance tumorale dans plusieurs modèles murins. Malheureusement, les essais cliniques ont été arrêtés en phase II car ils n'ont pas démontré d'efficacité significative chez les patients atteints de cancer du sein métastatique [91].

1.3.3. Les réplicons

L'ARN auto-répliquant (réplicon) est une nouvelle plate-forme prometteuse pour la thérapie génique [92]. Les réplicons d'ARN sont des molécules d'ARN d'une longueur d'environ 10 kb, dérivés de virus à ARN à brin positif tel que l'alphavirus ou négatif tel que le rhabdovirus [93]. Ils ont été utilisés dans des stratégies de vaccination contre des maladies infectieuses et divers types de cancers [94].

Actuellement, un seul essai clinique (phase II) est en cours d'étude de vaccin anti-tumoral à base de réplicon. Il s'agit de l'étude de la molécule **VRP-HER2** (alphavirus-like replicon particles) contenant de l'ARN de réplicon auto-amplifiant pour HER2 dans le but de traiter le cancer du sein (NCT03632941).

1.3.4. Les saRNA

Small activating RNA (saRNA) sont des ARN non codants double brin d'une longueur de 21 nucléotides avec deux nucléotides aux extrémités non appariés. Ils pourraient induire

l'expression spécifique d'un gène cible. Cette technologie a été découverte par Long-Chen Li et ses collègues en 2006 lorsqu'ils ont observé que des courts ARN double brin (dsRNA) ciblant des séquences de promoteurs de E-cadhérine pourraient activer son expression au lieu de l'inhiber [95]. Depuis, plusieurs autres études avec des résultats similaires ont confirmé ce surprenant phénomène d'activation médié par des ARN double brin [96].

Les saRNA agissent principalement dans le noyau. Une fois internalisé dans le cytoplasme, le saRNA est couplé à la protéine argonaute AGO2 qui le transfère dans le noyau à l'aide de facteurs d'importation tels que Importin-8. Dans le noyau, le saRNA lié à AGO2 élimine son brin passager pour former un complexe actif saRNA-AGO2 contenant le brin guide sélectionné de l'ARN. Le complexe actif est guidé vers ses régions cibles par le brin guide, qui peut se lier à des cibles complémentaires sur l'ADN promoteur ou l'ARN promoteur naissant [97]. Il permet par la suite le recrutement de l'ARN hélicase A (RHA) et la protéine CTR9 qui ont des rôles connus dans la transcription puis au moyen l'ARN polymérase II et d'autres enzymes liées aux histones, les promoteurs cibles seront plus activés sur le plan transcriptionnel et traductionnel permettant une expression prolongée du gène cible [98].

Étant donné que diverses maladies sont déclenchées par une expression réduite de certains gènes importants, en particulier dans les cancers, les saRNA possèdent un bon potentiel pour traiter ces pathologies [99]. Le premier médicament à base de saRNA nommé MTL-CEBPA a été conçu pour traiter les patients atteints d'un cancer avancé du foie. L'objectif étant de cibler et d'activer la protéine α -CCAAT. Le CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) est un suppresseur de tumeur qui s'est révélé être diminué dans divers cancers, y compris le carcinome hépatocellulaire (CHC) [98]. Actuellement, ce médicament est en cours d'essai clinique de phase I (NCT02716012) dans le but d'évaluer sa sûreté et sa tolérance chez les personnes atteintes de CHC avancé.

1.4. Les ARN interférents

L'interférence d'ARN (RNAi) est un mécanisme puissant par lequel de petits ARN double brin (dsRNA) réduisent l'expression des gènes, soit en induisant la dégradation spécifique par séquence des ARNm complémentaires, soit en inhibant la traduction *via* des machines cellulaires endogènes. La fonction naturelle du RNAi semble être la protection du génome contre l'invasion par du matériel génétique mobile tel que des virus qui produisent de l'ARN aberrant ou de l'ARN double brin lorsqu'ils deviennent actifs [100].

Le phénomène de RNAi a été découvert au hasard en 1990 avec l'auto-extinction du gène de la chalcone synthase (CHS), responsable de la coloration des fleurs pétunias alors que l'objectif était plutôt d'exprimer ce gène [101]. À ce moment, on parlait de co-suppression ou PTGS (post-transcriptional gene silencing).

C'est en 1998 que le principe de RNAi a été décrit, lorsque les molécules d'ARN double brin se sont avérées inhiber l'expression des gènes homologues chez les vers nématode *Caenorhabditis elegans* induisant des contractures musculaires [102] (Figure 12). Craig Mello et Andrew Fire ont reçu le prix Nobel en 2006 pour cette découverte. Depuis, les recherches dans le domaine RNAi ont augmenté avec la découverte des différents autres acteurs : les ARN de 20 à 30 nucléotides, la protéine Dicer et le complexe RISC (RNA induced silencing complex) [103], [104] et a permis d'envisager le développement de nouvelles thérapies [105].

Le premier oligonucléotide à base de RNAi thérapeutique a été approuvé par la FDA en 2018 [106]. Cela promet d'être un marché en pleine expansion car de nombreuses sociétés biopharmaceutiques émergentes développent des thérapies à base d'ARN interférents.

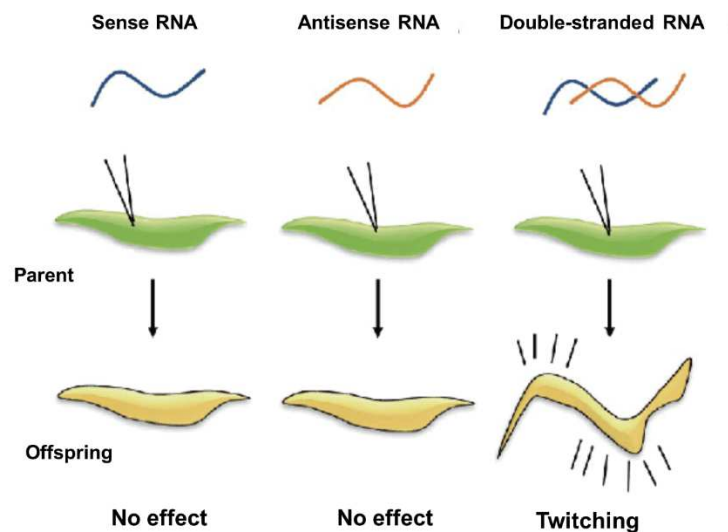


Figure 12 : Phénomène de twitching : Inhibition du gène codant pour le mouvement musculaire normal par l'introduction de l'ARN double brin [107].

1.4.1. Les siRNA

Depuis la découverte révolutionnaire de l'interférence d'ARN, un progrès remarquable a été accompli dans la compréhension et l'exploitation du mécanisme d'inhibition de gène, en particulier dans les thérapies à petits ARN interférents (siRNA).

Les petits ARN interférents ou siRNA (small interfering RNA) sont une classe de molécules d'ARN double brin qui se composent d'un brin guide (anti-sens) et d'un brin passager (sens), composé généralement de 21 à 23 paires de bases avec deux nucléotides non appariés aux deux extrémités, une extrémité hydroxylée en 3' et une extrémité phosphorylée en 5' [108] (Figure 13). Ils ont la capacité de reconnaître des séquences homologues d'ARNm cible et induire sa dégradation. Contrairement aux miRNA (micro RNA), le brin guide du siRNA est apparié parfaitement par des liaisons de type Watson-Crick avec sa séquence complémentaire de l'ARNm [109].

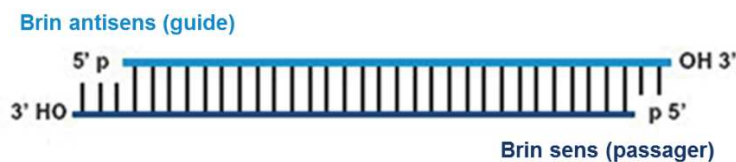


Figure 13 : Structure du siRNA. Adapté de la référence [110].

L'efficacité des siRNA a été démontrée pour la première fois en 2001 quand Elbashir et ses collègues ont utilisé un siRNA synthétique pour inhiber spécifiquement l'expression de différents gènes (luciférase...) dans plusieurs lignées cellulaires de mammifères [111]. Depuis cette découverte, le siRNA est devenu un outil prometteur et a été exploité comme une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de diverses pathologies.

Le mécanisme d'interférence de gène médié par le siRNA se fait essentiellement dans le cytoplasme et se déroule en 2 phases principales [112] : dans la première étape (phase d'initiation), les longs ARN double brin sont clivés par le Dicer en siRNA. Dans la deuxième étape (phase effectrice), le complexe (RISC) est formé et après activation effectuée la reconnaissance et le clivage spécifique de la séquence de l'ARNm et enfin une suppression de traduction de la protéine cible [113], [114].

- **Le complexe RISC**

Le RISC est un complexe multi-protéique qui incorpore un brin d'un petit ARN interférent (siRNA ou miRNA) pour reconnaître l'ARNm complémentaire et induire sa dégradation. À la fin du mécanisme, le RISC est relargué pour effectuer 20 à 50 cycles d'interférence d'ARN [115]. Ce complexe protéique comprend : Dicer, la Transactivating Response RNA Binding-Protein (TRBP) et la protéine Argonaute 2 (AGO2) [116].

Dicer est une ribonucléase d'ARN double brin magnésium dépendant de type RNase III. elle comprend un domaine d'hélicase ARN ATP dépendant dans la région N-terminale, un motif PAZ (piwi argonaute-zwille) et deux domaines d'endonucléase dans la région C-terminale suivie d'un domaine de liaison d'ARN double brin [117]. Son rôle repose sur le découpage des précurseurs d'ARN double brin des miRNA et des siRNA [118].

TRBP est une protéine capable de lier les ARN double brin. Elle comprend deux domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD1 et dsRBD2) dans la région N-terminale et un domaine se fixant au domaine hélicase de Dicer dans la région C-terminale. Son rôle semblerait être impliqué dans la reconnaissance et la fixation spécifique des précurseurs de miRNA et siRNA pour améliorer la précision de clivage par Dicer [119]. De plus, TRBP pourrait être lié à la protéine AGO2 pour la sélection du brin guide mais cela reste encore mal élucidé [120].

AGO2 est le seul membre de la famille AGO ayant une activité catalytique d'ARN chez l'homme [121]. Elle se compose de 4 domaines, à savoir, le domaine PAZ, le domaine MID, le domaine PIWI et le domaine Hélicase. Cette protéine a la capacité de reconnaître les deux derniers nucléotides débordants à l'extrémité 3' du brin anti-sens par l'intermédiaire de son domaine PAZ [122]. L'extrémité 5' du brin anti-sense est maintenue par le domaine MID formant une poche et enfin le clivage de l'ARNm cible se fait *via* le domaine PIWI [123].

- **Mécanisme d'action siRISC**

Tout d'abord, l'endoribonucléase Dicer de type RNase III clive l'ARN double brin endogène et exogène ou ARN de type hairpin (shRNA) laissant des groupes phosphate à l'extrémité 5' et deux nucléotides à l'extrémité 3' afin d'obtenir un siRNA fonctionnel (Figure 14).

Le siRNA double brin fonctionnel reste associé au complexe Dicer-TRBP formant le RLC (RISC loading complex). Il est ensuite reconnu par AGO2 pour former le complexe RISC activé. À ce moment, le duplex siRNA est clivé en deux brins simples [124].

Une fois déroulé, le complexe AGO2-RISC coopérerait avec le brin dont l'extrémité 5' est le moins thermodynamiquement stable. Ce brin antisense pourrait guider et s'apparier avec des séquences d'ARNm homologues [107], [108].

La reconnaissance de l'ARNm cible par RISC se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, un criblage initial de la séquence de trois nucléotides (2 à 4 nucléotides de l'extrémité 5' du brin antisense siRNA) a lieu [125]. Une fois le triplet reconnu, le cinquième nucléotide du brin antisense interagit avec l'ARNm cible, ce qui contribue aux changements de conformation, ouvrant les nucléotides 6–8 et 13–16 pour suivre l'interaction [126]. L'interaction complémentaire du brin guide du siRNA avec l'ARNm fournit une conformation avantageuse afin de cliver la liaison phosphodiester de l'ARNm entre les nucléotides 10-11 par rapport à l'extrémité 5' du brin antisense [127], [128], qui se produit *via* le domaine PIWI d'AGO2 [112], [129]. L'ARNm est finalement dégradé par des exonucléases soit dans les exosomes, impliqués dans la dégradation de tous types d'ARN, soit dans les P-bodies (Processing-bodies).

Les P-bodies sont des granules de ribonucléoprotéine cytoplasmique (RNP) présents dans les cellules eucaryotes permettant le stockage d'ARNm dégradés. Ils sont composés de plusieurs enzymes responsables de la dégradation de l'ARNm notamment ceux qui sont impliqués dans le mécanisme du miRNA (CCR4-NOT, XRN1) [130].

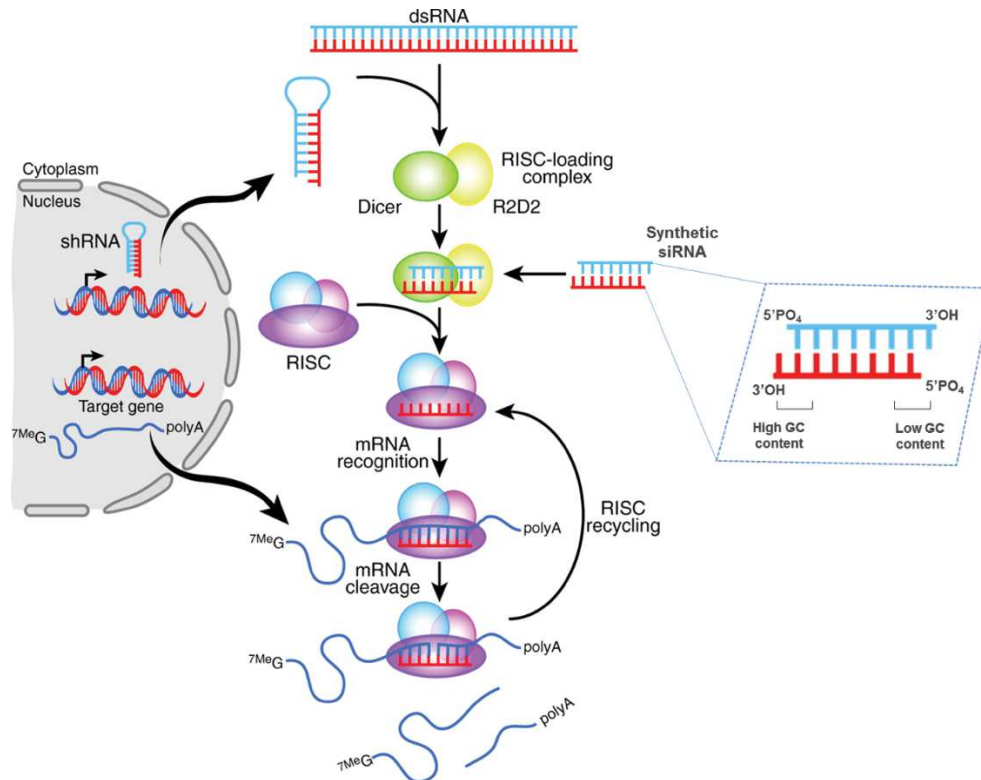


Figure 14 : La voie d'interférence du siRNA. Adapté de la référence [131].

- **Modifications chimiques du siRNA**

Tous comme pour les ASO, des modifications chimiques des siRNA synthétiques ont été proposées. En effet, les oligonucléotides non modifiés sont rapidement dégradés par les nucléases circulantes dans le sérum, excrétés par le rein, et sont généralement considérés comme instables et donc inutilisables en thérapie [127]. Par conséquent, des stratégies de modification chimique ont été développées pour surmonter ces obstacles et améliorer leurs propriétés de : sensibilité aux ribonucléases, reconnaissance par le système RISC, hydrophobicité, toxicité, température de fusion duplex et conformation de l'hélice de l'ARN [132]–[134]. Ces modifications sont présentées au niveau du ribose, des phosphates et des nucléobases (Tableau 4).

Type de modification	Avantages	Inconvénients	Références
Ribose (2'O-Me), (2'O-MOE), (2'O-benzyl), (2'F)	Les substitutions en position 2' du cycle protègent efficacement les siRNA contre l'action des nucléases sériques.	Cette substitution pourrait réduire l'efficacité du processus de l'interférence médié par le siRNA.	[135], [136], [137], [138], [139]
Phosphate (PT), (BP)	Les remplacements de l'oxygène du phosphodiester protègent le siRNA contre l'action des ribonucléases sériques et facilitent sa pénétration cellulaire.	Cette modification pourrait entraîner l'activation du système du complément et l'infiltration leucocytaire des organes correspondants peut se produire.	[140], [141], [142], [143], [144]
Base (pseudo-uridine), (2' thio-uridine), (dihydro-uridine)	Les substitutions des nucléobases augmentent l'efficacité de la formation de liaisons hydrogène avec des nucléotides complémentaires et donc augmentent la stabilité du siRNA	Ce remplacement pourrait entraîner une réduction de l'efficacité du mécanisme d'interférence.	[145], [146].

Tableau 4 : les différentes modifications chimiques du siRNA.

(2'O-Me) :2'-O-méthyle, (2'O-MOE) :2'-O-méthoxyméthyl, (2'F) : 2'-Fluor, (PT) : Phosphorothioate, (BP) : Boranophosphate

- **Les siRNA : de l'étude à la clinique**

Les traitements à base de siRNA ont été rapidement développés dans les études cliniques. En effet, ce type de thérapie pourrait traiter diverses maladies, telles que le cancer, les infections respiratoires, la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), le glaucome et

l'hypercholestérolémie... [147]. Jusqu'à présent, au moins 20 essais cliniques ont été lancés en utilisant des stratégies médiées par du siRNA et du miRNA [148]. Bien qu'il existe de nombreuses techniques pour activer les voies d'interférence d'ARN, la majorité des essais cliniques actuels impliquent la technologie siRNA [149], [150].

Dans le cas d'une administration par voie locale, le premier médicament siRNA testé en étude clinique était le Bevasiranib (Opko Health), une petite molécule synthétique d'ARN interférant utilisée pour traiter les patients atteints de DMLA et d'œdème maculaire diabétique. Ce siRNA pourrait inhiber sélectivement l'ARNm codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [124]. Après l'injection intravitréenne, le Bevasiranib serait administré directement au tissu oculaire pour inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la rétine. Des résultats encourageants ont été obtenus dans les essais de phase I et II (NCT00722384, NCT00259753). Cependant, l'étude de phase III (NCT00499590) a été interrompue pour sa faible efficacité [151].

En 2007, Alnylam Pharmaceuticals a développé un médicament antiviral à base de siRNA : ALN-RSV01. L'objectif était de démontrer l'innocuité et l'efficacité du siRNA ALN-RSV01 chez des cas atteints d'une infection par le virus respiratoire syncytial (RSV) [152]. Il a été administré par inhalation à l'aide d'un système de nébulisation. Des résultats encourageants ont été observés avec l'ALN-RSV01 chez 16 transplantés pulmonaires (NCT00658086, NCT01065935) [153]. Cette dernière étude a ouvert la possibilité pour l'utilisation de ce siRNA en tant qu'inhibiteur des gènes impliqués dans le rejet d'allogreffe [154].

Dans le cas du cancer, des essais cliniques du siRNA SIG12D pour le traitement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique sont en cours de développement. Golan *et al.* ont mis au point un système d'administration local du médicament SIG12D dirigé contre l'oncogène KRAS (G12D) muté [155]. Les études de phase I (NCT01188785) du SIG12D en association avec la chimiothérapie (la Gemcitabine) ont révélé que le médicament était bien toléré et surtout efficace chez les patients atteints de cancer du pancréas. Effectivement, le médicament n'a montré aucune toxicité limitante et s'est révélé être efficace pour réduire la croissance tumorale [108]. Le siRNA SIG12D fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II (NCT01676259).

Les médicaments à base de siRNA présentés ci-dessus sont tous administrés par voie locale, ce qui convient aux tissus externes et / ou localement restreints, notamment les yeux, l'épiderme et les poumons [156]. Cependant, pour les tissus ou organes difficiles à atteindre localement, une administration systémique est nécessaire. En 2007, Quark Pharmaceuticals a

conçu le premier médicament à base de siRNA nu administré par voie systémique. Le siRNA I5NP (également appelé QPI-1002) a été développé pour la prévention des lésions rénales aiguës chez les patients subissant une chirurgie cardiaque (NCT00554359). I5NP pourrait inhiber l'expression de la protéine pro-apoptotique p53 en se liant spécifiquement à son ARNm. L'inhibition temporaire de ce gène donne aux cellules rénales le temps de réparer les dommages cellulaires après une lésion et ainsi éviter l'induction de l'apoptose [157]. Les résultats des essais cliniques de phase I ont montré un profil d'innocuité attendue et une réduction temporaire de l'expression du gène p53 [109]. Des études cliniques de phase III sont en cours de développement (NCT03510897).

Un essai de phase I (NCT00689065) du siRNA CALAA-01 a été évalué en 2008. Il est dirigé contre la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase pour le traitement du cancer solide. Il s'agit du premier siRNA ciblé encapsulé dans des nanoparticules. CALAA 01 est composé d'un polymère contenant de la cyclodextrine, de l'Ad-PEG qui agit comme agent stabilisant et un ligand de ciblage qui est la transferrine humaine (Ad-PEG-Tf). Cependant, les essais de phase I ont été interrompus en 2013 en raison d'une toxicité et d'apparition de plusieurs effets indésirables [108].

Tekmira Pharmaceuticals a formulé le médicament siRNA (TKM-PLK1) pour les patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé, de tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales et de carcinome corticosurrénalien. La conception du médicament siRNA était composée d'une nanoparticule lipidique encapsulant le siRNA ciblant le gène PLK1 (Polo-like kinase 1) responsable de la prolifération des cellules tumorales. Les résultats des essais cliniques de phase I / II (NCT01262235) ont montré une réduction des tumeurs allant jusqu'à 59%. [109]

Récemment, M.D. Anderson Pharma a mené des essais cliniques sur le médicament siRNA-EphA2-DOPC, encapsulé dans des liposomes DOPC neutres. Le siRNA-EphA2-DOPC cible le gène du récepteur 2 de l'éphrine de type A (EphA2) surexprimé dans de nombreuses cellules cancéreuses [158]. Les données précliniques chez les primates non humains ont révélé que le médicament était bien toléré. Le siRNA-EphA2-DOPC fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase I (NCT01591356).

En 2010, Alnylam Pharmaceuticals a conçu un médicament siRNA, ALN-TTR01 (Patisiran). Partisan est un siRNA anti-TTR (transthyréline) contenant plusieurs modifications

2'O-Me encapsulé dans une nanoparticule lipidique cationique. Ce médicament est injecté en intraveineux pour traiter les patients adultes atteints de la maladie nerveuse périphérique causée par l'amylose héréditaire médiée par la transthyréline [159]. Le Patisiran perturbe le mécanisme de l'ARNm produisant la transthyréline, une protéine qui favorise l'accumulation de dépôts amyloïdes dans le corps.

Les résultats des études de phase II (NCT01961921) ont montré que le médicament entraîne une suppression significative du gène TTR et qu'il était bien toléré [160]. Plus de 80% de d'inhibition de la protéine TTR sérique ont été atteints lorsque le Patisiran a été administré à 0,3 mg / kg toutes les 3 semaines. De plus, les résultats de l'essai clinique de phase III (NCT02510261), en double aveugle, contrôlé par un placebo, ont démontré que le Patisiran présentait une innocuité et une efficacité impressionnantes dans le contrôle de la progression du hATTR (hereditary Transthyretin-mediated Amyloidosis) [161].

Enfin, c'est en 2018, quatorze ans après le début des essais cliniques utilisant la stratégie d'interférence par siRNA (2004) que la FDA et la Commission européenne ont approuvé la commercialisation du Patisiran ONPATTRO®, premier siRNA thérapeutique mis sur le marché.

Avec cette marquante réalisation, Alnylam Pharmaceuticals a développé un autre médicament siRNA appelé Givosiran ou ALN-AS1. Le Givosiran est un conjugué N-Acetylgalactosamine GalNAc /siRNA dirigé spécifiquement contre l'aminolévulinate synthase 1 (ALAS1) pour le traitement de la porphyrie hépatique aiguë (AHP) [162]. Le Givosiran entraîne une régulation négative de l'ARNm d'ALAS1 et empêche l'accumulation de précurseurs neurotoxiques, l'acide δ -aminolévulinique (ALA) et le porphobilinogène (PBG), qui sont associés aux attaques de porphyrie aiguë [163]. Dans les essais cliniques de phase I (NCT02452372), l'administration du Givosiran à 2,5 mg/ kg a entraîné une réduction rapide des niveaux d'ARNm ALAS1 urinaire, d'ALA et de PBG, avec des réductions maximales moyennes de 86%, 91% et 96%, respectivement [164]. Des études de phase I / II sont réalisées (NCT02949830) en évaluant l'efficacité et l'innocuité à long terme du Givosiran chez les patients atteints de l'AHP.

En novembre 2019, le Givosiran (GIVLAARI®) a été approuvé aux États-Unis pour le traitement des adultes atteints de AHP sur la base des résultats positifs de l'essai multinational ENVISION de phase III (NCT03338816). Dans l'union européenne, le Givosiran a reçu un avis positif en janvier 2020 pour le traitement de l'AHP chez les adultes et les adolescents âgés de 12 ans et plus.

Ces remarquables succès ont révélé le grand potentiel des médicaments à base d'ARN dans le traitement de diverses maladies. De ce fait, de nombreuses sociétés biopharmaceutiques émergentes développent des médicaments basés sur cette stratégie prometteuse. À ce jour et selon la base de données des essais cliniques, au moins 20 médicaments à base de siRNA sont en cours d'études cliniques dans plusieurs applications médicales y compris pour la thérapie anticancéreuse (Tableau 5)

Nom du siRNA	Cibles	Pathologies	Phase d'étude	Identifiant (clinicaltrial.gov)
ALN-TTR02	TTR	Amylose	Phase III	NCT02510261
ALN-AT3SC	AT	Hémophilie A/B	Phase III	NCT03417245
ALN-AS1	ALAS1	Porphyries hépatiques aiguës	Phase III	NCT03338816
DCR-PHXC	PHXC	Hyperoxalurie primaire	Phase III	NCT04042402
QPI-1002	P53	Prévention des lésions rénales après une chirurgie cardiaque	Phase III	NCT03510897
BMS-986263	HSP47	Insuffisance hépatique	Phase I	NCT04225936
Lumasiran	HAO1	Hyperoxalurie primaire	Phase III	NCT03681184
DCR-HBVS	HBV	Hépatite B chronique	Phase I	NCT03772249
Inclisiran	PCSK9	Hypercholestérolémie familiale homozygote	Phase II/III	NCT03851705
BMT101	Non renseigné	Cicatrice hypertrophique	Phase II	NCT04012099
MiHA-loaded PD-L-silenced vaccination	PD-L1 / PD-L2	-Tumeurs hématologiques malignes	Phase I/II	NCT02528682
SLN124	TMPRSS6	- β Thalassémie non transfusionnelle -Syndrome myélodysplasique	Phase I	NCT04176653

AMG 890	Lp(a)	Maladies cardiovasculaires	Phase II	NCT04270760
siG12D- LODER	KRAS	Cancer du pancréas	Phase II	NCT01676259
EphA2-DOPC	EphA2	Tumeur solide maligne avancée	Phase I	NCT01591356
APN401	Cbl-b	-Cancer métastatique du pancréas -Cancer colorectal	Phase I	NCT03087591

Tableau 5: Une sélection d'essais cliniques en cours utilisant la stratégie siRNA.

1.4.2. Les miRNA

Les miRNA sont de petits ARN non codants simple-brin d'environ 18 à 22 nucléotides de long qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Ils ont un rôle inhérent et critique dans le développement, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire [106], [165], [166].

En effet, les miRNA se sont révélés être une partie essentielle du génome non codant. Ils fonctionnent comme des régulateurs négatifs clés de la modulation post-transcriptionnelle dans presque tous les processus biologiques. Aujourd'hui, il est fréquemment démontré que la dérégulation des miRNA telles que des mutations, des suppressions, des amplifications, est associée à la pathogenèse des maladies humaines, ce qui en fait des cibles thérapeutiques intéressantes [74].

Les miRNA matures proviennent de transcrits plus longs, appelés miRNA primaires (pri-miRNA) de 1000 nucléotides de long, qui sont transcrits dans le noyau cellulaire par l'ARN polymérase II [167]. Ces pri-miRNA comprennent des ARN de type hairpin (épingle à cheveux) qui sont reconnus et clivés par le complexe protéique DROSHA-DGCR8, nommé le « microprocesseur ». Drosha coupe l'épingle à cheveux dans le pri-miRNA pour libérer des précurseur de miRNA (pré-miRNA) de 70 à 100 nucléotides [168]. Les pré-miRNA sont transportés du noyau au cytoplasme *via* le complexe Exportin5-RANGTP [169] et ensuite traités par le DICER-TRBP pour obtenir un miRNA double brin mature de 18 à 22 nucléotides contenant le brin miRNA sense et son brin guide complémentaire miRNA antisense [170] (Figure 15).

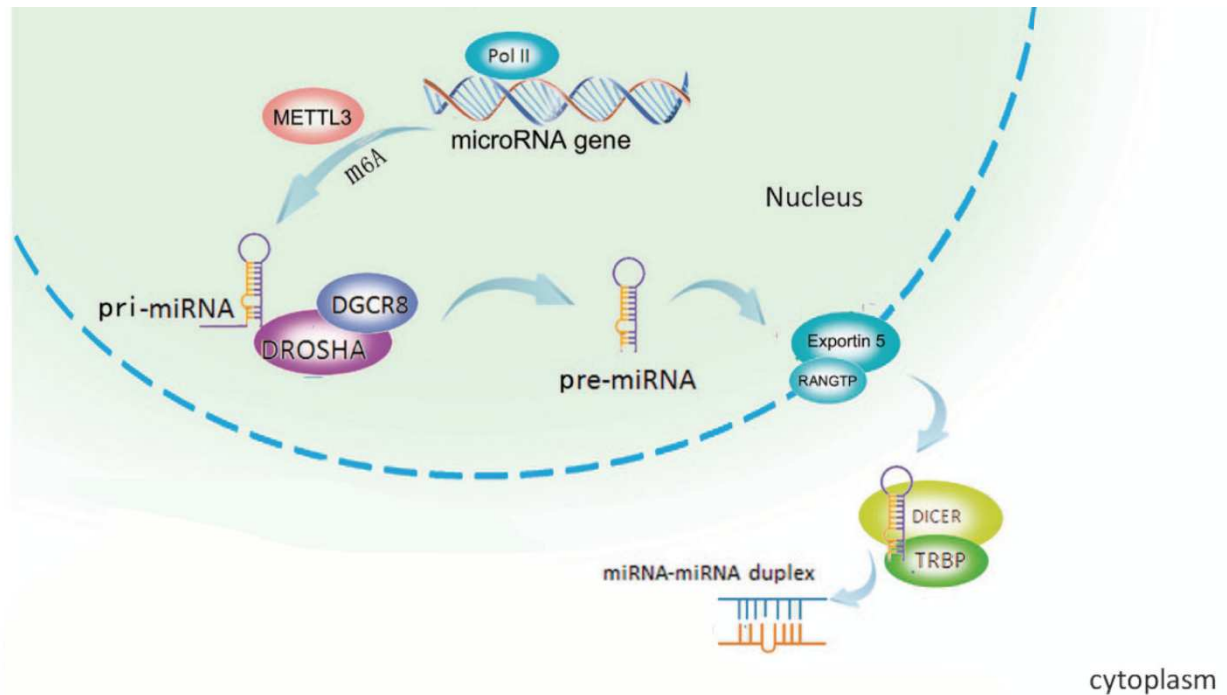


Figure 15 : La phase nucléaire et cytoplasmique de la biogenèse des miRNA. Adapté de la référence [171].

Une fois que le duplex miRNA se dissocie du complexe Dicer-TRBP, il s'incorpore dans une des quatre protéines Argonaute (AGO 1-4) pour former le miRLC (miRNA loading complex) et c'est l'élimination du brin sense qui permet la formation du complexe miRISC (miRNA induced silencing complex) [172]. Le miRISC est guidé vers l'ARNm cible grâce à son interaction avec des séquences complémentaires sur l'ARNm cible. Selon le degré de complémentarité avec l'ARNm cible, le miRISC peut soit conduire à un clivage de l'ARNm (complémentarité presque parfaite) ou à une répression traductionnelle (complémentarité imparfaite) [65]. Dans ce cas, la reconnaissance totale entre la région située du 2ème au 8ème nucléotide sur le miRNA « seed sequence » et la séquence correspondante de l'ARNm cible est primordiale afin d'obtenir cette répression de traduction [173].

- **Les études cliniques des miRNA**

Plus de 1000 miRNA identifiés chez l'homme peuvent cibler plus de 30% du génome humain [174]. Les miRNA sont d'importants régulateurs post-transcriptionnels des mécanismes biologiques de la cellule, y compris l'apoptose [175]. Aujourd'hui, il a été démontré que la dérégulation des miRNA est associée au développement du cancer.

Les premières preuves de l'implication des miRNA dans le cancer humain proviennent d'études sur la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les gènes miRNA humains mir-15a et mir-16-1 sont sous-exprimés dans plus des deux tiers des cas de LLC [176]. Par la suite, plusieurs miRNA ont été identifiés dans plusieurs cancers, dont les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein et les glioblastomes [177].

Toutes ces investigations ont mené au développement de miRNA en tant qu'agents thérapeutiques, qui selon leurs mécanismes d'action peuvent être classés en deux types : i) les antagonistes de miRNA (AMO ou anti-miR) et ii) les thérapies de remplacement de miRNA (mimic-miRNA).

Les anti-miR sont des ARN simple brin qui pourraient reconnaître le miRNA endogène et le piéger dans une configuration conduisant à sa dégradation.

La société MiRagen Therapeutics a développé un anti-miR connu sous le nom de Cobomarsen (MRG-106) pour traiter le lymphome cutané et la mycose fongicoïde (MF) [124]. Cobomarsen est un inhibiteur du miRNA-155 qui a été trouvé surexprimé dans le lymphome ainsi que dans la leucémie. Il a été démontré pour réguler diverses voies parallèles de survie, telles que JAK / STAT (Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription) et PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-3-Kinase and Protein Kinase B) dans la progression de la MF [178]. Une étude clinique de phase II (NCT03713320) est en cours pour évaluer l'innocuité et l'efficacité du Cobomarsen.

Contrairement aux anti-miR, les mimics-miRNA sont des molécules d'ARN double brin synthétiques qui correspondent exactement à la séquence de miRNA cible. L'objectif étant de restaurer l'expression du miRNA supprimé dans certaines maladies [179].

Les thérapies de remplacement des miRNA font preuve d'innovation pour explorer le potentiel thérapeutique des suppresseurs de maladies. Cependant, les premiers développements pour les applications cliniques en oncologie ont été entravés par certains obstacles. Ce fut le cas de MRX34, un mimics-miRNA du miR-34. MiR-34, est un suppresseur de tumeur bien caractérisé régulé négativement dans une large gamme de cancers [180], [181]. MRX34 a été livré sous forme d'ARN double brin encapsulé dans une nanoparticule liposomales. Les études cliniques de phase I étaient prometteuses lorsqu'elles étaient utilisées dans plusieurs types de cancer tels que le carcinome rénal, le mélanome et le carcinome hépatocellulaire [182].

Cependant, la toxicité et les réactions immunitaires indésirables ont empêché son développement en phase II (NCT01829971, NCT02862145).

1.4.3. Les piRNA

Les PIWI-interacting RNAs (piRNA) sont une classe spécifique à l'animal (tel que les poissons zèbres (*Danio rerio*)) de petits ARN interférents, différents des miRNA et siRNA. Ce sont des ARN simple brin de 24 à 31 nucléotides qui possèdent des sites de modification 2'-O-méthyle à l'extrémité 3' [183]. Ils sont traités *via* un mécanisme indépendant du Dicer à partir de précurseurs simple brin exprimés dans des régions intergéniques appelées grappes de piRNA [184]. Contrairement aux siRNA et miRNA, les piRNA guident les argonautes de type PIWI à la place des argonautes du type AGO, qui fonctionnent dans les voies miRNA et siRNA [185] (Figure 16).

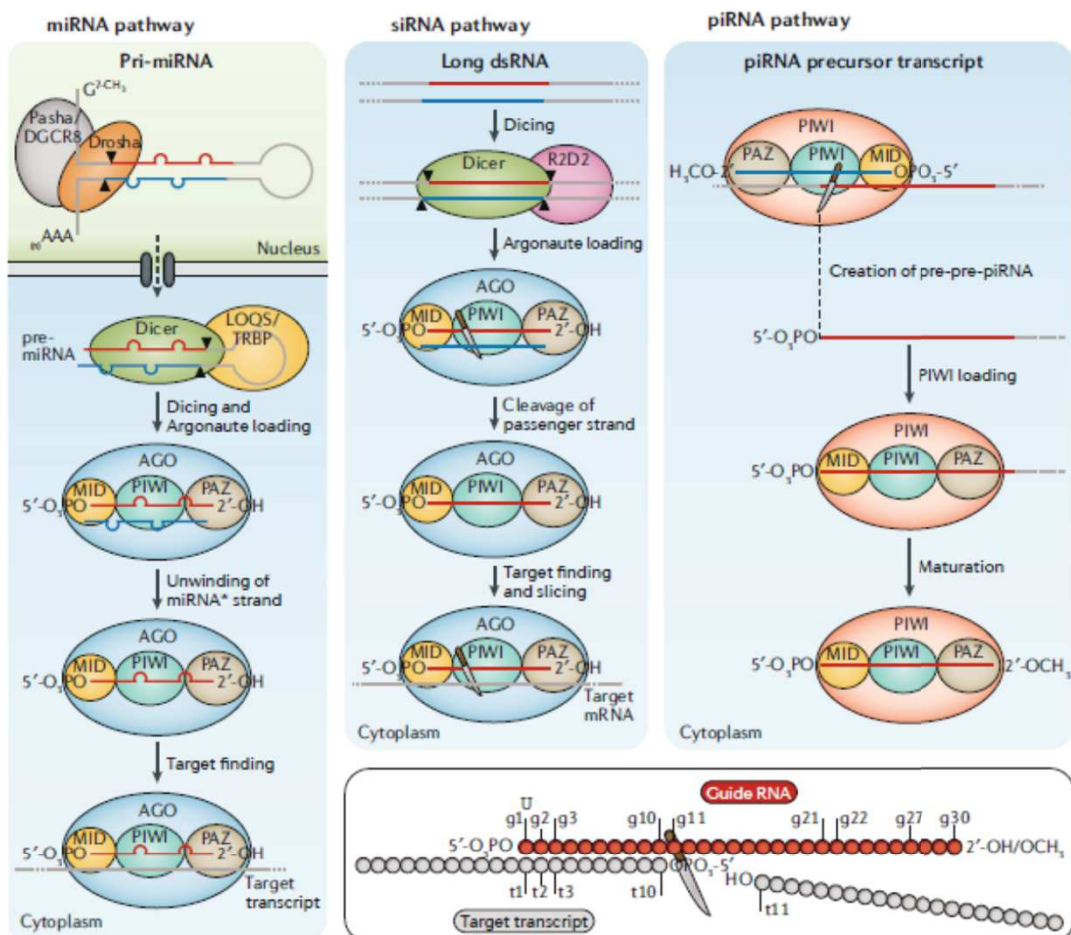


Figure 16 : Mécanisme de régulation de l'extinction génique par l'interférence à ARN [185].

La majorité des piRNA défendent le génome de la lignée germinale en assurant le mécanisme d'interférence d'ARN afin de diminuer l'expression des transposons, des éléments génomiques mobiles pouvant causer des mutations délétères [186]. En raison de leurs mécanismes de traitement et de la variété des transposons sources, les séquences de piRNA sont beaucoup plus diverses que celles de toute autre classe connue d'ARN cellulaires et constituent la plus grande classe d'ARN non codants [187]. La régulation des transposons par les piRNA est conceptuellement similaire à celle des systèmes immunitaires [183].

2. Les nucléases artificielles pour l'édition du génome

L'édition du génome (également appelée édition du gène) est une des nouvelles thérapies qui permettent la modification de l'ADN d'un organisme. Ces technologies permettent d'ajouter, de retirer ou de modifier du matériel génétique à des endroits particuliers du génome. Plusieurs approches de l'édition du génome ont été développées par l'utilisation de différentes nucléases artificielles. Actuellement on retrouve trois classes puissantes de nucléases qui peuvent être programmées pour entraîner des cassures double brin sur pratiquement n'importe quelle cible souhaitée : les nucléases à doigt de zinc (ZFN : zinc finger nucleases), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN : transcription activator-like effector nucleases) et (CRISPR-Cas : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- Caspase) [188].

3. Obstacles à la délivrance des acides nucléiques

Pour être efficaces dans les applications cliniques, les acides nucléiques doivent atteindre leur site d'action prévu (le noyau ou le cytoplasme, selon la technologie). Cependant, la technologie siRNA par exemple se retrouve devant de multiples obstacles. Il existe un certain nombre de barrières biologiques qui entravent leurs actions efficaces dans les cellules de mammifères. Tout d'abord, le siRNA fait face aux obstacles extracellulaires (Figure 17). En effet, après injection dans la circulation sanguine, le siRNA nu est facilement dégradé par des nucléases de type 3' exonucléase, filtré par le rein ou absorbé par les phagocytes et agrégé avec des protéines sériques.

Effectivement, l'une des premières barrières biologiques rencontrées par les siRNA administrés est présentée par l'activité des nucléases dans le plasma et les tissus. De plus des études ont montré que le temps de demi-vie des siRNA non modifiés dans le sérum varie de 15

minutes à 1 heure [189]. Ceci est lié à la fonction rénale puisque les reins jouent un rôle crucial dans la clairance des siRNA [190]. Ainsi, en plus de la dégradation par la nucléase circulante et la clairance rénale, l'absorption par le système réticuloendothélial composé de cellules phagocytaires est un obstacle majeur à la délivrance *in vivo* des siRNA.

Une fois arrivée à la cellule cible, l'internalisation du siRNA est limitée par plusieurs barrières. On parle maintenant d'obstacles intracellulaires (Figure 17). En effet, puisque les siRNA sont des gros polyanions hydrophiles d'environ 13 kDa, ils ne peuvent pas traverser la membrane cellulaire hydrophobe et négativement chargée et ne peuvent être internalisés que par endocytose ou pinocytose [112]. Cependant, afin de mettre en œuvre l'effet d'interférence d'ARN, le siRNA internalisé doit d'abord traverser la membrane de l'endosome et ensuite sortir dans le cytoplasme afin d'effectuer son rôle. Autrement, il subira soit un clivage par des ribonucléases [191], ou quittera la cellule par exocytose [192]. En effet, le trafic intracellulaire de siRNA commence généralement dans les endosomes précoces, qui transfèrent leur contenu dans les endosomes tardifs. De plus, le cytosol ou l'espace intracellulaire est approximativement neutre (pH 7,4), tandis que les compartiments endosomaux de la cellule sont très acides (pH 5,0 - 6,2) et (pH 4,5) pour les lysosomes [193]. Ces dernières contiennent diverses nucléases qui entraînent la dégradation des siRNA [131].

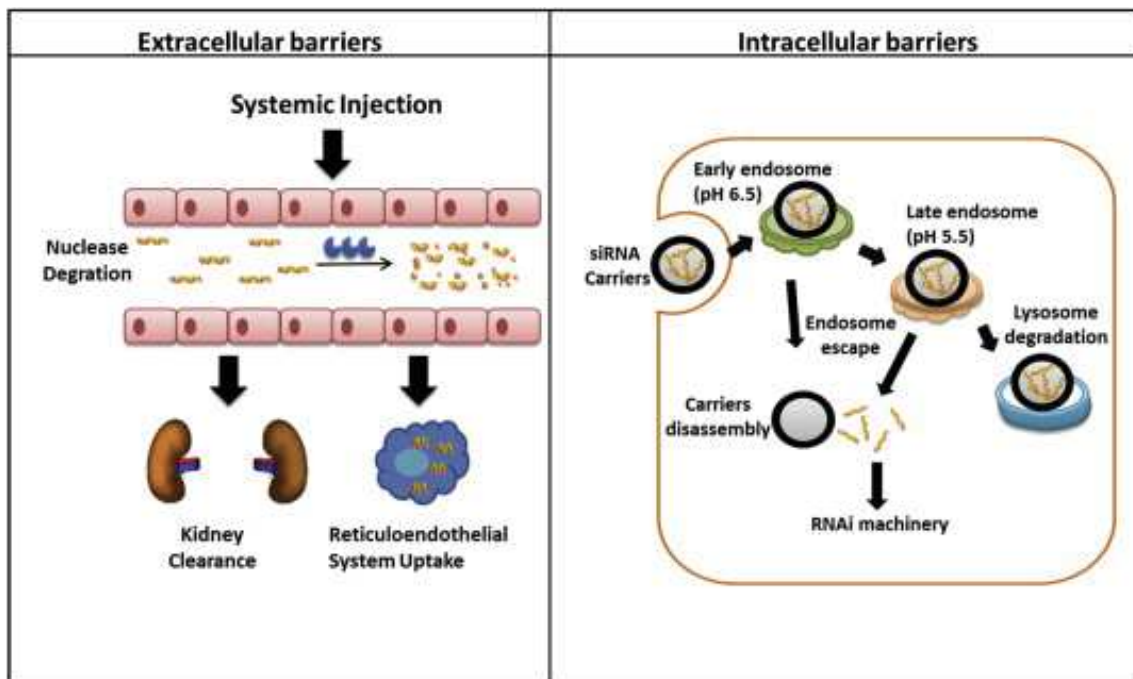


Figure 17 : Les barrières biologiques rencontrées après la délivrance du siRNA [194].

À ce jour, de nombreux efforts ont été déployés pour surmonter ces obstacles. Par exemple, diverses modifications chimiques ont été introduites au niveau du squelette, du sucre, des extrémités et des nucléobases du duplex siRNA et qui ont considérablement amélioré la stabilité thermique du siRNA [195] et ainsi augmenté la résistance et la stabilité des duplex dans la circulation. De plus, le nombre et la position appropriés de ces modifications chimiques dans le duplex siRNA aident à réduire les effets hors cible non spécifique et l'activation de la réponse immunitaire indésirable [196].

Enfin, afin de maîtriser les autres limitations notamment : i) ciblage des cellules, ii) internalisation cellulaire et iii) libération des endosomes, l'utilisation de nouvelles approches basé sur des nanovecteurs pour la délivrance de siRNA sont de plus en plus retrouvés. Cette partie sera abordée plus en détail dans la suite du manuscrit.

III) Vectorisation du siRNA

1. Généralités sur le concept de vectorisation

Les barrières de délivrance de siRNA *in vivo* sont des problèmes prédominants qui limitent l'application de la stratégie d'interférence dans le traitement du cancer. Pour cela, compte tenu de ces divers obstacles, des méthodes d'administration sûres et efficaces sont nécessaires. Par conséquent, des modifications chimiques et / ou des méthodes d'administration sont indispensables pour amener le siRNA sur son site d'action sans effets indésirables. Depuis l'énoncé du concept de Magic Bullet, une grande diversité de matériaux appelés aussi vecteurs est en cours d'exploration pour relever les défis de la vectorisation du siRNA *in vivo*, comprenant les polymères, les lipides, les peptides, les anticorps, les aptamères et les petites molécules.

Pour assurer le passage du siRNA à travers les barrières physiologiques et son arrivée aux sites d'action, le système de vectorisation utilisé doit être conçu pour (I) assurer une stabilité dans le sérum, (II) permettre l'évasion immunitaire, (III) atténuer les interactions avec les protéines sériques et les cellules non cancéreuses, (IV) résister à la clairance rénale, (V) être biocompatible et biodégradable, (VI) permettre l'internalisation cellulaire et l'échappé des endosomes et (VII) améliorer la perméabilité vasculaire pour atteindre les tissus cancéreux [194], [197].

2. Méthodes de vectorisation

2.1. Les méthodes physiques

Ces méthodes de transfection représentent des stratégies basées sur un mécanisme physique de transfert des séquences d'acides nucléiques. On retrouve trois sous-classes : l'électroporation, le bombardement de gène « gene gun » et la micro-injection.

a. L'électroporation

L'électroporation est l'une des méthodes provoquant des perturbations de la membrane plasmique afin de favoriser l'accessibilité au cytoplasme et d'assurer l'internalisation des séquences d'acides nucléiques. L'objectif est d'augmenter la perméabilité de la membrane en provoquant la formation de pores dans la membrane plasmique par des procédés

d'administration d'un courant électrique, de courte durée et dans certaines conditions d'impulsion.

L'électroporation a été réalisée pour la première fois *in vitro* par Neumann *et al.* en 1982 [198] ensuite *in vivo* par Okino *et al.* en 1987 pour la délivrance d'agents chimio-thérapeutiques aux tumeurs solides [199]. Depuis, cette technique est devenue une méthode standard dans les laboratoires. En effet, Lonza a développé un appareil efficace d'électroporation commercialisé sous le nom de Nucleofector™ pour transfecter différents types cellulaires. De même, Bio-Rad a développé un système d'électroporation connu sous le nom Gene Pulser Xcell™ pour la transfection de tous types cellulaires, des bactéries et des champignons.

L'amélioration de la technique d'électroporation *in vivo* pour la délivrance de gènes a montré son potentiel dans de nombreuses applications thérapeutiques telles que la thérapie anticancéreuse, la vaccination et la régulation de protéines. Le lancement d'essais cliniques fut la preuve réelle de l'avancement de cette technique. La première étude clinique a été lancée fin 2004 au centre de cancer et l'institut de recherche de H. Lee Moffitt (Tampa, Floride). Il s'agit d'un essai de phase I chez des patients atteints de mélanome. Les objectifs principaux étaient de déterminer la toxicité et la dose maximale tolérée de plasmide électroporé codant pour les ADN circulaire de l'interleukine 12 humaine. Depuis, d'autres essais cliniques ont été lancés comme des essais de délivrance de vaccins par électroporation intramusculaire pour le cancer de la prostate et pour les cancers exprimant HER-2 et/ou antigène carcinoembryonnaire (CEA) [200].

b. La micro-injection

La micro-injection unicellulaire est une méthode de transfection qui permet de s'affranchir des différents obstacles d'internalisation des acides nucléiques en pénétrant physiquement la membrane cellulaire avec une aiguille d'injection en verre ultrafine. Cependant, cette technique reste limitée par rapport au nombre de cellules injectés. De ce fait, la micro-injection peut être utilisée pour délivrer les acides nucléiques aux ovocytes ou aux cellules embryonnaires.

La possibilité d'exploiter la machinerie d'ARN interférence en tant qu'outil génétique de suppression des gènes endogènes avec le système de micro-injection a été démontré par Melton [201]. Dans ce travail novateur, de l'ARN complémentaire à l'ARNm de globine a été injecté dans le cytoplasme des ovocytes de *Xenopus*, conduisant à l'inhibition sélective de la traduction de la globine. Depuis ce travail, plusieurs études basées sur la micro-injection d'ARN ont été

développés. Parmi ceux-ci, les siRNA ont été largement utilisés pour la suppression de transcriptions spécifiques [202]. L'étude menée par Tiefenboeck *et al.* a montré que l'injection des siRNA dans des blastomères de souris permet d'identifier le rôle principaux acteurs moléculaires dans le développement embryonnaire [203].

c. Le bombardement de gène

Le bombardement de gène (gene gun) également appelé transfert de gènes biolistiques a été développé à l'origine pour fournir du matériel génétique aux plantes [204]. Il consiste à projeter de manière accélérée par décharge électrique ou par impulsion d'hélium sous pression des microbilles à base d'or ou de Tungsten recouvertes d'acides nucléiques.

Diverses conceptions de « gene gun » ont été développées pour des applications *in vitro* mais également *in vivo* [205]. En effet, cette technique a été utilisée pour délivrer des gènes de cytokines pour le traitement du cancer. Le transfert de gènes de cytokines *in vivo* par « gene gun » a été associé à une réduction de la croissance tumorale chez la souris [206]. Ceci démontre que la méthodologie « gene gun » évite plusieurs barrières associées à la délivrance d'acides nucléiques. Le fait que l'ADN soit délivré directement au cytoplasme sans passer par la voie de l'endocytose entraîne moins de dégradation. Cela évite également l'effet immun stimulateur non spécifique.

À ce jour, la vaccination à l'ADN est l'application la plus courante de transfert de gènes biolistique puisque cette technique délivre efficacement une petite quantité d'ADN suffisante pour induire une réponse immunitaire contre le produit du gène. En effet, le transfert de gènes biolistiques s'est révélé très prometteur dans les modèles précliniques de vaccination à l'ADN, tels que les souris, les lapins, ainsi que dans les essais cliniques humains [207]. Outre la vaccination, la technique a été appliquée dans des essais de thérapie génique pour l'immunothérapie du cancer [208].

Cependant, la plupart des applications de « gene gun » sont limitées uniquement aux tissus en surface, y compris la peau et les muscles. Effectivement et malgré les résultats prometteurs des essais de vaccination, l'utilisation du transfert de gènes biolistiques dans les cliniques est compromise par une efficacité limitée pour transfecter des zones plus grandes et plus profondes [209].

2.2. Les vecteurs pour la délivrance du siRNA

Les études sur la délivrance du siRNA ont connu une croissance intense au cours des dernières décennies depuis que cet oligonucléotide est potentiellement devenu une nouvelle classe de thérapies géniques pour le traitement de diverses maladies. Les vecteurs sont l'une des principales stratégies d'administration, ils offrent le potentiel d'améliorer et d'élargir les propriétés pharmacologiques du siRNA, tout en minimisant l'hétérogénéité et la toxicité corrélée à la stabilité.

Comme mentionné ci-dessus, les critères de conception d'un système de délivrance systémique *in vivo* de siRNA devraient inclure :

- Un profil de biocompatibilité et de biodégradabilité.
- Une stabilité accrue et une résistance à la dégradation par les nucléases.
- Une capacité à transporter la quantité suffisante du siRNA sans altérer sa stabilité et son activité.
- Une surface modifiable permettant de greffer des molécules de ciblage.
- Une libération contrôlée du siRNA à l'aide des caractéristiques intrinsèques du vecteur (sensibilité à une variation du milieu comme le pH, le potentiel redox, grâce à des liaisons réversibles, à la photo-induction...).
- Une taille optimale pour permettre une circulation, une diffusion à travers les barrières physiologiques et une distribution dans les tissus.

Dans le domaine des thérapies géniques que ce soit à base d'ARN ou d'ADN, les technologies d'administration sont cruciales en termes d'efficacité et de sécurité dans les études cliniques. Les vecteurs viraux ont été les premiers outils moléculaires capables de transférer des gènes dans des cellules humaines [210] et ont été utilisés dans plus de 50% des essais cliniques (Figure 18).

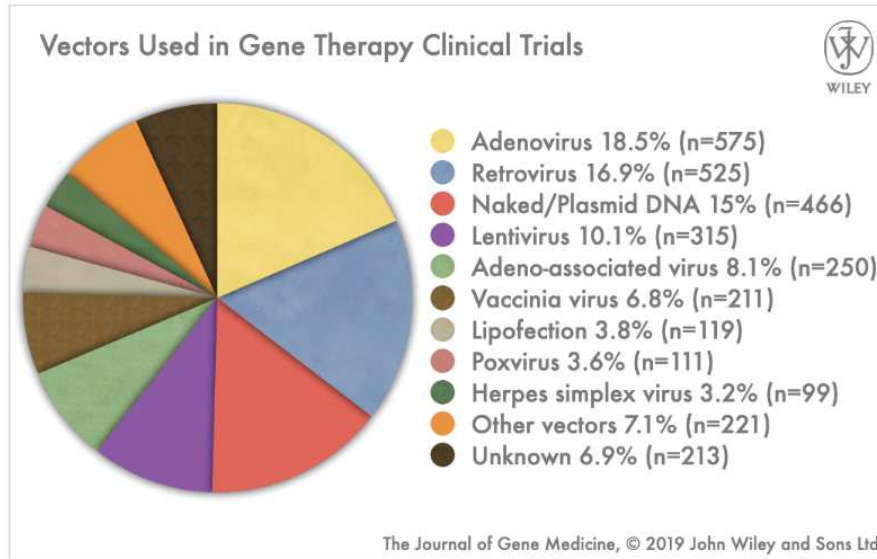


Figure 18: Les vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique dans le monde jusqu'à décembre 2019 [211].

2.2.1. Les vecteurs viraux

Selon l'espèce virale, il existe plusieurs types de vecteurs viraux, chacun possédant des propriétés particulières pouvant être exploitées pour la délivrance de gènes thérapeutiques. On reconnaît trois classes principales de vecteurs viraux pour la transfection d'ARN interférent : les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés aux adénovirus (Adeno-Associated Virus AAV) (Figure 19).

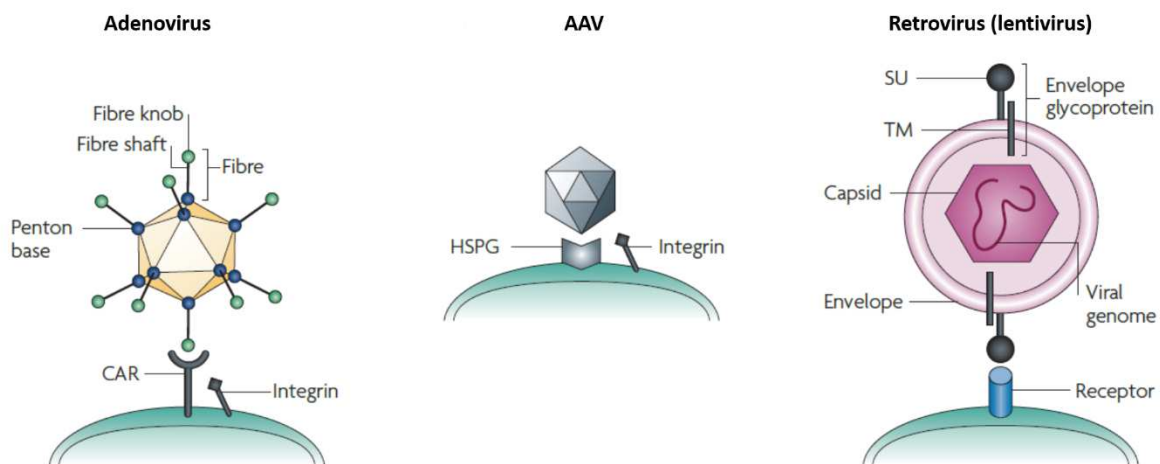


Figure 19: Les différentes classes de vecteurs viraux utilisés pour la délivrance d'ARN interférents. Adapté de la référence [212].

a. Les adénovirus

Les vecteurs d'adénovirus (AdV) sont les vecteurs les plus couramment utilisés pour la thérapie génique du cancer. Ils sont également utilisés comme vaccins pour exprimer des antigènes étrangers. À ce jour, ils représentent 18.5 % des essais cliniques en thérapie génique (Figure 19).

L'adénovirus est un virus non enveloppé composé d'une capsidie icosaédrique de 60 à 90 nm de diamètre et un génome d'ADN linéaire double brin. Il provoque des infections bénignes des voies respiratoires chez l'homme et la plupart des adultes ont déjà été exposés.

Le génome viral ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte et reste épisomal dans le noyau, tout en utilisant les machineries enzymatiques de l'hôte. De ce fait, le vecteur adénoviral n'exprime le transgène que de manière transitoire, ce qui est un inconvénient pour le traitement des maladies chroniques. De plus, les AdV de 1^{ère} génération se sont révélés être fortement immunogènes, limitant leurs applications chez l'homme [213]. Cependant, les AdV de 2^{ème} génération « helper-dependent » ont montré une toxicité plus réduite, un faible pouvoir immunogène et une expression du transgène à plus long terme [214].

Néanmoins, malgré les efforts effectués pour diminuer ces effets indésirables, les réponses inflammatoires et la toxicité restent problématiques et limitent l'utilisation de ces vecteurs en clinique [215]. En effet, un essai clinique réalisé en 1999 a été à l'origine d'un décès d'un patient de 18 ans traité avec un AdV de 2^{ème} génération [216].

b. Les virus associés aux Adénovirus AAV

Le virus adéno-associé (AAV) a été initialement découvert comme contaminant des préparations d'adénovirus. Il appartient à la famille des Parvoviridae, se compose d'une petite capsidie non enveloppée et d'un génome d'ADN simple brin.

Après internalisation nucléaire, le génome viral est répliqué en ADN double brin. En l'absence de virus auxiliaire comme l'adénovirus, l'AAV s'intègre dans le génome de l'hôte et persiste de façon latente. Alors qu'en présence du virus auxiliaire, l'AAV est activement répliqué et libéré [217].

Le vecteur AAV présente plusieurs avantages pour la thérapie génique tels que sa nature non pathogène, sa faible immunogénicité, son potentiel d'expression transgénique à long

terme... [218]. Il a été utilisé principalement pour le traitement des troubles mono-génétiques. En effet, les essais cliniques de vecteur AAV pour le traitement de l'hémophilie ont démontré l'expression du facteur IX humain jusqu'à 6 semaines, laissant espérer que les vecteurs AAV pourraient être de puissantes alternatives à l'adénovirus et à d'autres vecteurs viraux [219], [220].

Cependant, le principal problème de sécurité du vecteur AAV vient toujours de sa nature d'intégration. Effectivement, ce problème de sécurité lié à l'utilisation du vecteur AAV en clinique a été posé suite à un accident mortel tardif dans un essai clinique. Un patient aux États-Unis est décédé après avoir été traité avec un vecteur AAV. Il s'agissait d'un essai clinique dans lequel un vecteur AAV a été utilisé pour délivrer un gène codant pour Enbrel® (un inhibiteur d'une cytokine pro-inflammatoire TNF- α) dans des cellules articulaires de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde. Cependant, le patient a développé un événement indésirable grave après une deuxième injection et est décédé 4 jours plus tard.

c. Les rétrovirus

Le rétrovirus comprend une particule enveloppée de lipides contenant un génome d'ARN linéaire simple brin. Trois sous-groupes sont inclus dans cette famille : les oncorétrovirus, les lentivirus (par exemple le VIH ou d'autres virus d'immunodéficience) et les spumavirus.

La technologie des vecteurs rétroviraux a été utilisée pour la 1ère fois dans les années 80 [221] et est la méthode la plus courante pour le transfert de gènes [222]. Les vecteurs rétroviraux offrent un moyen de corriger de façon permanente les maladies génétiques par intégration et expression stable d'un transgène dans les tissus en renouvellement.

Cependant, bien que plusieurs essais cliniques soient en cours (près de 17 %), le succès est limité en raison des effets négatifs chez l'homme. En effet, la mutagenèse médiée par un vecteur rétroviral est devenue un problème de sécurité grave après que 3 des enfants atteints de SCID-X1 (déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X) ont été traités avec un gène du récepteur de la cytokine délivré *ex vivo* à l'aide du virus rétroviral dans les cellules souches de la moelle osseuse et qui a entraîné une leucémie suivie d'un décès [223]. Depuis ces incidents, l'application du vecteur rétroviral en thérapie génique humaine est de plus en plus limitée.

2.2.2. Les vecteurs synthétiques

Bien que les vecteurs viraux aient une grande efficacité de délivrance des acides nucléiques, ils entraînent un certain nombre d'inconvénients induisant des réponses immunogènes néfastes, un effet oncogène, un coût élevé, etc., qui limitent fortement leurs applications thérapeutiques [224]. En revanche, bien que les vecteurs non viraux soient actuellement moins efficaces, ils peuvent réduire les problèmes de sécurité en raison de leur immunogénicité réduite ainsi que de leur composition physique et chimique bien définie, ce qui en fait des candidats prometteurs pour la délivrance de gènes ciblés, *in vitro* et potentiellement *in vivo* [225]. À ce jour, deux siRNA thérapeutiques, ONPATTRO® et GIVLAARI®, encapsulés dans des vecteurs synthétiques ont été approuvés pour une application commerciale, et deux siRNA, le Lumasiran (ALN-GO1) et l'Inclisiran, ont été soumis à la FDA. Sept siRNA font l'objet d'études cliniques de phase 3, et bien d'autres candidats qui sont à des stades précoces du développement [226]. Ces résultats encourageants ont permis d'explorer davantage divers systèmes de délivrance comme, des lipides, des polymères cationiques, des conjugués siRNA et des nanoparticules polypeptidiques, et ainsi les développer pour l'application *in vitro* et *in vivo* de siRNA [227].

2.2.2.1. Les conjugués du siRNA

La conjugaison directe d'un vecteur au siRNA s'est avérée être un système prometteur pour la vectorisation. Les matériaux conjugués les plus courants sont des petites molécules telles que les aptamères, les lipides, les peptides, les protéines et les polymères.

En plus de la nature de la molécule biogénique, la structure de l'espaceur qui relie le siRNA de manière covalente avec la biomolécule affecte l'efficacité et l'activité biologique du siRNA, en particulier dans la capacité de l'espaceur à être clivé lorsque le conjugué pénètre dans le compartiment intracellulaire. Ainsi, les liaisons disulfure et thioéther [228], [229], les liaisons sensibles au pH de type hydrazone [230], [231], ou les liaisons photosensibles [232] ont été largement utilisés comme des liaisons clivables pour le relargage du siRNA.

a. Conjugaison d'un siRNA à des lipides

Les conjugués lipophiles-siRNA comprenant du cholestérol, ont été les premiers systèmes à montrer une efficacité d'administration *in vivo* [233]. Le cholestérol a été conjugué à l'extrémité 3'-terminale du brin sense du siRNA *via* une liaison pyrrolidone (Figure 20). Il a été démontré que la conjugaison du siRNA au cholestérol pourrait non seulement augmenter l'efficacité de transfection des siRNA *in vitro* mais aussi améliorer le comportement pharmacocinétique des siRNA *in vivo*. De plus, le conjugué chol-siRNA peut se lier fortement à l'albumine sérique, avec une constante de dissociation estimée de 1 μ M [233]. L'albumine est la protéine sérique endogène la plus abondante et a une demi-vie de circulation d'environ 20 jours [234]. La liaison du chol-siRNA à l'albumine allongerait considérablement la demi-vie sérique à 90 min [235], ce qui serait responsable de l'élargissement de la biodistribution tissulaire au-delà du foie.

Pour optimiser davantage les conjugués cholestérol-siRNA, des lipoprotéines de haute densité (HDL) ont été liées, ce qui a augmenté l'efficacité de l'inhibition de gène de 8 à 15 fois *in vivo* [235]. En effet, l'absorption de la particule HDL est principalement médiée par le récepteur scavenger SR-BI (scavenger receptor class B type I). Il a été ainsi mis en évidence que les profils de biodistribution du HDL-chol-siRNA *in vivo* étaient bien corrélés avec l'expression du récepteur SR-BI dans les tissus [235].

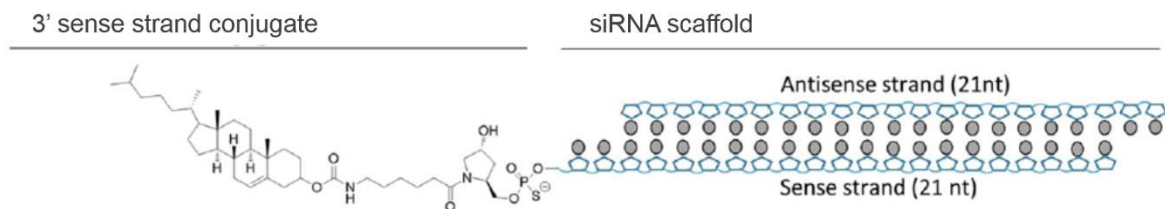


Figure 20: La structure chimique du conjugué cholestérol siRNA. Adapté de la référence [236].

L'efficacité thérapeutique du chol-siRNA peut être encore améliorée en ajoutant un activateur d'échappement endosomal. Pour cela, Arrowhead Pharmaceuticals a développé un dérivé naturel de la mélittine peptidique porogène (venin d'abeille) à administrer conjointement avec le chol-siRNA [237]. Le dérivé est une mélittine modifiée avec de l'acide diméthyl maléique carboxylé (groupe sensible au pH) qui peut être déprotégé et transformé en mélittine

naturelle dans l'environnement acide de l'endosome, activant ainsi son activité de formation de pores et de lyse des vésicules endosomales [238].

Un autre conjugué lipophile-siRNA est le R-tocophérol (vitamine E)-siRNA qui a été introduit pour l'administration systémique de siRNA au foie. La vitamine E lipophile a été conjuguée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin antisense du siRNA, qui a été partiellement modifiée avec une liaison ribose et phosphorothioate 2'-O-méthylée. L'administration intraveineuse du conjugué a permis une réduction significative de la protéine cible apoB (apolipoprotéine B) dans le foie sans aucune induction d'une réponse inflammatoire, telle que la production de l'interféron- α et l'interféron- β [239].

b. Conjugaison d'un siRNA à des peptides

Des siRNA ont été couplés à des peptides comme les CPP (cell penetrating peptides) afin d'améliorer l'efficacité de transfection. Les CPP également appelés PTD (protein transduction domain) sont des petits peptides de moins de trente acides aminés qui ont la capacité de traverser la membrane cellulaire indépendamment de la présence de récepteurs [240].

La pénétratine, le transporteur et le trans-activateur de la protéine de transcription (TAT) sont des CPP connus. Ils permettent l'internalisation cellulaire de macromolécules comme les peptides et les acides nucléiques [128].

TAT a été découvert à partir du virus de l'immunodéficience de type 1 (VIH-1) [241]. Il a été largement étudié pour la vectorisation d'oligonucléotides depuis que le groupe de Lebleu a constaté que ce petit peptide était capable de traverser les membranes cellulaires [242]. Ces expériences ont ainsi ouvert la voie aux premiers CPP pour la délivrance de molécules thérapeutiques.

TAT a été conjugué à l'extrémité 3' du brin antisense d'un siRNA en utilisant un espaceur non clivable hétérobifonctionnel (sulfosuccinimidyl-4- (p-maléimidophényl) butyrate) (Figure 21). Ce conjugué a montré une amélioration de délivrance intracellulaire de siRNA dépendant directement du nombre de molécules TAT conjuguées [243].

Concernant les autres CPP, des liaisons disulfures clivables à l'extrémité 5' du brin sense sont plus souvent retrouvées pour la bioconjugaison du siRNA afin de faciliter sa dissociation

du peptide (Figure 21). Ce type de bioconjugué a été appliqué pour assembler du siRNA avec la pénétратine et le transportan [243].

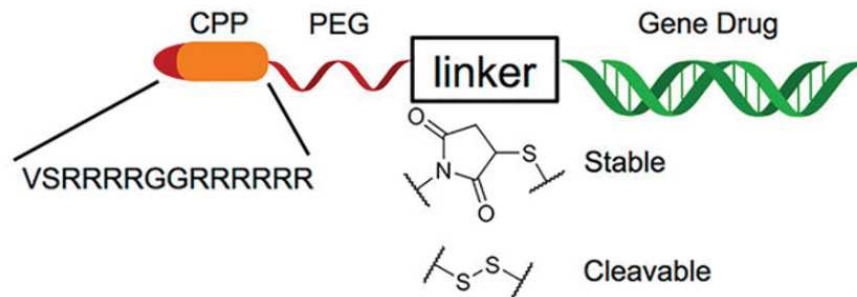


Figure 21: Stratégie de conjugaison CPP-siRNA par des liaisons stables ou des liaisons clivables. Adapté de la référence [244].

Il a été démontré que l'efficacité de l'extinction de gène par la stratégie de bioconjugué-siRNA pourrait être comparable à celle de la transfection médiée par les lipides cationiques tels que la lipofectamine [243]. Cependant, l'utilisation de certains conjugués CPP-siRNA, tel que le conjugué pénétратine-siRNA est limité *in vivo* car il pourrait provoquer une sécrétion élevée de cytokines inflammatoires, entraînant un risque d'immunogénicité ainsi qu'une cytotoxicité causée par une perturbation membranaire [236].

c. Conjugaison d'un siRNA à des ligands

Le siRNA pourrait être ciblé sur des cellules sélectionnées en se liant directement à des anticorps, des aptamères, des oligosaccharides...

La conjugaison N-Acetylgalactosamine (GalNAc)-siRNA est une stratégie de vectorisation très prometteuse en raison de sa capacité de transport exceptionnel avec un minimum d'effets néfastes. GalNAc est un dérivé de sucre aminé du galactose qui pourrait augmenter l'internalisation cellulaire dans le foie grâce à la reconnaissance de son récepteur ASialoGlyco-Protein (ASGPR) fortement exprimé dans les hépatocytes [245].

Après la liaison à l'ASGPR, le complexe est rapidement internalisé pour se retrouver dans des endosomes précoces *via* un mécanisme dépendant de la clathrine [246]. Il rejoint ensuite le compartiment cytoplasmique en seulement 15 minutes. Ces caractéristiques permettent au conjugué GalNAc-siRNA d'atteindre sa cible dans le foie, avec une libération cytoplasmique rapide, une activité biologique élevée et une toxicité limitée [116].

Plusieurs candidats médicaments GalNAc-siRNA sont en cours d'études cliniques, le Fitusiran (ALN-AT3sc) est un conjugué GalNAc-siRNA ciblant l'antithrombine qui est actuellement en essai cliniques de phase III (NCT03417102) pour le traitement de l'hémophilie A et B. Ce conjugué a été administré par voie sous-cutanée. Les résultats de la première phase ont montré une réduction du niveau d'expression de la protéine antithrombine de 59 % en moyenne avec un retour d'homéostasie dans la production de facteurs de coagulation [244]. Le médicament Givosiran développé par Alnylam Pharmaceuticals est un conjugué GalNAc-siRNA qui est dirigé spécifiquement contre l'aminolévulinate synthase 1 (ALAS1) pour le traitement de l'AHP. En 2019, Givosiran a été approuvé par la FDA. (cf. II. 1.4.1 siRNA).

Les aptamères ont également été couplés aux siRNA comme motif d'une délivrance ciblée. En tant que version d'acide nucléique des anticorps, les aptamères possèdent des caractéristiques uniques, telles qu'une synthèse facile et une absence d'immunogénicité, ce qui les rendent plus adaptables pour la stratégie de conjugaison. Sullenger *et al.* ont utilisé l'approche SELEX pour sélectionner un aptamère capable de cibler le récepteur de l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) [247]. En effet, comme preuve de concept, des cellules cancéreuses de la prostate LNCaP et PC-3 ont été traitées avec l'aptamère-siRNA chimérique contenant une séquence siRNA thérapeutique qui cible les gènes surexprimés dans les tumeurs humaines (PLK1 et Bcl2). La suppression d'expression de ces gènes a été efficace et a entraîné une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose [244].

Une autre propriété intéressante de certains aptamères est leur capacité à traverser la barrière hématoencéphalique (BHE). Par exemple, il a été démontré que les aptamères Gint4.T et GL21.T, spécifiques du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes de type bêta (PDGFR β), peuvent pénétrer le modèle *in vitro* de la BHE [248]. Le conjugué aptamère-siRNA est capable de s'accumuler dans les glioblastomes xénotransplantés après plusieurs injections intraveineuses, de diminuer l'expression du gène cible (STAT3) de 60% et de réduire le taux de croissance tumorale [249].

Bien que les conjugués aptamères-siRNA aient une efficacité biologique élevée au niveau expérimental, leur utilisation en clinique a été limitée par des facteurs tels que le clivage par des nucléases et la filtration par les reins.

En plus des aptamères, les anticorps monoclonaux sont connus pour leurs propriétés de reconnaissance des cibles biologiques. En 2005, Lieberman *et al.* ont montré l'utilisation d'un conjugué d'un anticorps monoclonal pour l'administration de siRNA afin d'inhiber la production de protéines du VIH [250]. L'anticorps a été conjugué à l'oligonucléotide *via* une réaction de « chimie click ». Cette stratégie a été développée par Satake *et al.* pour conjuguer l'anticorps anti-CD22 à l'oligonucléotide MXD3 (MAX Dimerization Protein 3). Cet oligonucléotide cible une protéine dimérique (MXD3) associée à MYC ; un facteur de transcription responsable de la survie des cellules précurseurs des lymphocytes B dans la leucémie lymphoblastique aiguë. Le conjugué a induit une inactivation de la protéine MXD3 responsable de l'apoptose *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses [251].

De plus, les conjugués anticorps-siRNA ont été utilisés dans des applications oncocérébrales. Un anticorps monoclonal ciblant le récepteur de la transferrine au niveau de la BHE a été conjugué au siRNA *via* une liaison biotine-streptavidine. L'administration intraveineuse du conjugué anticorps-siRNA a conduit à la suppression efficace de l'expression du gène cible dans un modèle de rat portant des tumeurs cérébrales intracrâniennes [252].

Sur la base de ces résultats encourageants, les conjugués anticorps-siRNA sont devenus une nouvelle option thérapeutique pour minimiser les doses et favoriser l'accumulation du siRNA aux sites souhaités. Cependant, la sélection d'anticorps ou de fragments d'anticorps pour cibler un type de cellule spécifique reste difficile. De plus, la réponse immunitaire et la faible efficacité de l'échappement endosomal sont le principal inconvénient de cette approche. Ainsi, une optimisation supplémentaire comprenant l'utilisation d'anticorps humanisés ou de fragments Fab ou encore de nanobodies et d'agents endosomolytiques, est nécessaire pour une utilisation efficace des conjugués anticorps-siRNA en clinique.

d. Conjugaison d'un siRNA à des polymères

La conjugaison directe du siRNA aux polymères permet d'offrir une voie intéressante pour améliorer la stabilité, la pharmacocinétique, l'internalisation cellulaire et la délivrance de la molécule thérapeutique. À cet égard, les réactions de « chimie click » ainsi que l'utilisation de liaisons disulfures sont devenues les deux stratégies les plus utilisées pour conjuguer des polymères directement à des siRNA. De ce fait, des polymères déjà utilisés en médecine, tels que le polyéthylène glycol (PEG) et le polyacide lactique-co-glycolique (PLGA) ont été conjugués au siRNA afin de faciliter la délivrance intracellulaire [253].

Le PEG, un polymère biocompatible, hydrophile et non ionique a été conjugué pour la première fois à des oligonucléotides afin d'améliorer la stabilité, d'éviter la dégradation rapide et d'améliorer l'internalisation cellulaire [254]. De plus, il a été rapporté que le PEG conjugué au siRNA *via* une liaison labile à pH acide faciliterait une inhibition efficace de gène dans les cellules d'hépatome *in vitro* [255] et dans un modèle tumoral [256]. Il a été également rapporté que la conjugaison du siRNA au PEG 20K permet d'obtenir un taux de clairance beaucoup plus lent *in vivo* (~ 50% resté 1 h après l'injection) par rapport au siRNA nu (<10% à 15 min) [257].

En outre du PEG, le PLGA biodégradable a été conjugué à l'extrémité 3' du siRNA *via* une liaison disulfure pour former des conjugués hybrides siRNA-PLGA. Les conjugués siRNA-PLGA ont été auto-assemblés pour former une structure micellaire sphérique grâce à la nature hydrophobe du PLGA [258].

- **Polyconjugué dynamique de siRNA**

Pour échapper aux obstacles pendant la délivrance du siRNA, les systèmes de livraison doivent généralement exploiter les potentiels de plusieurs composants différents pour une délivrance sûre et efficace de siRNA dans les cellules cibles. Quant au système bioconjugué polymère-siRNA, ces composants essentiels peuvent inclure un ligand pour un ciblage spécifique, un composant endosomolytique pour l'échappement endosomal, un siRNA comme cargaison et une chaîne PEG pour allonger la rétention sanguine et la furtivité. Pour produire ce système multiconjugué, les scientifiques couplent généralement tous ces composants de manière réversible, étape par étape dans un squelette polymère qui contient de nombreux sites conjugués (tels que la polylysine). La réaction de conjugaison sur le squelette est dynamique et il est difficile de contrôler avec précision la position ou l'étendue du conjugué. Pour cela, ce système est nommé « polyconjugué dynamique ».

Rozema *et al.* ont développé les premiers polyconjugués dynamiques pour la livraison ciblée *in vivo* de siRNA au foie [259]. Le siRNA a été lié au polyvinyl ether (PBAVE) par liaison disulfure. Sur le squelette du polymère, des groupements de PEG et des résidus de ciblage GalNAc sont attachés en utilisant une liaison pH-sensible. Ainsi, après pénétration du polyconjugué dynamique par endocytose médiée par les récepteurs ASGPR et leur entrée dans l'environnement acide de l'endosome, les liaisons pH-sensibles sont clivées et la N-acétylgalactosamine et le polyéthylène glycol sont dissociés du polyconjugué. Suite à cela, les groupements amine nouvellement formés sur PBAVE seront protonés, ce qui conduit à une

diminution du pH endosomal, une augmentation de la pression osmotique et une rupture de la membrane endosomale. Les conjugués de PBAVE et de siRNA sont libérés par la suite dans le cytoplasme, suivis d'un clivage de la liaison disulfure par le système réducteur glutathion conduisant à un détachement du siRNA du polymère (Figure 22). Rozema *et al.* ont également démontré que la libération du siRNA-apoB dans le cytoplasme avait entraîné une suppression importante du gène apoB endogène dans le foie de souris après une simple administration intraveineuse à basse pression.

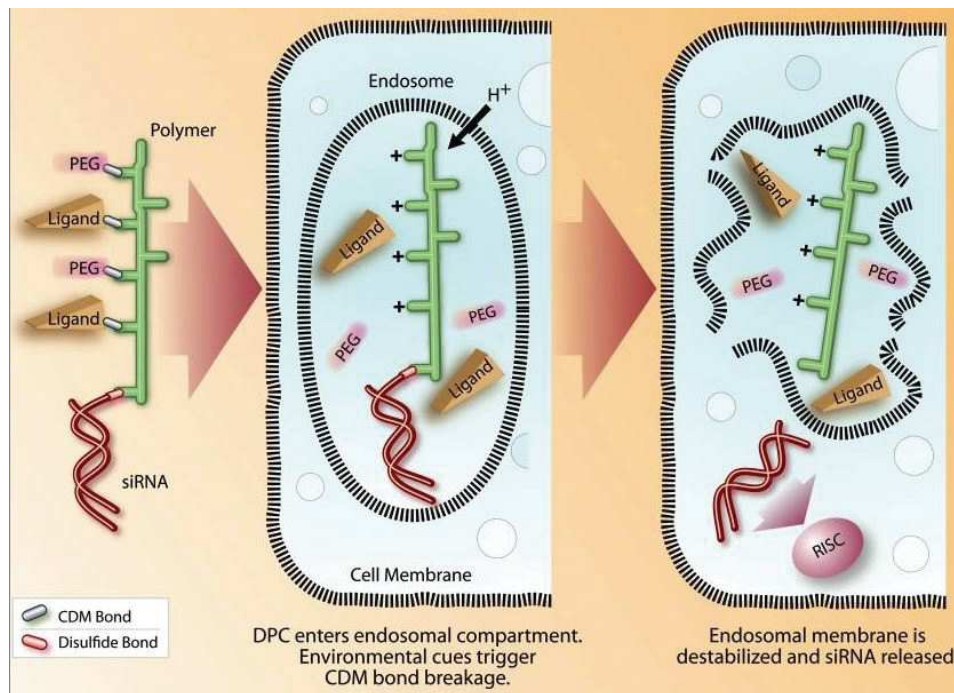


Figure 22: Les composants critiques du Poly conjugué dynamique de siRNA proposé par Rozema *et al.* Adapté de la référence [259].

Cependant, dans la seconde génération des polyconjugués dynamiques, le siRNA n'a pas été lié directement au polypeptide mais conjugué au cholestérol pour faciliter la pénétration membranaire. L'injection intraveineuse du conjugué cholestérol-siRNA a entraîné une accumulation de siRNA principalement dans le foie.

La stratégie de co-injection utilisant le PBAVE et le cholestérol-siRNA représente un outil prometteur en clinique. En outre, une multitude de polyconjugués similaires ont été développés pour la livraison ciblée de siRNA suivant le même principe de conception, mais utilisant des polymères différents, tels que la polylysine polyamido amine....

Avec le même système de conception, la polylysine a été conjuguée au siRNA couplée à des groupements PEG et de la melittine. Les résultats *in vitro* étaient encourageants, tandis

qu'in vivo, une haute toxicité a été observée [260]. Ainsi, les essais cliniques de plusieurs médicaments à base de PBAVE et de melittine pour le traitement des maladies du foie ont été interrompus en raison de leur toxicité élevée. De ce fait, des optimisations sont nécessaires pour une utilisation thérapeutique.

e. Conjugaison d'un siRNA à des nanoparticules

Les nanoparticules ont un immense potentiel pour améliorer l'administration des siRNA *in vivo*. Les avantages des nanoparticules, tels que le contrôle de la taille et de la forme et la capacité de protéger le siRNA de la dégradation, favorisent la livraison de siRNA à travers les barrières biologiques. Une large gamme de nanoparticules est actuellement en étude pour la délivrance de siRNA dans le traitement du cancer [261]. Les nanoparticules peuvent transporter le siRNA sous forme de molécules attachées en surface *via* des liaisons covalentes formant des conjugués-siRNA.

Divers matériaux nanostructurés (par exemple, des nanoparticules d'or (AuNP), des nanoparticules magnétiques (MNP), des nanotubes de carbone (CNT), des Quantum dots (QD)) ont été utilisés pour la conjugaison des siRNA dans le contexte de la théranostique (thérapie et diagnostic).

Les Quantum dots : Les QD sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents avec des propriétés d'émission accordables dans une large gamme de couleurs. Ils sont considérés comme des outils puissants dans le ciblage du cancer, l'imagerie d'animaux vivants et l'étude de la physiopathologie dans le tissu tumoral [262]. Des QD PEGylés avec des groupements amines en surface ont été utilisés pour la conjugaison d'un siRNA ciblant un gène codant pour la protéine de fluorescence verte (GFP) par une liaison non clivable. Le conjugué a pu être délivré avec succès dans les cellules HeLa sans agent de transfection mais sans aucun effet d'inhibition génique en raison de l'absence d'une fonction d'échappement endosomal. Cependant, une réduction significative de l'expression du gène cible a été observée lorsque le siRNA a été conjugué à des QD *via* une liaison disulfure démontrant l'importance de la liaison clivable sur l'effet de libération du siRNA [263]. L'inconvénient majeur de l'utilisation des QD comme sondes d'imagerie et systèmes de vectorisation est leur cytotoxicité élevée, car la plupart des QD sont composés d'éléments chimiques hautement toxiques, tels que le cadmium ou le sélénium [264]. L'encapsulation de ces QD dans des polymères peut être une

alternative pour résoudre certains problèmes liés à la toxicité aiguë, mais peut diminuer leur potentiel intrinsèque en tant que véhicules de livraison.

Les Nanoparticules d'or : Les AuNP ont été explorées comme un véhicule prometteur de livraison de siRNA en raison de leur biocompatibilité et de leur simple fonctionnalisation *via* des liaisons covalentes entre le groupe thiol et Au [265]. De plus, leurs propriétés optiques permettent d'utiliser les conjugués AuNP—siRNA pour des applications d'hyperthermie ainsi que pour l'imagerie *in vivo* [266]. La méthode la plus directe pour utiliser les AuNP comme vecteur de siRNA consiste à conjuguer le siRNA sur la surface de l'AuNP *via* la chimie covalente thiol-or. Nagasaki *et al.* ont utilisé pour la première fois des conjugués siRNA – AuNP. Ils ont modifié des AuNP de 15 nm avec du polymère thiol peggylé, suivi par un siRNA auto-assemblé thiolaté. Les conjugués AuNP /siRNA résultant ont conduit à une efficacité d'inhibition des gènes de 65% sur les cellules d'hépatome humain HuH-7 [267].

Les conjugués covalents siRNA—AuNP peuvent être en outre recouverts de polymère cationique ou de CPP pour améliorer l'efficacité de la livraison de siRNA. Par exemple, Reich *et al.* ont conjugué du siRNA thiolaté sur une surface de nanocellule d'or, puis fixé les CPP. Lors de l'irradiation dans proche infrarouge (NIR), le siRNA a été libéré de la surface de l'or et s'est échappé du compartiment endosomal [268].

Dans une étude *in vivo*, des conjugués AuNP – siRNA VEGF, ont été administrés par instillation intratrachéale à une dose de 0,05 mg / kg de siRNA dans un modèle murin de cancer du poumon. Après 21 jours de traitement, le niveau d'expression du gène VEGF cible dans les cellules cancéreuses du poumon a été inhibé avec succès et la taille de la tumeur a diminué de 95% [269].

Les nanoparticules magnétiques : Les MNP ont fait l'objet de recherches approfondies pour leurs applications biomédicales potentielles, telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'hyperthermie, et la vectorisation de médicaments [270]. Pour une délivrance de siRNA avec visualisation concomitante de sa localisation *in vivo* Medarova *et al.* ont développé les conjugués MNP-siRNA-Cy5. Ces conjugués magnétiques MNP-siRNA ont été visualisés avec succès simultanément par IRM et fluorescence dans les tissus tumoraux après injection intraveineuse [271].

De plus, des conjugués MNP-siRNA dirigés contre la survivine ont été injectés par voie intraveineuse à des souris portant un adénocarcinome sous-cutané. L'IRM a montré que les conjugués s'accumulaient efficacement dans les tumeurs, résultant d'un effet de perméabilité et de rétention (EPR) amélioré. La libération du siRNA-survivine dans le tissu tumoral a entraîné une diminution significative du taux d'ARNm de survivine (inférieur de 97% à celui des témoins) [271].

Les nanotubes de carbone : Les CNT sont récemment apparus comme un choix de remplacement pour le traitement du cancer en tant que vecteur pour la délivrance de siRNA. Avec leur structure à nano-aiguilles, les CNT peuvent pénétrer facilement dans le cytoplasme sans induire de nécrose [272]. En effet, une étude a démontré que des conjugués nanotubes-siRNA clivables étaient plus efficaces pour l'inhibition génique d'environ 20%, par rapport à celui des complexes lipofectamine/siRNA *in vitro* [243].

Les nanoparticules de silice : Il existe différents types de nanoparticules de silice selon la présence ou non de pores [273]. Parmi ces nanoparticules, les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) ont fait l'objet de plusieurs études ces dernières années en tant que vecteurs de gènes pour des applications biomédicales [274]. En effet, avec leurs avantages de biocompatibilité, de stabilité chimique, de surface spécifique élevée, de fonctionnalisation de surface facile et des pores uniformes qui permettent une capacité de charge élevée de médicament, les MSN sont devenues un centre d'intérêt pour l'administration de siRNA [274]. Contrairement aux autres nanoparticules, les MSN ne sont pas des conjugués covalents au siRNA, ils encapsulent le siRNA dans leurs pores ou par liaison électrostatique. Chen *et al.* ont montré la première preuve de concept d'utilisation des MSN en tant que système pour délivrer simultanément de la doxorubicine et du siRNA-Bcl-2 dans des cellules cancéreuses multi-résistantes. Ils ont ainsi montré une inhibition de 80% du gène Bcl-2 et une action augmentée de la doxorubicine [275].

Les stratégies de conjugaison au siRNA décrites ci-dessus peuvent améliorer la capacité des conjugués à s'accumuler dans certains organes et à pénétrer dans certains types de cellules cibles. Cependant, il existe encore un certain nombre de problèmes non résolus qui limitent la possibilité de transfert de ces outils du laboratoire à la clinique. Le principal problème est la faible biodisponibilité des conjugués siRNA et la pharmacocinétique défavorable, ce qui

limiterai l'obtention d'une quantité suffisante de médicaments pour avoir un effet thérapeutique significative.

2.2.2.2. Les complexes supramoléculaires du siRNA

En plus des vecteurs conjugués au siRNA, des matériaux cationiques ont été étudiés pour une délivrance efficace et contrôlée des siRNA. Ces vecteurs cationiques ont la capacité de se lier aux oligonucléotides anioniques par interactions électrostatiques afin de former des complexes. Le challenge actuel est de développer de nouveaux vecteurs biocompatibles capables de traverser les barrières intracellulaires et extracellulaires.

a. Les lipides cationiques

Les vecteurs à base de lipides sont l'un des systèmes d'administration de siRNA les plus prometteurs et les plus étudiés pour les applications systémiques, en raison de leur biodégradabilité et de leur biocompatibilité. Le développement de différentes stratégies de formulation utilisant un certain nombre de lipides différents a généré une grande variété de nanoparticules lipidiques. L'efficacité de délivrance des gènes dépend de la taille et de la charge des liposomes, du degré de PEGylation, du type de ligand de ciblage et du tissu de ciblage [276].

Parmi les systèmes de vectorisation lipidique, **les liposomes cationiques** (Figure 23) sont devenus l'un des véhicules les plus attrayants en raison de : i) la simple manière de complexation avec le siRNA, ii) de leur efficacité de transfection élevée, iii) de leurs propriétés pharmacocinétiques améliorées et de vi) leur toxicité relativement faible. De plus, les liposomes cationiques peuvent protéger le siRNA contre l'action enzymatique et assurer une clairance rénale réduite [277].

En clinique, il existe plusieurs formulations médicamenteuses commercialisées sous forme de liposomes pour le traitement du cancer dont le Doxil® encapsulant de la doxorubicine utilisé dans le traitement du Sarcome de Kaposi et du cancer du sein métastatique [253], [278].

La première transfection efficace de gène en utilisant des liposomes cationiques a été décrite dans les années 1980 par Felgner *et al.* Il s'agissait du chlorure de N- [1- (2,3 dioléxyloxy) propyl-N, N, N-triméthylammonium (DOTMA) qui a été utilisé pour délivrer de l'ADN plasmidique dans des cellules de mammifères [279]. Depuis, plusieurs liposomes cationiques adaptés à la délivrance de siRNA ont été développés [280].

Des formulations à base de liposomes cationiques sont disponibles dans le commerce tel que la lipofectamine 2000. Elle est largement utilisée pour la transfection *in vitro* d'ADN plasmidique ou de siRNA. La lipofectamine 2000 ou la lipofectamine RNAiMAX sont des agents de transfection de siRNA *in vitro* qui peuvent améliorer l'efficacité de la transfection [281]. Le mécanisme de complexation implique des interactions électrostatiques entre des acides nucléiques chargés négativement et des lipides chargés positivement. Lorsqu'ils sont mélangés, ils forment spontanément des lipoplexes [282]. Cependant, ce système a montré des cytotoxicités élevées, ce qui a limité son utilisation *in vivo*.

Il a été démontré plus tard que l'internalisation cellulaire des liposomes cationiques est principalement médiée par endocytose [283]. Ainsi, l'ajout de certains lipides «helper» à charge neutre, tels que la dioléoyl phosphatidyl éthanolamine (DOPE), la 1,2-dioléoyl sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (DOPC) et le cholestérol au liposome pourrait améliorer l'efficacité de transfection du siRNA, probablement en raison de la perturbation de la membrane endosomale [284]. D'autres stratégies d'échappement endosomal ont également été appliquées aux liposomes cationiques pour améliorer l'efficacité de la transfection, telles que le greffage d'un résidu histidine ou l'incorporation d'un tensioactif sensible au pH [285].

De plus, le greffage de chaînes PEG sur la surface des complexes siRNA/liposomes protège de l'évasion du système réticuloendothélial (RES) et augmente le temps de circulation sanguine. En raison de la nature stérique et électrostatique du PEG, les liposomes furtifs retardent la liaison des protéines d'opsonine à sa surface et les nanoparticules sont capables de circuler plus longtemps, leur permettant de s'accumuler dans l'environnement tumoral en quantité relativement élevée [286].

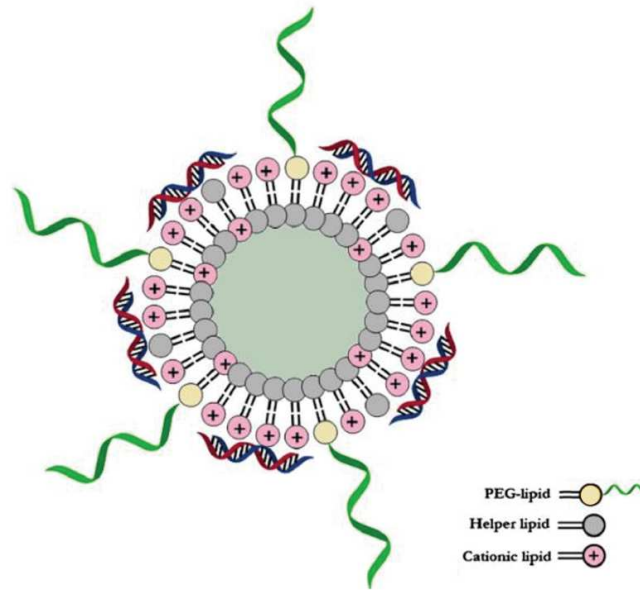


Figure 23 : Liposome cationique et siRNA formant un lipoplexe par liaison électrostatique. Adapté de la référence [287].

En 2005, Landen *et al.* ont utilisé le DOPC seul afin d'encapsuler du siRNA dirigé contre l'oncogène EphA2, un récepteur de la tyrosine kinase. La délivrance de ce liposome dans un modèle de cancer ovarien de la souris a permis l'inhibition de l'ARNm d'EphA2 48 h après une seule injection de lipoplexes [288]. Actuellement, ce lipoplexe (siRNA-EphA2-DOPC) est en cours d'étude clinique de phase I (NCT01591356) (cf. II. 1.4.1. siRNA)

Atu027 est un médicament siRNA complexé dans un liposome ciblant la protéine kinase PKN3 responsable de la croissance cellulaire invasive. Il a été utilisé pour le traitement des métastases ganglionnaires dans des modèles murins de cancer de la prostate et du pancréas et dans divers modèles murins de métastases pulmonaires [289]. Silence Therapeutics a effectué un essai de phase I sur Atu027 (NCT00938574). Les résultats préliminaires ont révélé qu'Atu027 était bien toléré jusqu'à une dose de 0,18 mg / kg et n'était pas associé à une toxicité dose-dépendante [290].

Cependant, d'autres études ont montré que certains liposomes cationiques ont un succès limité *in vivo* en raison d'une toxicité dose-dépendante [128]. Pour cela, une nouvelle classe de liposomes cationiques plus stables a été développée. Les **LNP (Lipid nanoparticle)** sont des nanoparticules lipidiques d'environ 120 nm de diamètre, qui ont été utilisées pour administrer du siRNA aux mammifères *in vivo*. Dans les LNP, le siRNA est entouré d'une bicouche lipidique contenant un mélange de lipides cationiques et fusogènes qui permettent l'absorption

cellulaire et la libération endosomale du siRNA. Les surfaces des LNP sont recouvertes de PEG pour fournir un extérieur neutre, hydrophile et assurer une furtivité [291].

La première utilisation des LNP a été réalisée par Zimmermann *et al.* pour réduire l'expression du gène Apo B chez les primates non humains avec une dose unique (2,5 mg / kg) de siRNA. Des réductions significatives des taux de l'ApoB ont été observées 24 h après l'administration systémique et ont duré 11 jours [292].

Les LNP sont les vecteurs lipidiques les plus retrouvés dans les essais cliniques. Ils ont été utilisés pour le traitement de nombreuses maladies, dont l'infection virale de l'hépatite B, la dyslipidémie et l'Ébola [197]. Judge *et al.* ont démontré avec succès une réduction de 75% de la taille d'une tumeur sous-cutanée avec le traitement LNP-siPlk1 [293]. En 2010, ce lipoplexe (TKM080301) est entré en essai clinique de phase I/II pour traiter des patients adultes atteints de tumeurs solides ou de lymphomes (NCT01262235) (cf. II. 1.4.1. siRNA).

Alnylam Pharmaceuticals a développé le premier médicament siRNA à double cible de gène (ALNVSP02). Le siRNA encapsulé dans le LNP ciblait le facteur de croissance endothéliale vasculaire VEGF et KSP/KIF11 (kinesin spindle protein /kinesin family member 11). Un essai de phase I pour le traitement des tumeurs solides avancées avec atteinte hépatique a été lancé en avril 2009. Les données intermédiaires des 28 premiers patients ont démontré que l'ALNVSP02 était généralement bien toléré à la dose la plus élevée (1,25 mg / kg) [294].

Les particules lipidiques d'acide nucléique stabilisé sont devenues une plate-forme de délivrance prometteuse pour des molécules telles que le siRNA. En effet, ONPATTRO® (Patisiran) a été formulé à partir de LNP encapsulant du siRNA anti-TTR et a été approuvé par la FDA pour le traitement de l'amylose médiée par la transthyrétine en Août 2018 (cf. II. 1.4.1. siRNA).

b. Les peptides cationiques

Les peptides ont été largement étudiés pour la délivrance d'acides nucléiques tels que le siRNA. Ainsi, la formation de complexes par des liaisons électrostatiques entre le siRNA et les peptides cationiques tels que les CPP semble être la méthode privilégiée [295] (Tableau 5).

En effet, les CPP ont été utilisés pour la vectorisation de macromolécules comprenant des protéines comme les anticorps, des peptides et des oligonucléotides [296], [297]. Ce système de délivrance peut pénétrer directement dans les cellules en traversant la membrane cellulaire

d'une manière apparemment indépendante de l'énergie [298]. Le groupe de Sagan avait montré que la présence des groupements hydrophobes tel que le tryptophane ont un rôle majeur dans l'interaction avec la bicouche de la membrane plasmique et sont donc censés améliorer la translocation peptidique à travers cette membrane [297]. Cependant les mécanismes exacts d'internalisation cellulaire des CPP cationiques restent controversés [299].

Les **CPP cationiques** comme R8 et R9 contenant plusieurs répétitions d'arginine sont parmi les CPP les plus étudiés à ce jour [300]. En effet, les travaux pionniers de Wender *et al.* ont montré que les oligomères courts d'arginine étaient beaucoup plus efficaces pour pénétrer dans les cellules que les oligomères courts d'histidine et de lysine [301]. Depuis, plusieurs autres études ont montré une inhibition de gène efficace sur plusieurs lignées cellulaires de mammifères en utilisant des complexes CPP R8 et R9/siRNA avec des ratios molaire peptide/siRNA (50/1) [302], [303]. Cependant, les concentrations élevées de CPP cationiques ont induit une cytotoxicité importante dans plusieurs lignées cellulaires [302]. Ainsi, l'amélioration de l'hydrophobicité des CPP a été explorée afin de réduire cette toxicité et augmenter l'adsorption à la surface des cellules. En ce sens, l'insertion d'un fragment stéaryle hydrophobe à l'extrémité N-terminale de 8R (STR-R8) a entraîné une administration fonctionnelle de siRNA dans les neurones primaires de rat avec un ratio molaire peptide/siRNA de 2/1 [304].

De même, l'insertion du cholestérol sur le CPP R9 (Chol-R9) a entraîné une réduction de plus 50% de l'expression du gène VEGF dans les cellules du cancer du côlon CT-26 avec un rapport de charge N/P (peptide/siRNA) de 40/1. L'utilisation de ce complexe modifié *in vivo* a entraîné une régression tumorale importante chez la souris [305].

Plusieurs d'autres études intéressantes ont porté sur la délivrance de siRNA complexé à un CPP hybride synthétique appelé MPG. MPG est un **CPP amphipathique** primaire qui possède un domaine N-terminal hydrophobe dérivé de la sous-unité glycoprotéine d'enveloppe du VIH gp41 (GALFLGFLGAAGSTMGAWSQP) et un domaine C-terminal hydrophile comprenant le signal de localisation nucléaire (NLS) de l'antigène T SV40 (KKKRKV) [306].

Les CPP amphipathiques présentent l'avantage d'être internalisés par un mécanisme indépendant de l'endocytose, à travers une perturbation temporaire de la membrane plasmique. Ce qui permet d'éviter les stratégies d'échappement endosomal [307].

Le domaine C-terminal du CPP MPG permet de cibler le trafic vers le noyau mais peut également interagir avec des cargaisons anioniques en raison de sa composition de base. Ainsi,

L'utilisation du complexe MPG/siRNA sur les fibroblastes HS-68 humaines a permis de réduire l'expression de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), mais a nécessité un rapport molaire peptide/siRNA de 84/1 [308]. Afin d'augmenter la délivrance du siRNA dans le compartiment cytoplasmique par le CPP MPG, le deuxième résidu de lysine dans le motif NLS a été muté en sérine, ce qui a aboli la localisation nucléaire. Cette modification a conduit à une inhibition de la luciférase à 90% dans des cellules HeLa et Cos-7, et une inhibition du gène GAPDH de 80% dans les cellules HS-68 avec un ratio de charge peptide/siRNA de 10/1. Cependant, l'administration intra-tumorale du MPG modifié complexé au siRNA-Cycline B1 était peu efficace et avait une faible stabilité *in vivo* [309].

Par la suite, le groupe de Divita a développé un nouveau vecteur à base de CPP amphipathique pour le siRNA, nommé CADY. CADY est un peptide amphipathique secondaire dérivé du peptide fusogène JTS1 qui est sous forme libre en solution et qui adopte une conformation hélicoïdale lors de l'interaction avec des phospholipides ou du siRNA [307]. Il a été démontré que le peptide CADY forme efficacement des complexes avec le siRNA ciblant l'ARNm de GAPDH et peut entraîner une inhibition efficace du gène dans une variété de cellules primaires. En effet, une inhibition de GAPDH (plus de 80%) a été observée avec seulement 20 nM de siRNA-GADPH complexé à un ratio N/P 40/1 [310].

De plus, plusieurs études sur les complexes CADY/siRNA montrent que le CADY permet une transfection efficace du siRNA sans entraîner de cytotoxicité aiguë ou chronique *in vitro*. Cependant, plusieurs paramètres devraient encore être optimisés (stabilité en conditions physiologiques, ciblage, dissociation du siRNA...) pour des applications *in vivo* et à des fins d'études cliniques [311].

Type de CPP	Nom	Séquence (AA)	Référence
Cationique	R8	RRRRRRRR	[312]
	R9	RRRRRRRRR	[302]
Hydrophobe	Chl-R9	Chol-RRRRRRRRR	[305]
	Stearyl-TP10	Stearyl-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-Cysteamide	[313]
Amphipathique	MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	[308]
	CADY	GLWRALWRLLRSLWLLWKA	[310]
	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	[314]

Tableau 6: Exemples de systèmes d'administration de siRNA à base de CPP formant des complexes par liaison électrostatique.

En plus des CPP cités précédemment, la technologie des **Stapled peptides** est apparue ces dernières années comme une stratégie de référence pour transformer un peptide linéaire en une hélice stable et biologiquement active pour la délivrance de molécules thérapeutiques.

Les Stapled peptides (Figure 24) sont de petits peptides, typiquement organisés dans une conformation alpha-hélicoïdale, qui est maintenue par un espaceur synthétique appelé « staple ou agrafe » [315]. Cette agrafe est formée par une liaison covalente entre deux chaînes latérales d'acides aminés, formant un macrocycle peptidique. En effet, la présence d'un contenu alpha-hélicoïdal permet d'augmenter l'affinité de liaison, la résistance aux protéases et surtout, favoriser l'internalisation cellulaire [316] en exposant les chaînes latérales non polaires à l'environnement externe.

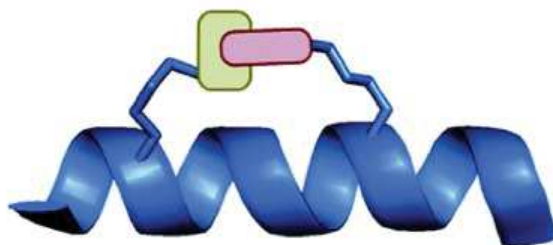


Figure 24 : Schéma représentatif des Stapled peptides. Adapté de la référence [317].

Comme mentionné précédemment, l'augmentation de l'hydrophobicité du squelette des CPP permet de favoriser leur interaction avec les phospholipides et faciliter leur translocation de manière «auto-activée» [297]. Ainsi, plusieurs études ont développé des CPP cationiques qui présentent une hydrophobicité améliorée mais qui n'ont toujours pas la capacité d'adopter des structures hélicoïdales stables. Il serait donc intéressant d'intégrer à la fois l'hélicité et l'hydrophobicité dans la conception de CPP cationiques afin d'augmenter leur perméabilité membranaire [318]. En effet, des travaux sur la translocation des CPP montre que la formation d'une hélice dans les CPP par différents stratégies est essentielle pour stabiliser leurs interactions membranaires et favoriser leur internalisation cellulaire. Il a été démontré que l'utilisation d'une plateforme de polyproline intégré dans l'hélice α d'une petite protéine permet d'augmenter la pénétration cellulaire de manière significative avec un nombre minimal de résidus d'arginine chargés positivement [319]. Cependant, cette technologie n'a été mise en valeur qu'après l'introduction des « hydrocarbon stapled peptides » par Verdine et ses collègues en 2000 [320]. Il était ainsi possible de lier les chaînes latérales de deux acides aminés (di-substitution α - α) afin de forcer un peptide à prendre une structure en hélice α . De plus, il a été démontré qu'il était possible d'utiliser un double agrafage, donnant généralement suffisamment d'hélicité au peptide souhaité [317]. Diverses études ont rapporté le potentiel thérapeutique des « hydrocarbon stapled peptides » dans le traitement du cancer et pour d'autres maladies, tels que le VIH, le diabète. A l'heure actuelle, deux « hydrocarbon stapled peptides » développés par Aileron Therapeutics font actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement de troubles endocriniens orphelins et de tumeurs malignes [321].

Dans le contexte de la thérapie génique anti-cancéreuse, de récents travaux du groupe de Yu ont montré une encapsulation ainsi qu'une internalisation efficace de siRNA *in vitro* sur des cellules HeLa et dans un modèle *in vivo*, en utilisant des Stapled peptides riches en histidine [322]. Ces premiers résultats montrent clairement que cette nouvelle stratégie de vectorisation est très prometteuse pour une délivrance efficace de siRNA thérapeutique.

c. Les polymères cationiques

Les systèmes d'administration à base de polymères généralement appelés nanoparticules polymériques, sont des systèmes colloïdaux solides et biodégradables qui ont été largement étudiés en tant que vésicules médicamenteuses [323]. Ils ont également été utilisés pour la vectorisation de l'ADN plasmidique et plus récemment pour le siRNA.

Comme avec les systèmes de vectorisation à base de lipides ou peptides, la délivrance de siRNA par des polymères implique généralement une fraction cationique comme composant central pour former des polymères cationiques.

Les polymères cationiques linéaires ou ramifiés sont des matériaux synthétiques qui peuvent se lier à l'ADN ou à l'ARN par liaison électrostatique, les condenser en nanoparticules appelées « polyplexes ».

Les polymères cationiques tels que le chitosane, la cyclodextrine et la polyéthylèneimine (PEI) ont un grand potentiel en thérapie génique humaine en raison de leur faible coût, de leur manipulation facile, de leur efficacité, ainsi que de leur flexibilité dans les modifications physiques/chimiques pour acquérir des propriétés plus améliorées [324]

Les polyamines synthétiques ont été largement appliquées dans l'administration de siRNA. La **PEI** est l'une des polyamines les plus largement étudiées et utilisées comme véhicule pour l'administration de siRNA [325]. La PEI est composée de groupes éthylèneimine répétés qui contient des groupes amines fournissant une densité de charge positive élevée afin d'établir une liaison électrostatique avec les groupements phosphates du siRNA. En raison de la présence de groupes amines, on pense que la PEI agit comme une éponge à protons qui induit potentiellement la rupture de la membrane endosomale, entraînant ainsi la libération du polyplexe PEI/siRNA dans le cytoplasme [326].

Les PEI sont disponibles sous forme de structures linéaires ou ramifiées avec des poids moléculaires allant de 1 à 1 000 kDa; ces deux propriétés peuvent affecter leur efficacité de transfection et leur toxicité. En général, une structure ramifiée confère une efficacité de transfection plus importante alors qu'un poids moléculaire plus élevé peut conduire à une plus grande toxicité. Ainsi, la complexation non covalente du siRNA avec une PEI de faible poids moléculaire pourrait améliorer la distribution intracellulaire du siRNA [327].

L'influence de la masse molaire de PEI ramifiée (bPEI 0,6–25 KDa) sur la stabilité, la formation et l'internalisation des polyplexes a également été étudiée par le groupe de Wagner [328] (Figure 25). Il a été constaté que la complexation complète du siRNA est atteinte à des rapports N/P égaux ou supérieurs à cinq et qu'aucune différence significative dans l'affinité de liaison et la libération de siRNA n'a été observée en utilisant différentes masses molaires de bPEI. Inversement, la masse molaire du bPEI utilisée semble avoir un rôle important sur la

stabilité de ces polyplexes, selon des résultats obtenus du test de bromure d'éthidium et de DLS (Dynamic light scattering).

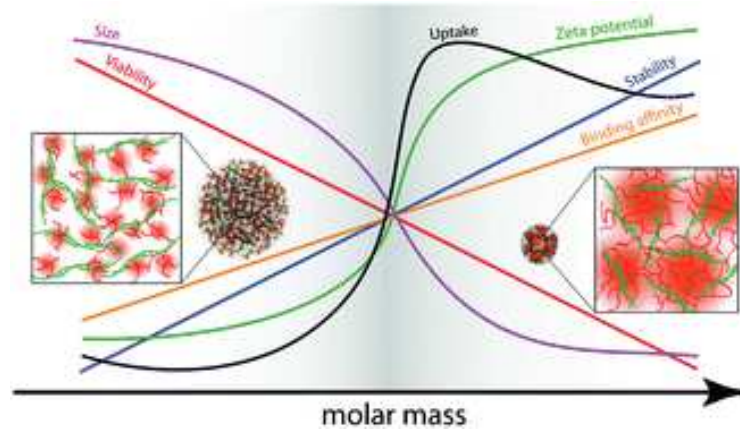


Figure 25 : L'influence de la masse molaire de B-PEI sur la stabilité, la formation et l'internalisation des polyplexes à base de siRNA [328].

Les PEI comme la jetPEI® sont considérées parmi les vecteurs non viraux les plus efficaces pour le transfert de gènes *in vivo*. En effet, une administration efficace du polyplexe de PEI/siRNA par voie rétro-orbitale et intra-thécale a été démontrée [329], [330]. En thérapie anticancéreuse, plusieurs études ont exploré l'application systémique des complexes PEI/siRNA. Il a été démontré que le polyplexe PEI/siRNA peut entraîner l'inhibition de la croissance tumorale des xénogreffes de souris traitées par voie sous-cutanée, intrapéritonéale ou intracérébrale [327], [331].

À cause de sa charge positive importante et de sa masse molaire élevée, plusieurs toxicités systémiques ont été associées aux PEI, y compris l'induction de l'inflammation, la nécrose du foie, l'activation de l'endothélium pulmonaire et l'adhésion des plaquettes agrégées [332]. Cependant, l'introduction de composés tels que le PEG sur la PEI formant des blocs de copolymères peut considérablement réduire cette toxicité et d'augmenter la solubilité des nano-plateformes [333].

La **poly(L-lysine) (PLL)** a été l'un des premiers polymères utilisés dans la délivrance d'acide nucléique. C'est un polypeptide synthétique ayant une bonne biocompatibilité et biodégradabilité adaptée à une utilisation *in vivo*. Elle possède une densité de charge élevée essentielle pour une complexation et une condensation efficaces du siRNA [334].

Divers PLL de poids moléculaires allant de 500 Da à plus de 100 kDa ont été commercialisées. Parmi elles, des PLL allant de 2,4 à ~30 kDa ont été exploitées pour la délivrance de siRNA [335].

La PLL de haut poids moléculaire provoque une toxicité relativement élevée en raison de ses interactions avec les protéines sériques, ce qui entrave considérablement son application systémique [334]. Ainsi, la synthèse du copolymère PLL-PEG permet d'augmenter sa durée de vie dans le sang. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence un transfert de gènes réussi en utilisant un copolymère PLL-PEG. Par exemple, l'injection du copolymère PLL-PEG de poids moléculaire élevé (MW = 28 000) sur des souris a montré une prolongation plus importante de la circulation du siRNA comparé au polymère PLL de poids moléculaire plus faible (MW = 7000) [336].

Cependant, la transfection basée sur les polymères PLL dans des applications *in vivo* a toujours été limitée en raison de leur efficacité relativement faible. Ceci est généralement connu à cause de leurs fuites endosomales insuffisantes. Une transfection réussie de siRNA par les PLL a été améliorée grâce à l'incorporation d'agents perturbateurs de membrane tels que la chloroquine, des peptides fusogènes ou des résidus d'histidine, ce qui aide à favoriser la livraison de siRNA dans le cytosol [337]. Néanmoins, l'efficacité globale de transfection à base de PLL n'est toujours pas comparable aux vecteurs de type PEI.

Les **dendrimères** représentent une seconde famille de polymère synthétique. Ce sont des polymères hyper-ramifiés hautement symétriques avec des structures arborescentes; leurs branches d'unités monomères divergent dans toutes les directions à partir d'un noyau central.

Une large gamme de dendrimères a été synthétisée à ce jour. Cependant, cinq classes cationiques (polyamidoamine (PAMAM), polypropylénimine (PPI), carbosilane (CBS), poly-L-lysine (PLL) et dendrimères de phosphore) ont été principalement utilisées pour la délivrance de siRNA et miRNA [338].

Les dendrimères PAMAM référencés sous le nom commercial de Starburst® sont des polymères sphéroïdaux. Semblables aux PEI, les structures de ces polymères présentent des densités élevées d'amines secondaires et tertiaires. Ces amines extérieures permettent la condensation efficace des acides nucléiques, en laissant les fonctions amines internes disponibles responsables d'un effet tampon au cours de l'acidification endolysosomal et une

sortie de l'endosome plus efficace. De plus, les dendrimères PAMAM sont relativement non immunogènes, réduisant ainsi les risques de sécurité des vecteurs non viraux dans la délivrance des gènes. En raison de ces propriétés, les dendrimères PAMAM sont des alternatives sûres et efficaces aux vecteurs géniques non viraux pour le traitement du cancer [339].

Les dendrimères fonctionnalisés ont démontré une capacité de transfection améliorée et une distribution ciblée dans les cellules et les tissus. Pour cela, Bae *et al.* ont montré que les dendrimères PAMAM greffés avec des résidus d'histidine et d'arginine amélioraient l'efficacité de transfection dans les cellules de gliome par rapport au PAMAM seul [340]. Ce résultat est probablement dû à l'augmentation de la capacité de l'éponge à proton fournie par les peptides, favorisant ainsi une fuite endosomale et une transfection génique améliorée. Dans un autre exemple, le groupe de Peng a décrit une approche très intéressante démontrant une double stratégie de ciblage pour la délivrance de siRNA en utilisant un dendrimère PAMAM greffé avec le peptide de ciblage RGDK. En effet, cette stratégie a permis d'augmenter l'efficacité de transfection des dendrimères PAMAM *in vivo* ; l'inhibition de gène était presque deux fois plus élevée en utilisant le système de délivrance ciblée par rapport à celui obtenu avec une délivrance non ciblée [341].

Cependant, il a été démontré que les PAMAM seuls sont très cytotoxiques, principalement liés au mécanisme d'apoptose médié par un dysfonctionnement mitochondrial. À contrario, les dendrimères PAMAM cationiques modifiés en surface présentent une très faible cytotoxicité, même à des concentrations élevées et pénètrent efficacement dans les cellules cancéreuses [128].

En outre des polymères synthétiques cités ci-dessus, les polymères naturels sont des candidats prometteurs pour la délivrance de siRNA. La **cyclodextrine** a été décrite pour la première fois en 1999 pour la vectorisation d'ADN plasmidique, puis a été optimisée pour la délivrance de siRNA. C'est un oligosaccharide cyclique hydrosoluble produit lors de la digestion bactérienne de la cellulose. Elle est utilisée dans les formulations pharmaceutiques en tant qu'excipient sous le nom de Rondel® [342].

Dans un modèle murin de sarcome d'Ewing, il a été démontré que la croissance tumorale a été considérablement inhibée après administration systémique de complexes formés de cyclodextrine, du ligand ciblant la transferrine et du siRNA spécifique du gène de fusion EWS – FLI1 (activateur transcriptionnel dans la tumorigenèse de la famille de tumeurs d'Ewing)

[343]. De plus, les nanoparticules à base de polymère de cyclodextrine ont été étudiées dans des essais cliniques pour la vectorisation de siRNA dans des applications anti-tumorales. Calando Pharmaceuticals a développé CALAA-01, premier vecteur de siRNA ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses. CALAA-01 est un complexe cyclodextrine/siRNA fonctionnalisé par du PEG comme agent stabilisant et de la transferrine comme agent de ciblage. Il a été conçu pour cibler la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase (R2) et inhiber la croissance tumorale [344]. Un essai clinique de phase I (NCT00689065) utilisant CALAA-01 dans une tumeur solide cancéreuse a été évalué. Cependant il a été interrompu suite à l'apparition de nombreux effets indésirables (cf. II.1.4.1. siRNA).

En plus des cyclodextrines, le **chitosane** est l'un des vecteurs polymériques d'origine naturelle le plus largement étudié. Il s'agit d'un polysaccharide cationique composé d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. En raison de leur propriété cationique, leur biodégradabilité et de leur faible cytotoxicité et immunogénicité, les chitosanes sont très connus pour la délivrance de siRNA [345], [346].

Il a été décrit que des complexes chitosanes/siRNA peuvent être utilisés pour inhiber l'expression du facteur VEGF afin d'empêcher l'angiogenèse du cancer. En effet, il a été montré une suppression de 40% du VEGF dans un modèle de mélanome de souris *in vitro* [347].

Cependant, malgré son profil intéressant, l'efficacité de transfection des systèmes d'administration à base de chitosane nu est inférieure à celle d'autres polymères cationiques tels que la PEI. En effet, une solubilité limitée et une faible capacité tampon au pH physiologique contribuent largement à cette faible efficacité. Pour y remédier, des composés tels que l'acide désoxycholique, l'acide stéarique ont été conjugués au chitosane pour améliorer l'interaction avec la surface cellulaire [334]. De plus, pour favoriser la fuite endosomale, de la PEI de faible poids moléculaire a été greffée au chitosane, et son efficacité de transfection a été supérieure à celle avec de la PEI seule (25 kDa) avec une cytotoxicité plus réduite [348]. Pour cela, le développement de vecteurs hybrides à base de chitosane pourrait surmonter les différentes barrières et apporter de nouvelles possibilités aux vecteurs non viraux. Par exemple, Kwon *et al.* ont préparé des nanoparticules de siRNA complexées avec du chitosane glycol thiolé et ont démontré son efficacité dans les tumeurs de xélogreffe PC-3. Les complexes formés ont montré une stabilité accrue lorsqu'ils sont confrontés à une compétition de polyanions ou à des nucléases et ont également une excellente activité anti-tumorale avec un taux d'inhibition tumorale de 75% à une dose de 1,5 mg/kg [349].

d. Les vecteurs auto-assemblés

Les vecteurs cationiques qui complexent les acides nucléiques comme le siRNA par des interactions non covalentes font partie des approches d'administration supramoléculaire. En effet, ce concept est devenu très populaire dans la délivrance de gènes. Cependant, ces vecteurs non dynamiques sont souvent incapables de libérer les oligonucléotides transportés après leur internalisation cellulaire, ce qui limite sérieusement l'efficacité de ces vecteurs. De plus, leur non-dégradabilité conduit à une accumulation dans les cellules et ainsi à des effets secondaires toxiques. Pour pallier à ce problème, des conceptions plus intelligentes sont nécessaires. Ces derniers devraient s'adapter à la présence de la cible et libérer les oligonucléotides de manière contrôlée avec une dégradation concomitante du vecteur en fragments plus petits, non toxiques qui peuvent être éliminés plus facilement.

- **Auto-assemblage supramoléculaire des vecteurs**

L'auto-assemblage de petites molécules par des liaisons non covalentes est un processus très répandu dans la nature. En effet, dans le domaine de la recherche, ce principe est couramment utilisé pour développer des nanostructures supramoléculaires qui sont adaptées à une variété d'applications, y compris la délivrance de médicaments et des gènes.

L'auto-assemblage supramoléculaire peut être réalisé via différentes interactions non covalentes, telles que les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques, les forces de van der Waals et les empilements π - π [350].

Les propriétés d'auto-assemblage assisté par l'ADN sont devenues des stratégies très prometteuses qui permettent l'auto-assemblage prédictif de structures hiérarchiques 2D ou 3D [351], [352]. En effet, la capacité de l'ADN pour induire et positionner précisément différents composants moléculaires peut être utilisée pour construire des systèmes de vectorisation efficace. Ces dernières années, différents systèmes (polymères, dendrimères, peptides, lipides et sucres) ont été étudiés comme des « building blocks » pour l'auto-assemblage supramoléculaire, produisant des agents thérapeutiques et vecteurs à l'échelle nanométrique [353], [354]. Le groupe de Smith a été le premier à montrer que l'auto-assemblage supramoléculaire de dendrimères augmenterait la complexation ainsi que l'efficacité de transfection de l'ADN (jusqu'à 60%). En effet, il a été constaté que ces dendrimères ont suivi un auto-assemblage, médié par des interactions hydrophobes, ce qui a conduit à la formation d'agrégats présentant une « valence induite » accrue à l'ADN [355]. Le groupe de Peng a également montré avec succès que l'auto-assemblage supramoléculaire

adaptatif à base de dendrimères amphiphiles dans de l'eau permet une complexation et une délivrance efficace de siRNA *in vivo* (plus de 50% d'inhibition de la protéine anti-apoptotique Hsp27 : heat shock protein), représentant ainsi un moyen novateur et polyvalent pour la vectorisation fonctionnelle d'oligonucléotides [356].

De ce fait, les nanostructures auto-assemblées par une approche supramoléculaires sont très précieuses pour les applications thérapeutiques. Leur taille, leur capacité d'encapsulation et leur caractère réversible sont des atouts majeurs pour la libération contrôlée de produits thérapeutiques. Cependant, le contrôle de relargage en réponse à un stimulus (pH, potentiel redox...) pour la libération de la drogue et la dissociation du complexe reste la plus grande limitation de cette approche.

- **Auto-assemblage covalent de vecteurs**

A l'inverse de la chimie supramoléculaire, la chimie dynamique covalente permet l'association programmée de composants par des réactions de chimio-sélectivité qui peuvent être compatibles avec la présence de biomolécules [357]. De plus, puisqu'elle est réalisée à l'aide de réactions réversibles, un système covalent dynamique peut également s'adapter aux changements physico-chimiques, ce qui peut être utile pour réaliser une adaptation structurelle du matériau auto-assemblé à la cible et/ou une délivrance active par dégradation vectorielle contrôlée. Plusieurs groupes dont le nôtre ont donc récemment mis en œuvre une approche vecteurs dynamiques covalents afin de générer des systèmes d'administration intelligents qui s'auto-assemblent, s'adaptent et se dégradent de manière contrôlée [358]. En effet, l'auto-assemblage de petites molécules en un système multivalent permet d'exprimer de multiples interactions qui vont être indispensables à une bonne complexation d'oligonucléotides mais également à une meilleure internalisation cellulaire. A l'inverse, le caractère dynamique de ces vecteurs synthétiques permet de déclencher le relargage contrôlé du cargo au sein de la cellule (Figure 26).

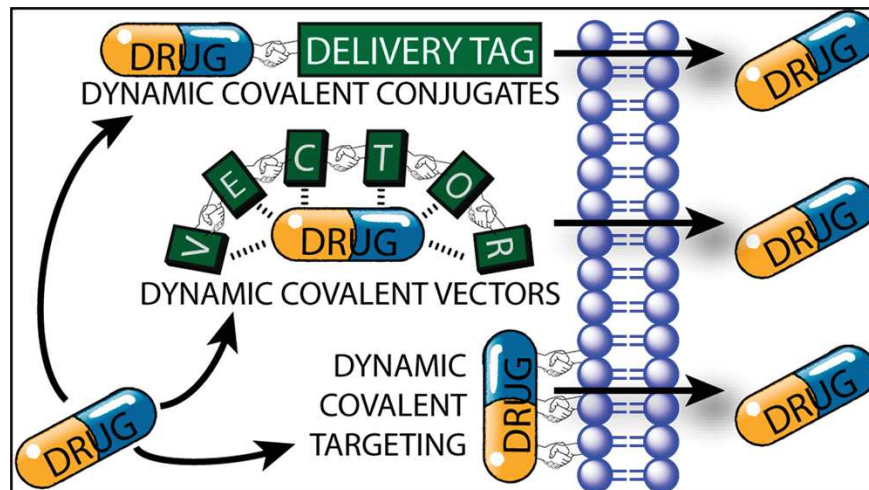


Figure 26: Stratégie du système dynamique covalent [358].

Un certain nombre de travaux récents se sont focalisés sur ce challenge de contrôle de la reconnaissance et de relargage des oligonucléotides avec des polymères covalents dynamiques, en utilisant principalement deux types de liaisons chimiques: les disulfures qui sont sensibles à l'oxydoréduction [359] et les acylhydrazones qui sont sensibles au pH [360]. Le groupe de Matile a développé des Cell-penetrating polyDisulfides qui s'auto-assemblent par polymérisation et se dégradent dans des conditions réductrices intracellulaires ou par réaction avec des thiols libres présents sur les membranes cellulaires [361]. En outre, Aida *et al.* ont travaillé sur des polydisulfures et ont démontré de manière intéressante le rôle template du siRNA sur le processus de polymérisation, donnant un vecteur qui est le mieux adapté à sa cible et capable de transférer le siRNA dans les tissus les plus profonds [362] (Figure 27).

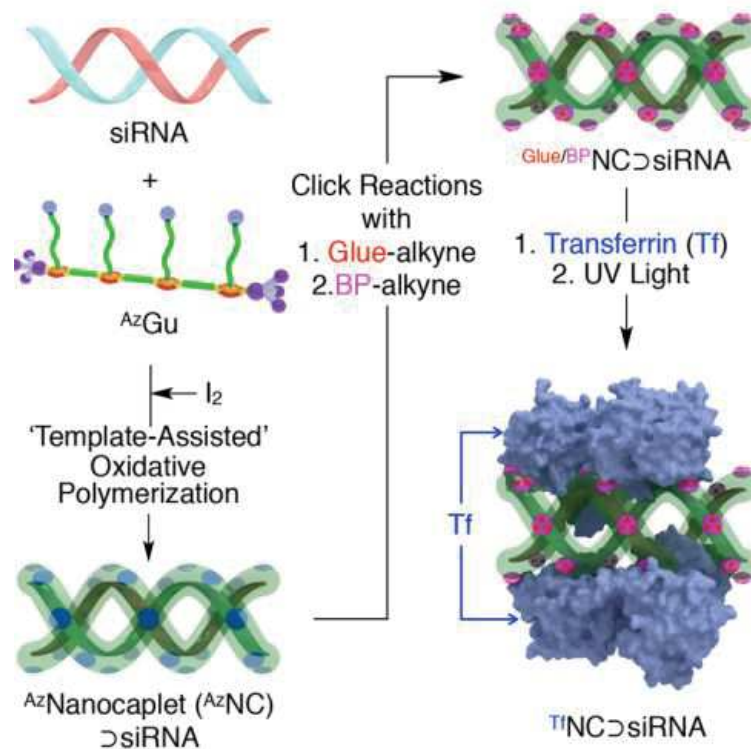


Figure 27 : Principe de polymérisation oxydative assistée par le siRNA : formation de Nanocaplets/siRNA associés à la transferrine. Adapté de la référence [362].

Les polymères covalents dynamiques à base de liaisons acylhydrazones sont particulièrement pertinents pour la délivrance de siRNA car l'hydrolyse des acylhydrazones se produit dans des conditions légèrement acides, à un pH comparable au pH des endosomes tardifs (pH 5,0– 5,5) [363]. Dans le contexte de la transfection génique, des lipides cationiques et des conjugués polymères qui incorporent une liaison acylhydrazone ont récemment été rapportés [364], [365]. Notre groupe avait précédemment développé des polymères covalents dynamiques linéaires (PDC) à base de poly-acylhydrazone pour la complexation de l'ADN et du siRNA [231], [366]. Ils ont ainsi conçu plusieurs générations de ce système et ont pu démontrer par diverses techniques que les PDC obtenus par auto-assemblage sont dégradables et pH-sensibles et qu'ils complexent et délivrent efficacement des oligonucléotides tels que le siRNA. Cette partie sera discutée plus en détail dans la partie résultats, chapitre III.

IV) Ciblage thérapeutique du cancer

Comme cité précédemment, l'arsenal thérapeutique actuel basé sur la chimiothérapie et la radiothérapie génère de nombreux effets secondaires puisqu'il ne discrimine pas le tissu tumoral du tissu sain. Pour cela, l'objectif des thérapies à venir est d'avoir un effet plus ciblé et plus spécifique des tumeurs, afin de limiter les effets toxiques et ainsi améliorer l'efficacité thérapeutique.

On peut distinguer deux grandes stratégies de ciblage : i) la vectorisation passive dans le microenvironnement tumoral, ii) le ciblage actif par des motifs et ligands de ciblage des tissus tumoraux.

1. Ciblage passif

Le principe du ciblage passif des tissus tumoraux par les vecteurs est essentiellement basé sur les différentes tailles de pores entre les cellules endothéliales de la micro-vascularisation tumorale par rapport aux structures « plus serrées » trouvées dans les capillaires normaux. Par conséquent, si l'on prépare des vecteurs d'une taille qui leur permet de s'extravaser dans les tissus tumoraux tout en les interdisant de sortir des capillaires dans les tissus normaux, un objectif de ciblage idéal serait atteint [367].

Le processus d'angiogenèse tumoral est chaotique. Afin de permettre leur croissance rapide et amplifiée, les tumeurs ont besoin d'un apport plus élevé en oxygène et en nutriments. Pour cela, les cellules cancéreuses stimulent le phénomène d'angiogenèse grâce à la sécrétion du facteur VEGF par les cellules du TME permettant ainsi une activation des cellules endothéliales. De ce fait, de nouveaux vaisseaux sanguins sont néoformés très rapidement. Ils se caractérisent par une structure irrégulière ainsi que des fenestrations allant de 400 à 600 nm de large [368].

Cette structure anormale des vaisseaux ainsi que la déficience du système lymphatique dans les tissus tumoraux engendrent une accumulation importante des composés plasmatiques, tels que les macromolécules et les nanoparticules dans la tumeur. C'est ce qu'on appelle l'effet **EPR (Enhanced Permeability and Retention)** [369] (Figure 28).

Le phénomène EPR a été décrit pour la première fois par Maeda *et al* en 1986, il constitue la base du ciblage passif pour de nombreuses nanoparticules vers les tumeurs solides.

Cependant, ces nanoparticules devraient être stables, furtives et présentant un temps de demi-vie assez long pour s'accumuler suffisamment dans les tumeurs. Il nécessite aussi que les composés aient une taille appropriée qui ne dépasse pas la taille de pores des vaisseaux perméabilisés. Dans ce cas, la taille optimale des nanoparticules n'est pas clairement définie car elle varie selon le type de tumeur solide, elle doit être généralement comprise entre 50 et 300 nm [370].

Plusieurs nanoparticules encapsulant des médicaments ont été approuvées dans le marché. Abraxane® (Paclitaxel lié à l'albumine) est un exemple typique de système d'administration de médicaments qui s'accumulent dans les tumeurs via l'effet EPR [371]. Cependant, plusieurs études ont montré que l'application du ciblage passif seul n'est pas suffisante, car il existe une grande hétérogénéité entre les tumeurs mais aussi entre les patients [372].

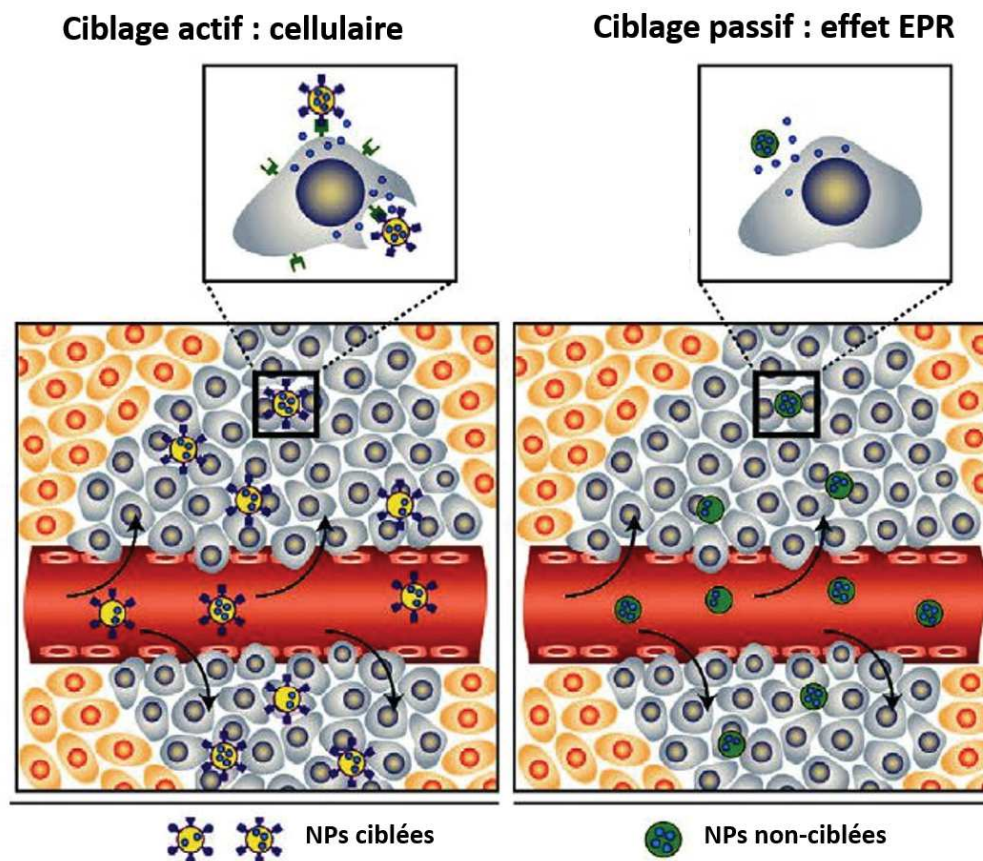


Figure 28 : Ciblage actif et passif par les nanoparticules. Adapté de la référence [373].

Diverses stratégies ont été appliquées afin d'améliorer l'effet EPR. L'idée était de traiter la tumeur avant l'injection de nanoparticules par des enzymes telles que la collagénase ou la hyaluronidase [374] ainsi que des agents anti-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) [375], qui dégraderaient les barrières stromales ou qui augmenteraient la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cependant, des métastases fréquentes ont été observées suite à ces traitements [376].

2. Ciblage actif

Comme mentionnée ci-dessus, le ciblage passif par l'effet EPR est très limité pour les thérapies anti-cancéreuses. Beaucoup de travaux dont les nôtres se sont retournés vers une stratégie de ciblage plus spécifique. Celle-ci vient en complément au ciblage par EPR afin d'en améliorer l'efficacité thérapeutique. On parle ici du **ciblage actif**.

Le ciblage actif se base sur l'utilisation d'une interaction entre le ligand et son récepteur spécifique (Figure 28). On sait bien qu'à cause de leur besoin de croissance continu, les cellules cancéreuses sur-expriment un certain nombre de récepteurs par rapport aux cellules saines. Ainsi, cette caractéristique a été exploitée en utilisant des nanoparticules conjuguées à leurs surfaces à des ligands ciblant les récepteurs surexprimés. En effet, le ciblage actif peut servir à orienter les nanoparticules vers les cellules cancéreuses tout en évitant les cellules saines, améliorer la concentration locale en agents cytotoxiques, et permettre ou favoriser leur internalisation cellulaire.

Les ligands de ciblage les plus courants sont classés en deux catégories: i) les macromolécules telles que les polypeptides fonctionnels, les anticorps et la transferrine, ii) les petites molécules telles que le folate, les glucides, les petits peptides (par exemple, Arg-Gly-Asp (RGD)) et d'autres molécules ciblées (par exemple, les aptamères et hormone) [227].

Les premiers travaux sur les nanoparticules fonctionnalisées par des ligands avaient commencé en 1975, quand le groupe de Gregoriadis a développé des liposomes portant des anticorps et qui a ainsi décrit l'internalisation *via* une endocytose récepteur dépendante [377]. A l'heure actuelle, seulement quelques nanovecteurs basés sur le ciblage actif sont approuvés sur le marché. Les plus courants sont les anticorps comme par exemple Trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal qui cible spécifiquement le récepteur HER2, retrouvé surexprimé dans les cellules du cancer du sein. (cf. I. 5.4. Les thérapies ciblées).

Dans le cas de la thérapie génique anticancéreuse et afin d'exploiter tout le potentiel thérapeutique du siRNA, il est nécessaire d'augmenter l'efficacité de transfection du siRNA et d'améliorer sa sélectivité envers la cellule cible. L'administration ciblée de siRNA est une excellente approche car elle augmenterait la concentration du siRNA au niveau du tissu souhaité et réduirait ainsi la quantité à injecter. À ce jour, on retrouve seulement le Givosiran, un conjugué GaINac/siRNA qui permet de cibler les cellules hépatiques via le récepteur ASGPR et qui est approuvé par la FDA. (cf. II. 2.2.2.1. Les conjugués du siRNA).

Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux progrès de la délivrance de siRNA à l'aide de vecteurs fonctionnalisés par des ligands de ciblage. Les ligands les plus utilisés et leurs récepteurs correspondants ainsi qu'un tableau regroupant plus d'exemples (Tableau 7) sont présentés ci-dessous.

2.1. Les carbohydrates

Les structures glucidiques contribuent à de nombreux processus biologiques de reconnaissance, y compris l'adhésion cellulaire et la reconnaissance des anticorps et des toxines [378]. Pour cela, le glucose ainsi que les monomères apparentés sont déposés de manière irrégulière à la surface des cellules néoplasiques, ce qui conduit à une surexpression de divers récepteurs de type **lectine** se liant à la surface. Ces récepteurs ont une très haute affinité pour les glucides et pourraient reconnaître et se lier aux résidus glucidiques terminaux des vecteurs pour la délivrance ciblée de gènes.

En effet, la glycosylation est une stratégie très prometteuse dans le domaine de la délivrance de gènes. Plusieurs groupes ont exploité ce système en utilisant des ligands à base d'hydrates de carbone, tels que le mannose [379], le galactose, le lactose et le fructose [227].

2.1.1. Les récepteurs au mannose

Le récepteur au mannose appartient à la classe de lectines de type C de surface cellulaire, qui s'exprime abondamment dans les cellules du foie, de la rate, dans les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques [380] et également surexprimé à la surface de nombreuses cellules tumorales malignes [381]. Le récepteur au mannose peut reconnaître les glucides complexes qui sont attachés aux glycolipides ou aux glycoprotéines. Il est impliqué dans diverses actions telles que l'adhésion, la signalisation, la clairance des glycoprotéines et la reconnaissance des pathogènes [382].

Structurellement, le récepteur au mannose se compose d'une région intracellulaire qui assure l'internalisation et le recyclage des récepteurs, une région transmembranaire et une région extracellulaire. La région extracellulaire contient un domaine N-terminal riche en cystéines, suivi d'un domaine de fibronectine II, et huit domaines de reconnaissance des glucides qui sont responsables de la liaison des glucides de manière dépendante du calcium [383] (Figure 29).

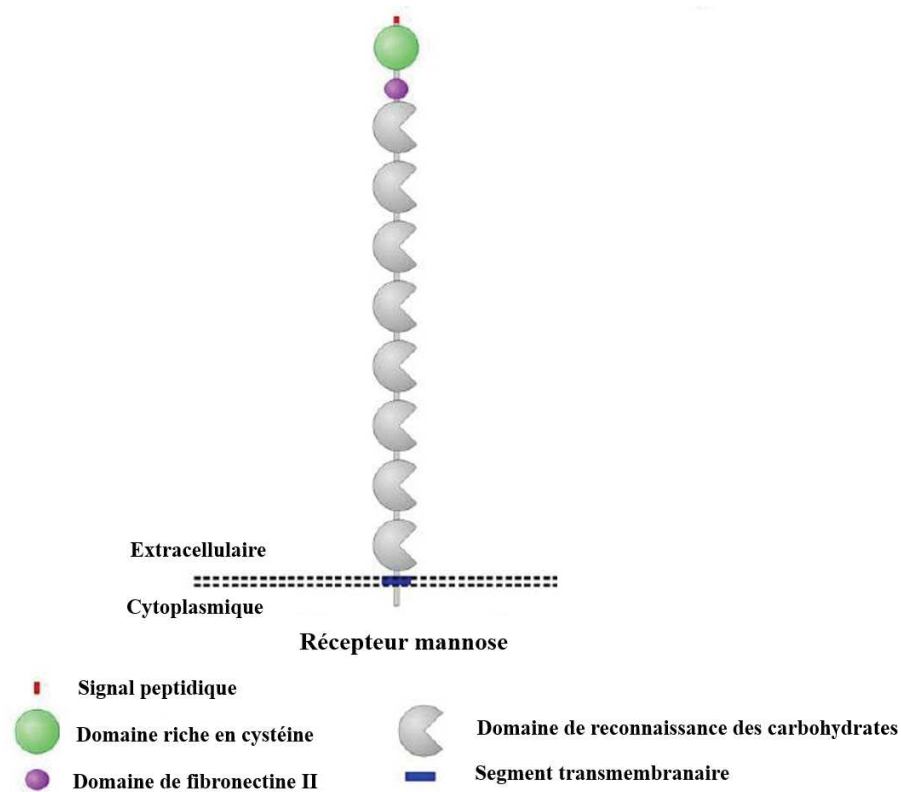


Figure 29: Structure du récepteur mannose. Adapté de la référence [384].

Le récepteur mannose est devenu le récepteur modèle pour le ciblage et a été largement étudié pendant de nombreuses années [385]. En effet, Kim *et al.* ont conçu et synthétisé un système de délivrance de siRNA composé de PEI, PEG et mannose. Ils ont ainsi observé une internalisation accrue du polyplexe sur des macrophages RAW264.7 en comparaison à un contrôle [386]. De plus, Ganbold *et al.* ont développé des nanoparticules à base de dérivés de curdlane pour délivrer des siRNA dirigés contre le facteur TNF α des macrophages. Le dérivé de curdlane comprend des amines primaires, des fractions de mannose et des groupes

d'imidazole, qui sont responsables du ciblage du récepteur mannose et de la libération du siRNA. Une réduction significative du taux de TNF α des macrophages primaires a été démontrée à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau de la protéine, ce qui est avantageux pour le traitement de différentes maladies inflammatoires [387].

Récemment, des nanoparticules mannosylées ont été développées pour augmenter l'accumulation de médicament spécifiquement dans des cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur mannose. Par exemple, Li *et al.* ont développé des nano-composites LDH conjuguées au mannose (Man-SiO₂@LDH) et ont démontré l'amélioration de la délivrance de siRNA fonctionnel par Man-SiO₂@LDH pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses par rapport aux nanoparticules LDH [388].

Notre groupe avait précédemment démontré un grand intérêt pour le ciblage du récepteur mannose sur les cellules du cancer colorectal (HCT-116). En effet, notre équipe a montré une internalisation 2 à 5 fois plus élevée de nanoparticules mannosylées (MSN-FITC-mannose) dans les cellules HCT-116 par rapport à celle des cellules MCF-7, des cellules MDA-MB-231 et des fibroblastes normaux dans le but d'induire de la thérapie photo-dynamique [381].

2.1.2. Les récepteurs à l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH), également appelé hyaluronane, est un polysaccharide linéaire formé par des unités d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine et est un constituant majeur de la matrice extracellulaire. Il joue différents rôles biologiques dans les organismes vivants. Il est impliqué dans la croissance et la migration des cellules, le développement embryonnaire, le traitement des lésions tissulaires et la régulation de l'inflammation [389].

De plus, AH régule l'angiogenèse dans de nombreux types de tumeurs en interaction avec ses récepteurs tels que CD44 et RHAMM (ou CD168) qui sont abondamment présents dans les cellules tumorales [390]. Le récepteur CD44 est une glycoprotéine transmembranaire également appelée glycoprotéine de type P. Il a été identifié à l'origine comme un récepteur de l'acide hyaluronique et plus tard à plusieurs autres ligands, notamment l'ostéopontine, les collagènes et les métallo-protéinases matricielles [391].

D'un point de vue de délivrance de molécules thérapeutiques, le récepteur CD44 a fait l'objet d'une attention particulière, en raison de sa surexpression anormale dans un grand

nombre de tumeurs solides y compris le cancer du sein, de l'ovaire, du côlon, du poumon et de l'estomac [392]. Ainsi, il constitue un des marqueurs tumoraux nécessaires pour le ciblage actif.

En effet, les cancers sur-exprimant CD44 sont des cibles intéressantes pour la délivrance sélective de siRNA à l'aide de nanovecteurs à base d'acide hyaluronique. Une accumulation spécifique de siRNA fluorescent encapsulé dans des nanoparticules fonctionnalisées par de l'AH a été observée dans le site de la tumeur après 24 h. De plus, lorsque les souris ont été pré-administrées avec une dose d'AH libre pour saturer les récepteurs CD44, le signal de fluorescence dans la tumeur s'est réduit de manière significative par rapport à celui des récepteurs insaturés. Ce résultat démontre le rôle d'AH dans le ciblage actif par l'intermédiaire des récepteurs CD44 [393].

Le groupe de Glackin a développé des nanoparticules mésoporeuses (MSN) greffées avec l'AH en tant que vecteur ciblé du siRNA dirigé contre la protéine TWIST (liée à l'angiogenèse et aux métastases des tumeurs) des cellules cancéreuses de l'ovaire sur-exprimant le récepteur CD44. Les résultats *in vivo* montrent que les MSN modifiés à l'acide hyaluronique améliorent considérablement l'absorption et le ciblage du siRNA-TWIST dans les cellules cancéreuses. De plus, l'association du cisplatine avec ces complexes (MSN-AH-siRNA-TWIST) a permis de réduire la taille des tumeurs *in vivo* jusqu'à 75% par rapport au traitement avec cisplatine seul [394].

2.2. Les peptides

L'utilisation de peptides comme ligands de ciblage offre de nombreux avantages. En effet, ils sont facilement synthétisés et caractérisés, peuvent pénétrer par translocation directe et ont une taille plus petite que celle des anticorps et donc faiblement immunogènes. De plus, ce sont des molécules très spécifiques et capables de cibler la délivrance de complexes *in vitro* et *in vivo* [395]

Dans le ciblage tumoral, il existe un très grand nombre de ligands peptidiques, nous décrirons dans ce manuscrit deux ligands peptidiques : la séquence cyclique **RGD** ciblant les récepteurs intégrines du système de néo-angiogenèse du TME et la séquence **laminine** ciblant les récepteurs laminine des cellules tumorales.

2.2.1. Les récepteurs intégrines et le ligand RGD

Le peptide RGD est un ligand utilisé dans la délivrance ciblée de siRNA et qui a été également exploité sous dans l'imagerie moléculaire non invasive [396]. Il se lie sélectivement aux récepteurs d'intégrine de type $\alpha\beta3$, surexprimés dans de nombreuses cellules endothéliales du système vasculaire tumoral [397]. La séquence RGD est un tripeptide composé de L-arginine, de glycine et d'acide aspartique, qui est présente dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire.

Les intégrines sont une famille de protéines transmembranaires constituées d'un hétérodimère formé des sous-unités α et β . Ce sont des récepteurs de diverses protéines de la matrice extracellulaire, notamment, la fibronectine, le fibrinogène et la laminine. Les récepteurs intégrines contrôlent les interactions extracellulaires et régulent les processus biologiques clés, tels que la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose. Comme citée précédemment, l'intégrine $\alpha\beta3$ est surexprimée à la surface de plusieurs cellules tumorales endothéliales, notamment dans les ostéosarcomes, les neuroblastomes, les glioblastomes, les mélanomes, les carcinomes pulmonaires et le cancer du sein [398].

Le système de ciblage RGD-intégrines est l'une des stratégies les plus couramment utilisées pour cibler la délivrance de molécules actives. De plus, plusieurs études ont montré que la cyclisation du tripeptide permet non seulement d'augmenter la résistance aux dégradations chimiques, mais aussi d'améliorer l'activité biologique du ligand. Oba *et al.* ont greffé le peptide c-RGD sur des blocks de polymères PEG-PLL pour la délivrance du siRNA. Les résultats de cette étude ont montré que les ligands cRGD facilitaient l'endocytose des polyplexes et amélioreraient l'efficacité de la transfection [399].

Dans un autre exemple, le groupe de Ji avait préparé des conjugués c-RGD/siRNA anti-VEGFR2 et a montré que ce conjugué peut pénétrer sélectivement dans les cellules HUVEC et inhiber l'expression des gènes ciblés à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'administration systémique du conjugué cRGD/siRNA a entraîné une inhibition d'expression de l'ARNm correspondant (de 45% à 55%) et de la protéine correspondante (de 45% à 65%) avec une réduction impressionnante du volume global de la tumeur (de 70 à 90%) [400].

2.2.2. Les récepteurs non-intégrines et le ligand laminine

Le passage des cellules malignes à travers les membranes basales est une étape cruciale dans l'invasion des carcinomes agressifs. Elle comprend une succession d'interactions incluant la fixation, la dégradation et la migration des cellules cancéreuses. Plusieurs éléments sont impliqués dans ce processus, notamment divers récepteurs de laminine de surface cellulaire. Parmi ceux-ci, l'expression du récepteur de laminine à haute affinité **67 kDa (67LR)** est augmentée dans différents types de cellules cancéreuses hautement métastatiques [401]. En effet, cette surexpression est considérée comme un marqueur moléculaire de l'agressivité métastatique de nombreux tissus tumoraux, y compris le sein, le poumon, l'ovaire, la prostate, l'estomac et la thyroïde [402].

Le précurseur du récepteur de la laminine 37/67 kDa / récepteur de la laminine (LRP/LR; également connu sous le nom de LamR1, RPSA, p40 et MGr1-Ag / 37LRP) est un récepteur de surface cellulaire de type non-intégrine. On pense que le LRP de 37 kDa donne naissance au LR de haute affinité de 67 kDa, grâce à un processus qui n'a pas été complètement élucidé à ce jour. En résumé, LRP/LR est un récepteur transmembranaire de type II composé de 295 acides aminés. Le récepteur est divisé en trois domaines, un domaine N-terminal intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal extracellulaire. L'extrémité C-terminale présente des sites de liaison pour un éventail de substrats, tels que la PrPc (Cellular prion protein), la laminine-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), l'héparine sulfate et les IgG [403] (Figure 30).

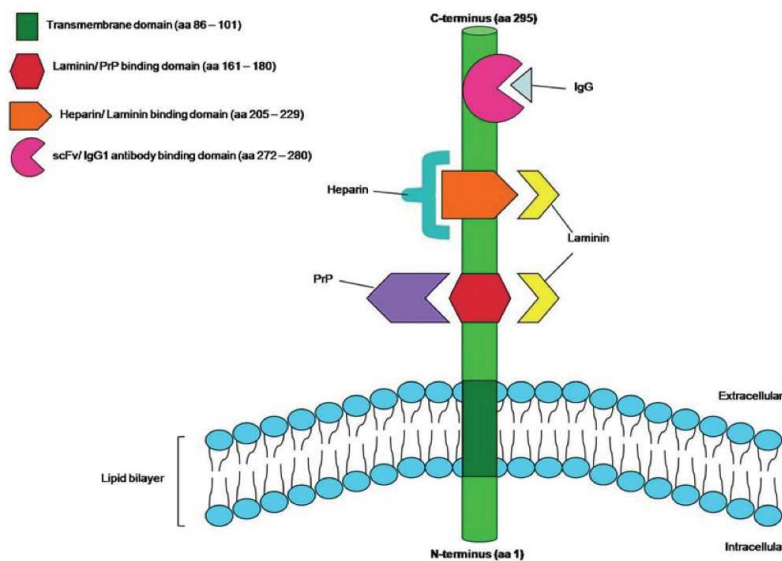


Figure 30: Schéma représentatif du récepteur laminine 37/67 kDa [404]

Compte tenu de ces caractéristiques tumorales, plusieurs études se sont focalisées sur l'interaction LR/Laminine. Ainsi, il a été démontré que l'inhibition spécifique des interactions LR avec la laminine pouvait bloquer la progression du cancer [405]. En effet, le pentapeptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), dérivé de la chaîne laminine $\beta 1$, a été identifié comme un ligand pour le récepteur laminine [406]. Le peptide YIGSR a montré un effet inhibiteur sur la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines ainsi qu'une activité anti-métastatique *in vivo* [407]. Ces propriétés biologiques font du peptide YIGSR un ligand attractif pour cibler les cellules tumorales.

Dans la stratégie de la thérapie génique anticancéreuse, le peptide (YIGSR) a été greffé sur le vecteur Tat pour la délivrance ciblée de l'ADN. En effet, cette étude a montré un effet de ciblage ainsi qu'une amélioration considérable de l'efficacité de transfection des vecteurs peptidiques [408].

2.3. L'acide Folique (Vitamine B9)

Au cours des deux dernières décennies, l'acide folique s'est montré très prometteur en tant que ligand de ciblage actif pour un certain nombre d'applications *in vivo*.

L'acide folique (Figure 31) (folate ou vitamine B9) hydrosoluble est un nutriment essentiel pour le métabolisme cellulaire et la synthèse des nucléotides dans toutes les cellules vivantes. Ainsi, les cellules tumorales à division rapide, ont un besoin accru en vitamines. De ce fait, il a été démontré que les récepteurs des folates (notamment l'isoforme FR- α) sont surexprimés dans de nombreuses cellules cancéreuses, y compris les cancers de l'ovaire, du rein, de l'utérus, des testicules, du cerveau et du côlon [227], mais très faiblement exprimés par les cellules saines puisque la plupart des cellules normales obtiennent leurs besoins en folate *via* un transporteur de folate à faible affinité ou un transporteur de folate couplé à un proton [409].

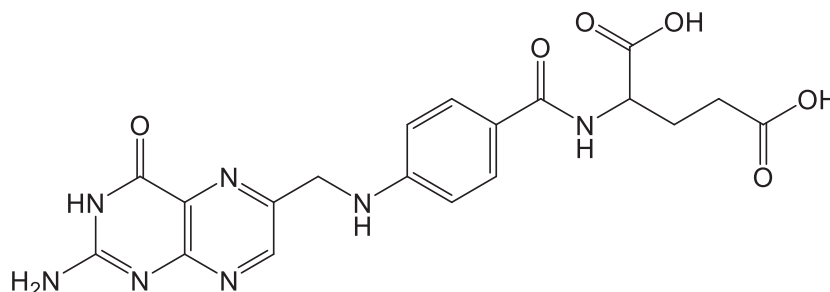


Figure 31: Structure chimique de l'acide folique.

En raison de la facilité de conjugaison de l'acide folique aux vecteurs, de sa forte affinité aux récepteurs folate ($K_d 10^{-10}$ M) et de sa petite taille (PM 441 Da), de nombreuses études ont été consacrées à la délivrance de gènes ciblant le récepteur folate [410]. Des vecteurs à base de liposomes cationiques ont été étudiés pour améliorer le ciblage des tumeurs *via* les récepteurs folates. Hattori *et al.* ont décrit l'effet du ciblage des liposomes cationiques contenant du siRNA et modifiés par du folate et du PEG sur l'efficacité d'extinction de gène dans les cellules tumorales de type KB (carcinome du nasopharynx). En effet, une forte suppression de l'activité luciférase a été observé *in vitro* (inhibition > 80%, par rapport au siRNA seul) [411]. Le groupe de Midoux a également montré l'efficacité du ciblage *via* le récepteur folate en utilisant des lipopolyplexes (Complexes ternaires formés entre un acide nucléique, un polycation et des liposomes) fonctionnalisés avec du PEG et d'acide folique. Effectivement, les lipopolyplexes ciblés ont montré une internalisation plus élevée que les lipopolyplexes non ciblés et une meilleure inhibition spécifique (54% et 32%, respectivement) de l'expression de la luciférase dans les cellules du cancer du sein murin Luc-4T1 [412].

En plus des liposomes cationiques, des polymères couplés aux folates ont été largement utilisés pour une délivrance ciblée de siRNA. Le groupe de Shuai avait greffé du folate sur la surface des nanoparticules cationiques PEI-PCL pré-chargées de siRNA/Bcl-2 et de Doxorubicine afin de cibler et traiter les cellules cancéreuses hépatiques. En comparaison avec le contrôle non ciblé, une augmentation au niveau de l'efficacité de la délivrance ainsi qu'une amélioration de l'efficacité de la double thérapie a été observée avec les nanoparticules greffées avec folates [413].

Comme mentionné dans cette section, l'acide folique et son récepteur sont devenus une stratégie très prometteuse de ligand/récepteur pour la délivrance ciblée de siRNA. La conjugaison du folate avec divers vecteurs montre une efficacité et une sélectivité de transfection élevées *in vitro* et *in vivo*.

2.4. La transferrine

L'homéostasie du fer dans le corps est un facteur important dans plusieurs processus biochimiques dont la régulation se fait *via* la transferrine. La transferrine humaine est une protéine de liaison au fer constituée de 679 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 80 kDa. Elle permet le transport du fer dans les cellules exprimant le récepteur transferrine (TfR1 et TfR2) [414].

Les TfR1 (aussi connu par CD71) sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont surexprimés dans 90% des tumeurs comprenant le cancer du sein, le gliome, l'adénocarcinome pulmonaire, la leucémie lymphoïde chronique et lymphome non hodgkinien [415]. En effet, l'augmentation des besoins en fer dans les tissus tumoraux entraîne une expression 10 fois plus élevée des TfR dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales [416]. De plus, il a été rapporté que le niveau d'expression de TfR1 est en corrélation avec le stade et la progression de la tumeur [415]. Ainsi, tous ces critères font du récepteur transferrine un marqueur cancéreux prometteur qui fournit un moyen de cibler les cellules avec des médicaments anticancéreux. Pour cela, plusieurs ligands permettent le ciblage de ce récepteur notamment par l'utilisation de la transferrine, d'anticorps anti-TfR, des fragments d'anticorps ou des peptides reconnaissant les TfR.

En raison des caractéristiques biodégradables et non toxiques de la transferrine, le ciblage du TfR par l'utilisation de ce ligand a été largement utilisé à des fins de thérapie génique anticancéreuse. Par exemple, le groupe de Triche [343] a préparé des complexes de siRNA et de polymères de cyclodextrine cationique, puis a inséré la transferrine pour cibler les cellules tumorales du sarcome d'Ewing surexprimant le TfR. Après injection du complexe à une dose de 2,5 mg / kg de siRNA, une inhibition spécifique de la séquence de l'EWS-FL 11 ainsi qu'un blocage de la croissance tumorale ont été observés chez les souris, démontrant l'efficacité thérapeutique de cette stratégie de ciblage (cf. III 2.2.2.2. Les complexes du siRNA).

Mendonça *et al.* ont montré une encapsulation efficace du siRNA (dirigé contre l'oncogène BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region- Abelson)) dans des liposomes ciblés par la transferrine. Les résultats de cette étude indiquent clairement que l'internalisation cellulaire des liposomes ciblés se produit par endocytose médiée par le récepteur transferrine. De plus, il a été démontré que la formulation ciblée permettait d'obtenir un effet d'inhibition génique important. En effet, une corrélation entre la réduction des niveaux d'expression d'ARNm BCR-ABL et la diminution de la protéine BCR-ABL correspondante ont été observées [417]. Enfin, ces résultats illustrent l'importance du ciblage actif cellulaire pour le traitement du cancer.

2.5. Récapitulatif des agents de ciblage pour la vectorisation de siRNA

Nous avons étudié dans la précédente section une série de ligands de ciblage avec leurs récepteurs correspondants, le tableau suivant décrit d'autres exemples de ligands et de récepteurs utilisés pour la délivrance ciblée du siRNA dans le traitement du cancer.

Récepteurs	Ligands de ciblage	Exemple de système de délivrance de siRNA	Type de cancer	Références
Neuropilin-1	Peptide RGDK	siRNA/dendrimères/E ₁₆ G ₆ RGDK	Cancer de prostate	[418]
ASGPR	Lactose	siRNA/PLL/Lactose-PEG	Hépatocarcinome	[419]
	Galactose et analogues	siRNA/ β -d-galactoside/Lipides- Nanoparticules	Hépatocarcinome	[420]
EGFR	Anticorps EGFR	siRNA/Liposome/ab-EGFR	Cancer du sein	[421]
HER2	Anticorps	siRNA/bionanocapsule/ab-HER2	Cancer du sein	[422]

Tableau 7 : Liste non exhaustive des différents systèmes de ciblage actif pour la vectorisation du siRNA.

En conclusion de cette partie, on constate que dans diverses thérapies notamment les thérapies anticancéreuses, les vecteurs ciblés commencent à faire leur apparition dans des études précliniques très prometteuses. Ce qui a permis de poser les bases d'une nouvelle génération de traitements. En effet, de nombreuses recherches ont été effectuées sur les thérapies ciblées de siRNA avec de petits ligands de ciblage. Ainsi, cette thérapie « novatrice » pourrait offrir un potentiel énorme pour la transition des thérapies ciblées des laboratoires de recherche vers la clinique.

Partie II : Description des travaux et résultats

Chapitre I : Fonctionnalisation de CPP pour la vectorisation ciblée du siRNA

Cette première partie est consacrée à l'étude d'un CPP fonctionnalisé pour la thérapie génique dont le travail a abouti à une publication scientifique dans laquelle je suis premier auteur [423]. Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe de la plateforme *Zebrafish* dirigée par le Dr. Mireille Rossel du laboratoire « Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives ».

1. Contexte et objectif

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé sur des CPP obtenus par synthèse peptidique sur support solide (SPPS) par la plateforme peptidique SynBio 3, au sein de notre institut (IBMM, Montpellier) afin de les utiliser comme des nano-vecteurs pour la délivrance du siRNA dans des cellules cancéreuses. En effet, les CPP sont connus pour leur capacité à encapsuler et à délivrer dans les cellules des agents thérapeutiques associés de façon covalente ou non covalente [297]. Dans le cas de la délivrance de siRNA, les stratégies non covalentes semblent plus appropriées car les systèmes conjugués ont montré des bioactivités restreintes [303].

Notre stratégie non covalente est basée sur l'utilisation du CPP amphipathique nommé CADY qui a été démontré comme un vecteur efficace pour la délivrance du siRNA [311]. Il peut former des complexes stables *via* des interactions électrostatiques avec un siRNA thérapeutique, le délivrer efficacement dans des lignées cellulaires et empêcher la croissance tumorale [310] mais aucune stratégie de ciblage n'a été exploré *in vivo*. En effet, le manque de ciblage spécifique sur les CPP peut entraîner de grandes pertes dans la circulation et par conséquent une très faible accumulation dans les cellules cibles.

2. Aperçu des principaux résultats

Le manque de spécificité cellulaire reste le principal inconvénient du développement clinique des CPP. Afin d'améliorer ces caractéristiques, nous avons fonctionnalisé le peptide CADY en greffant une séquence qui permet de cibler préférentiellement les cellules cancéreuses et d'augmenter ainsi l'efficacité thérapeutique. L'objectif était de cibler un récepteur qui est surexprimé dans les cellules cancéreuses. Parmi plusieurs cibles tumorales, le récepteur de la laminine (LR 37/67 kDa) constitue un marqueur tumoral attractif. Des études antérieures ont montré la surexpression de ce récepteur à la surface d'une grande variété de cellules tumorales humaines par rapport aux cellules normales [402].

Dans un premier temps et afin de confirmer les résultats décrits dans la littérature, j'ai étudié le profil d'expression du LR 37/67 kDa dans différentes lignées cancéreuses par la méthode In-Cell ELISA et j'ai montré que les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 expriment un niveau très élevé du récepteur LR 37/67 kDa. Cette expression a été comparée à une lignée cellulaire saine (fibroblastes). En effet, la quantification du niveau du LR 37/67 kDa indique un niveau d'expression deux fois plus élevé que dans les cellules saines (Figure S1 de l'article).

Dans cette étude, le peptide YIGSR dérivé de la chaîne laminine $\beta 1$ a été greffé pour la première fois au peptide amphipathique secondaire CADY afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. En effet, ce peptide YIGSR a été identifié comme un ligand spécifique du récepteur laminine [406]. Ainsi, le CPP ciblant qui en résulte nommé Y-CADY a été comparé à son analogue CADY non ciblant en explorant sa capacité à encapsuler le siRNA ainsi que son efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo*. Nous avons premièrement montré que le greffage du peptide de ciblage (YIGSR) provenant de la laminine n'affecte pas les propriétés physico-chimiques du CPP CADY. En effet, la structure α -hélicoïdale et la capacité d'encapsulation de CADY ne sont pas modifiées par le greffage de la séquence de ciblage. De même, la taille ainsi que la charge des complexes CPP/siRNA obtenus avec les deux peptides sont similaires (Figure 2 et tableau 1 et 2 de l'article).

Les expériences de microscopie confocale démontrent que les deux CPP sont capables de délivrer efficacement le siRNA dans le cytoplasme après 4 h d'incubation. Dans un même temps, l'activité d'inhibition de la GFP exprimée dans les cellules cancéreuses par les deux complexes CADY/siGFP-cy5 et Y-CADY/ siGFP-cy5 ont été comparées. En effet, il existe une nette corrélation entre l'internalisation du siRNA et l'inhibition génique puisque nous avons

observé une inhibition de l'expression de la GFP par l'extinction de sa fluorescence. Afin de confirmer ce résultat, j'ai quantifié par cytométrie en flux l'extinction de la fluorescence GFP après transfection des cellules par les deux complexes. L'étendue de l'extinction de la fluorescence de la GFP était plus importante avec Y-CADY/siGFP (66%) qu'avec CADY/siGFP (52%) montrant une meilleure efficacité du nouveau vecteur Y-CADY pour délivrer le siGFP-cy5 et inhiber l'expression de la GFP *in vitro* (Figure 3 de l'article). De plus, nous avons étudié l'efficacité de Y-CADY en comparaison avec CADY pour inhiber l'activité luciférase dans la lignée cellulaire MDA-MB-231-Luc-RFP. Le complexe CADY/siLuc non fonctionnalisé entraîne environ 80% d'inhibition d'activité luciférase. Cependant, le complexe Y-CADY/siLuc est plus efficace en induisant ~99% d'inhibition d'activité luciférase à la même concentration de siLuc qui est de 80 nM (Figure 4 de l'article). Ce résultat démontre l'efficacité du ciblage spécifique des cellules cancéreuses MDA-MB-231 par le complexe Y-CADY/siLuc.

Pour aller plus loin, j'ai montré plus particulièrement dans ce travail l'effet du ciblage actif dans la délivrance du siRNA par le complexe ciblant Y-CADY/siCY5 *in vivo*. Pour ce faire, nous avons injecté des cellules cancéreuses fluorescentes (MDA-MB-231-Luc-RFP) dans des embryons de *zebrafish* pour former des xénogreffes. Une fois les xénogreffes formées, les complexes CPP/siIAP-cy5 ont été injectés dans la veine caudale. Cette expérience a été suivie par microscopie confocale pour une durée de 5 heures (time-laps) afin d'observer l'éventuel ciblage et co-localisation du siRNA avec les xénogreffes. Les résultats de cette étude ont montré que le vecteur Y-CADY était plus efficace pour cibler les cellules cancéreuses lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse dans des embryons de poisson zèbre. En effet, nous avons montré que, contrairement aux complexes CADY/siIAP-cy5, les complexes Y-CADY/siIAP-cy5 s'accumulaient activement dans les cellules cancéreuses de la xénogreffe humaine au bout de 5 heures d'incubation (Figure 5 de l'article).

Enfin, afin d'approfondir cette étude et de vérifier l'effet thérapeutique du complexe ciblant Y-CADY/siIAP dirigé contre la protéine inhibitrice d'apoptose, j'ai étudié l'activation du mécanisme d'apoptose par immunofluorescence *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'accumulation des complexes thérapeutiques Y-CADY/siIAP dans les xénogreffes induisaient l'activation du mécanisme d'apoptose détecté par le marquage de la caspase 3 observé par microscopie confocale (Figure 6 de l'article).



Improvement of Cell Penetrating Peptide for Efficient siRNA Targeting of Tumor Xenografts in Zebrafish Embryos

Nabila Laroui, Nicolas Cubedo, Mireille Rossel, and Nadir Bettache*

Cell-penetrating peptides (CPPs) are one of the most efficient vectors for achieving cellular uptake of different cargos. However, their application in cancer therapy is greatly limited due to the lack of tissue selectivity, as they are widely distributed in most tissues following *in vivo* administration. To introduce specificity and improve tumor targeting, a combination of a cell-penetrating peptide (CADY) and a targeting ligand, the laminin receptor binding peptide (YIGSR) to target the 37/67 kDa laminin receptor, known to be upregulated in most cancer cells and to be correlated with the invasiveness and metastatic potential, is formulated. The targeting CPP named “Y-CADY” does not induce any change in the physico-chemical properties (secondary structure, small interference RNA (siRNA) complexation, size, and charge) of CADY. Interestingly, Y-CADY is more efficient than CADY for gene silencing in cell lines, and more potent for targeting and for inducing apoptosis of tumor xenografts in zebrafish embryos. The present study demonstrates that the novel targeting CPP “Y-CADY” is efficient for gene silencing and can serve as a vector to target cancer cells *in vivo*.

uptake and poor biodistribution remains the principal challenge for siRNA-based therapeutics. Therefore, a number of different delivery systems have been investigated and developed, including cell-penetrating peptides (CPPs). CPPs correspond to short peptides less than 30 residues able to cross cell membranes and to transfer into cells the cargoes that are covalently or non-covalently linked to them. In the case of siRNA delivery, non-covalent strategies appear more appropriate because CPP covalent coupling showed restricted bioactivities.^[5,6] The 20-mer secondary amphipathic peptide named CADY has been demonstrated as an effective vector for siRNA delivery. It can form stable nanoparticles with siRNA through non-covalent interactions, deliver non-toxic siRNA into challenging cell lines efficiently, and prevent tumor growth *in vivo*, but non-specific inflammatory responses were reported.^[7]

Promising results have been obtained with different CPPs in biological response on cell lines and *in vivo* studies.^[8,9] However, CPPs are usually non-selective, which may lead to great losses in the circulation, and only a small percentage can accumulate within target cells.

The lack of cell specificity remains the major drawback for the clinical development of CPPs.^[10] In order to improve these characteristics, chemotherapeutic drugs can be conjugated to targeting moieties.^[11] Cell targeting peptides are usually obtained by combining a conventional CPP sequence with a tumor targeting peptide.

Several proteins specifically expressed at the surface of endothelial tumor cells have been proposed as target molecules for tumor vasculature targeting. Among these receptors, the 37/67 kDa laminin receptor (37/67 kDa LR), a non-integrin cell surface glycoprotein which is overexpressed at the surface of a wide variety of human tumor cells compared to normal cells,^[12–15] constitutes an attractive target. Laminin-1 (LN), a major component of the basal membrane, binds to the 37/67 kDa LR with high affinity.^[16] Specifically, the pentapeptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), derived from laminin β 1 chain, has been identified as the laminin binding site to its cell surface receptor.^[17–19] The peptide YIGSR has demonstrated its inhibitory effect on tumor growth of several human cancer cell lines and an anti-metastatic activity *in vivo*.^[20] These biological properties make the YIGSR peptide an attractive ligand for targeting tumor cells.

1. Introduction

RNA interference innovation has paved the way promisingly to post-transcriptional gene silencing approaches. So far, clinical trials have been evaluated in which small interference RNA (siRNA) constituted a biological significant tool.^[1–4] However, low cellular

N. Laroui, Dr. N. Bettache
Institut des Biomolécules Max Mousseron
UMR 5247
University of Montpellier
CNRS
ENSCM
15, avenue Charles Flahault, BP14491, F-34093 Montpellier cedex 5,
France
E-mail: nadir.bettache@umontpellier.fr
N. Cubedo, Dr. M. Rossel
INSERM
U1198
University of Montpellier
F-34095, Montpellier, France
N. Cubedo, Dr. M. Rossel
EPHE
4 rue Ferrus, Paris F-75014, France

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/adtp.201900204>

DOI: 10.1002/adtp.201900204

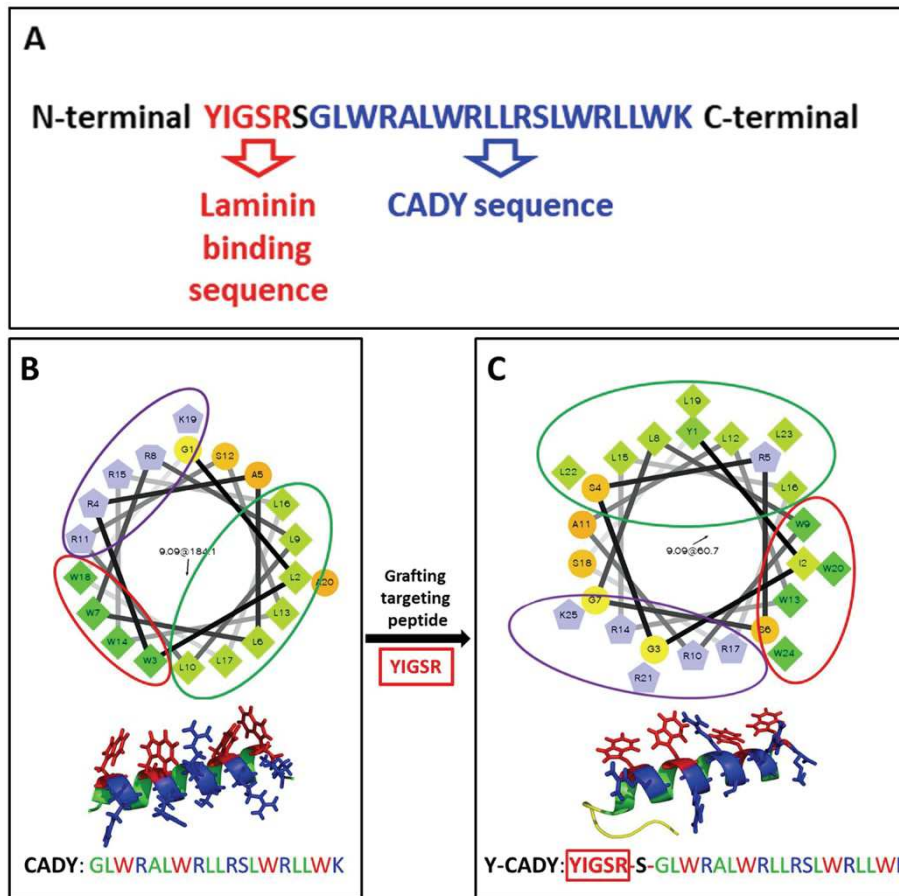


Figure 1. Schematic representation of YIGSR-CADY derived peptide named Y-CADY. A) Boxes surrounding the different segments represent CADY and targeting sequences. Structural conformations of the B) CADY and C) Y-CADY. The grafted targeting peptide in Y-CADY did not induce any amphipathicity changes (helical-wheel projections in the upper panel). The overall secondary structure remains the same for the two CPPs (lower panel) as demonstrated with I-Tasser software.

Recently, this peptide (YIGSR) has been grafted onto the Tat vector thereby improving siRNA gene silencing.^[21] In this study, we grafted the peptide YIGSR to the well-known secondary amphipathic peptide CADY used for non-covalent siRNA delivery vector. The resulting peptide named Y-CADY was compared to CADY by exploring its conformational structure, its capacity to encapsulate siRNA, size, zeta potential, cytotoxicity, transfection efficiency in cancer cells, and in vivo xenograft targeting. The overall physico-chemical properties of CADY were not affected by YIGSR grafting. Markedly, Y-CADY exhibits high siRNA transfection efficiency in cancer cells and more potent in vivo targeting than CADY.

2. Results and Discussion

2.1. Physicochemical Characterization of the Targeting Cell Penetrating Peptide Y-CADY

CADY is a well characterized non covalent secondary amphipathic cell penetrating peptide that forms stable complexes with siRNA and improves their cellular uptake.^[22] Despite its remarkable properties, CADY lacks tissue specificity and cell targeting. To improve the targeting efficiency, it is necessary to graft a targeting peptide to CADY. The new targeting CPP named “Y-CADY” is the combination of CADY and the pentapeptide YIGSR (Figure 1A). This pentapeptide is derived from laminin which is

Table 1. Conformational analysis of CADY and Y-CADY determined by CD spectroscopy.

α -helix content [%]	In water		In glucose 5%	
	CADY	Y-CADY	CADY	Y-CADY
Free CPP	15.94	21.06	21.67	23.71
CPP/siRNA	68.06	58.69	76.72	62.69
CPP/siRNA after 3 h	67.47	59.78	78.33	61.95

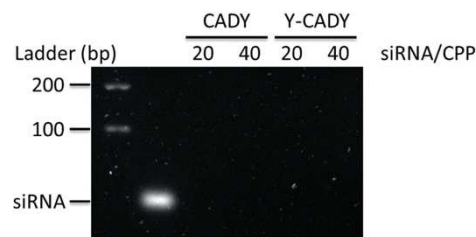
Alpha-helical contents recorded by CD spectra of CADY and Y-CADY in their free form or complexed with siRNA at a molar ratio of 20 obtained in water and in glucose 5%. The stability of the nanoparticles was tested after 3 h incubation.

described for its capacity to specifically bind to the 37/67 kDa LR.^[23] The choice of this laminin pentapeptide is motivated by the over-expression of the laminin receptor in many cancer cells.^[13] Indeed, we have confirmed that the laminin receptor is overexpressed in MDA-MB-231 cancer cells in comparison with normal fibroblasts (Figure S1, Supporting Information). To validate the utility of Y-CADY in biological studies, it is necessary to explore its structural properties in comparison with the original CADY peptide. The computational analysis of Y-CADY shows that the overall structural conformation is not influenced by the grafted targeting peptide compared to CADY (Figure 1B,C).

CADY is known to form stable complexes with siRNA and improve their delivery into several cell lines.^[24] Based on the structural properties of CADY, we aimed to explore if the grafted targeting peptide (YIGSR) might influence the helical character of the resulting peptide Y-CADY. In order to gain further experimental insight into the structural properties and helical character of the two CPPs, circular dichroism (CD) was measured under two different conditions. Secondary structure was determined for the peptide alone in solution, and when complexed with siRNA in water and in a 5% glucose solution, respectively, at a peptide/siRNA molar ratio of $R = 20$ (Table 1). The two free CPPs exhibited mainly random coil conformations and a small percentage of α -helices (16% for CADY and 21% for Y-CADY). When complexed with siRNA, the two CPPs exhibited a conformational change with an enhanced content of α -helices for both CPPs, 68% for CADY and 59% for Y-CADY in water and 77% for CADY and 63% for Y-CADY in 5% glucose. These CPP/siRNA nanoparticles were stable after 3 h incubation even in water or in 5% glucose solution (Table 1; Figure S2, Supporting Information).

2.2. CPP/siRNA Complexation

To assess complexation of siRNA, we assessed CPP/siRNA complex formation by agarose shift assay (Figure 2). This assay was used to follow the complexation state in a molar ratio-dependent manner because siRNA migration into the agarose gel will be prevented by CPP interactions. Y-CADY is clearly able to complex siRNA in a similar manner as CADY with optimal complexation at peptide/siRNA molar ratio of $R = 20$ (Figure 2). This ratio corresponds to 20 CPP molar excess over siRNA and was used for all experiments. In conclusion, agarose gel assay clearly demonstrated that the targeting peptide YIGSR did not affect siRNA encapsulation.

**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis assay for CADY and Y-CADY complexed with siRNA at a molar ratio of 20 and 40. Data are representative of three different experiments.**Table 2.** Size and charge determinations of CADY/siRNA and Y-CADY/siRNA nanoparticles.

	CADY	Y-CADY
Average diameter [nm \pm SD]	115.17 \pm 1.36	104.17 \pm 3.49
Polydispersity index (PDI)	0.384 \pm 0.010	0.393 \pm 0.019
Zeta potential [mV \pm SD]	+56 \pm 4.74	+57 \pm 1.44

CPP/siRNA nanoparticles were formed at $R = 20$ using a siRNA concentration of 500 nM in a 5% glucose aqueous solution for mean size acquisition and in a 5% glucose aqueous solution supplemented with 5 mM NaCl for zeta potential (ZP) assessment. All values represent the mean \pm SD of three independent measurements.

2.3. Size and ζ -Potential Determination of CPP/siRNA Nanoparticles

The particle size and zeta potential characteristics of the CPP/siRNA nanoparticles are important for gene delivery in terms of influencing cellular uptake, nuclear entry and transfection efficiency. Size and homogeneity were determined for each complex (5% glucose, $R = 20$). Dynamic light scattering (DLS) investigations revealed that CADY and Y-CADY formed nanoparticles with diameters of 115 and 104 nm, respectively, with polydispersity index (PDI) of 0.384 and 0.393, respectively (Table 2). Charge surface of nanoparticles was also evaluated by zeta potential (ZP) measurements revealing close values of 56 and 57 mV for CADY/siRNA and Y-CADY/siRNA nanoparticles, respectively, in 5% glucose (Table 2). The size and the charge of such nanoparticles were stable for several hours (data not shown).

2.4. Cellular Uptake and GFP Gene Silencing in HCT-116-GFP Cells

Cellular uptakes of the two CADY/siGFP-cy5 and Y-CADY/siGFP-cy5 nanoparticles were evaluated in HCT-116 cells expressing the GFP protein in the cytoplasm by using confocal microscopy. As shown in Figure 3, both CPPs were able to deliver the siGFP into the cytoplasm (magenta staining) as compared with Lipofectamine[®] RNAiMax transfection. The free siGFP-cy5 itself did not enter cells. At the same time, target-specific GFP silencing activities of the two nanoparticles CADY/siGFP-cy5

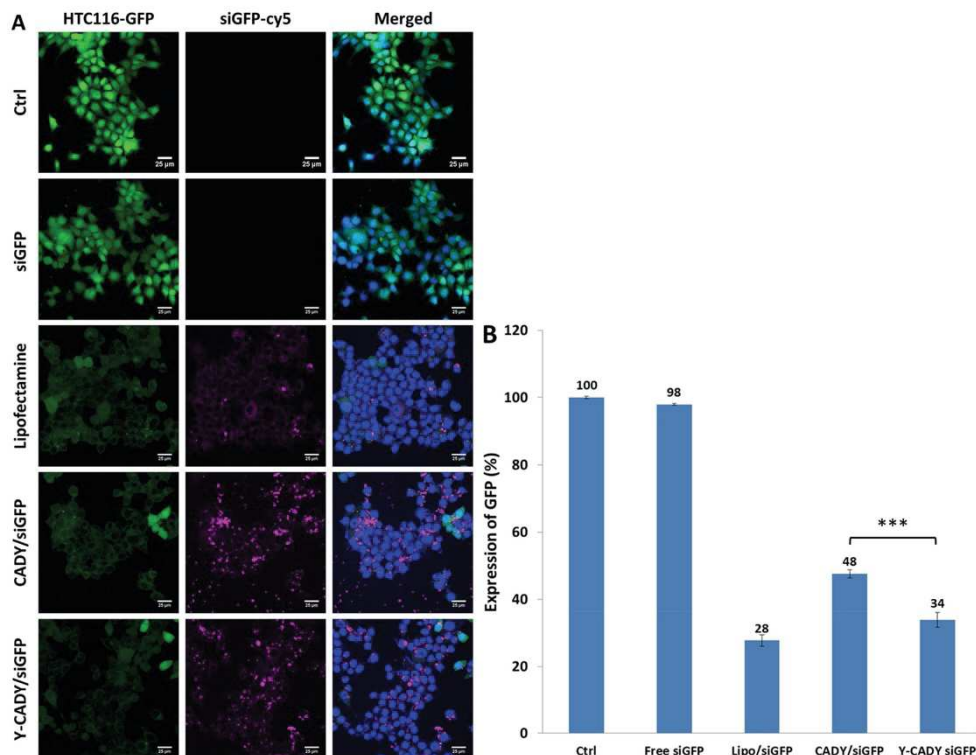


Figure 3. GFP fluorescence silencing induced by CADY/siGFP-cy5 complex and its targeted analog Y-CADY/siGFP-cy5 in HCT-116-GFP cells. Dose of siRNA for CADY/siGFP-cy5, Y-CADY/siGFP-cy5 and naked siGFP-cy5 was 50 nmol L^{-1} , while dose of siRNA for Lipofectamine[®] RNAiMax was 20 nmol L^{-1} . A) Confocal photomicrographs. eGFP fluorescence (green), nucleus was stained with DAPI (blue) and siGFP labeled with cy5 (magenta). Ctrl, Control non-transfected HCT-116-GFP cells; siGFP, cells incubated with naked siGFP-cy5 alone; Lipofectamine, cells transfected with Lipofectamine[®] RNAiMax/siGFP-cy5 (positive control); CADY/siGFP, and Y-CADY/siGFP, cells transfected with CADY/siGFP-cy5 and with Y-CADY/siGFP-cy5 at a molar ratio $R = 20$, respectively. The final concentrations of siGFP-cy5 were 50 nM and $1 \mu\text{M}$ for CPPs. B) GFP fluorescence extinction quantified by flow cytometry. The values (%) are the average of three independent experiments (means \pm SD), *** $p < .001$.

and Y-CADY/siGFP-cy5 were comparatively evaluated. Indeed, there is a net correlation between siRNA uptake and gene silencing since we observed inhibition of GFP expression by the extinction of its fluorescence in cells transfected even by the two CPP/siGFP-cy5 nanoparticles or with siGFP-cy5 Lipofectamine[®] RNAiMax. The extinction of GFP fluorescence was quantified by flow cytometry. The GFP fluorescence of the cells incubated with the free siGFP-cy5 was comparable to the control HCT-116-GFP cells (without any treatment). The extent of GFP fluorescence extinction was quantitatively evaluated by flow cytometry considering the control as 100% (Figure 3B). The extent of GFP fluorescence extinction was more potent with Y-CADY/siGFP (66%) than with CADY/siGFP (52%) as compared with siGFP transfected with Lipofectamine[®] RNAiMax (72%). The more potency of Y-CADY to inhibit the GFP expression is in accordance with Ciocce et al. who showed an overexpression of the 37/67 kDa LR in human colon cancer.^[25]

2.5. Quantitative Luciferase Inhibition in MDA-MB-231-RFP-Luc Cells

As we have shown that the MDA-MB-231 cell line overexpressed the 37/67 kDa LR (Figure S1, Supporting Information), we investigated the efficiency of targeting Y-CADY in comparison with CADY to inhibit the luciferase activity in MDA-MB-RFP-Luc cell line. The two CPP/siLuc nanoparticles efficiently inhibit luciferase activity in a dose-dependent manner (Figure 4). Interestingly, Y-CADY had a more potent action on luciferase activity with a maximal inhibition of 98.71% at a siLuc concentration of 80 nM , whereas CADY inhibited luciferase activity by 80% at the same concentration of siLuc. In these experimental conditions, cell viability was 80% except for Lipofectamine[®] RNAiMax transfection (65%). This efficiency of Y-CADY to inhibit luciferase activity is due to the multimeric presence of the targeting peptide YIGSR on the nanoparticles since Y-CADY is complexed

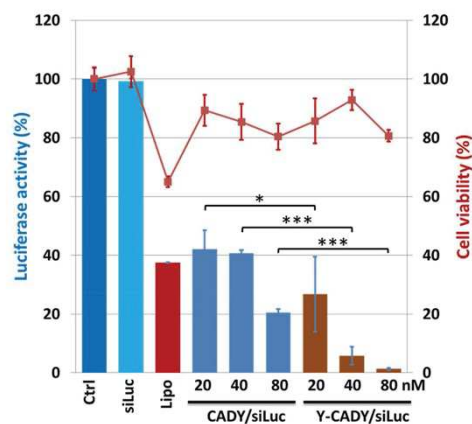


Figure 4. Knock down of luciferase activity by CADY/siLuc and its targeting analog Y-CADY/siLuc in MDA-MB-231-Luc-RFP. Ctrl, MDA-MB-231-Luc-RFP cells without any treatment; siLuc, cells incubated with naked siLuc at 80 nM; Lipo, cells transfected with Lipofectamine[®] RNaiMax and siLuc at a concentration of 20 nM; CADY/siLuc, cells transfected with CADY/siLuc at a molar ratio $R = 20$ with siLuc concentrations of 20, 40, and 80 nM; Y-CADY/siLuc, cells transfected with Y-CADY/siLuc at a molar ratio $R = 20$ with siLuc concentrations of 20, 40, and 80 nM. Cell viability was evaluated for each condition of transfection. The results were the average of three independent experiments (means \pm SD), * $p < .05$, *** $p < .001$.

with siRNA at a molar ratio of 20. Indeed, Deshayes et al.^[26] have shown that the CADY/siRNA nanoparticles form a “raspberry” constituted of several “drupelets.” These “drupelets” represent the basic element of CADY/siRNA nanoparticles. Furthermore, Nomizu et al.^[27] have shown that the multimeric branched synthetic peptide containing 16 YIGSR (Ac-16Y) is more potent to inhibit tumor growth and metastasis.

2.6. Targeting in Vivo Apoptosis Gene Silencing in Zebrafish Embryos

Cancer cells are known to be resistant to apoptosis and survive and grow in microenvironments deficient in oxygen and necessary growth factors, conditions that are hostile to normal cells.^[28,29] This apoptosis resistance is often correlated with the high-level expression of anti-apoptotic proteins in various cancers. Among these proteins, inhibitory apoptotic proteins (IAPs) family represent an attractive target for cancer therapy.^[30] Numerous pre-clinical studies have shown that targeting IAPs, sensitize cancer cells to apoptosis. In this in vivo study, we used an siRNA specific to cIAP1 protein as a therapeutic agent to be delivered by CPP so as to target xenografts developed in zebrafish embryos. The zebrafish (*Danio rerio*) represents a powerful model in cancer research.^[31,32] This vertebrate model allows us to test in vivo targeting of the CPP/siRNA nanoparticles. First, human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231 expressing luciferase and RFP (MDA-MB-231-Luc-RFP) were implanted in the perivittelline space of embryos at 48 h post-fertilization (hpf). Zebrafish

embryos injected with human cancer cells were kept at 34 °C as a compromise between the optimal temperatures for zebrafish embryos (28 °C) and human cells (37 °C). The successfully injected embryos were sorted using the RFP fluorescence of MDA-MB-231-Luc-RFP. A homogenous population of xenografted zebrafish embryos was then kept for 2 days until the development of the tumors. At 4 days post-fertilization (dpf), embryos were imaged and then intravenously injected ($n = 80$, caudal vein) or not with CPP/siRNA nanoparticles (Figure 5A). Injected MDA-MB-231-Luc-RFP form homogeneous tumor in the peri-vittelline space visualized by confocal microscopy thanks to RFP fluorescence (Figure 5B). The CADY/siCIP1-cy5 nanoparticles did not target the xenograft ($n = 40$) (Figure 5B, Movie S1, Supporting Information). However, the Y-CADY/siCIP1-cy5 nanoparticles clearly targeted xenografts ($n = 40$) thanks to the targeting peptide YIGSR (Figure 5B; Movies S2 and S3, Supporting Information).

To investigate how the siCIP1 induced gene silencing and consequently the apoptosis of the tumor xenografts, we used confocal microscopy imaging of immunostained fixed whole injected zebrafish embryos at 6 dpf. Indeed, the fixed embryos were treated with a primary antibody specific of caspase 3, which is expressed during apoptosis. Images were acquired on each immunostained fixed whole injected zebrafish embryos at 6 dpf. As shown in Figure 5C, control xenografted embryos without any injection and xenografted embryos injected with naked siCIP1-cy5 presented a low caspase-3 signal (Figure 6A,B). The xenografted embryos injected intravenously with CADY/siCIP1-cy5 nanoparticles showed limited caspase-3 activation (Figure 6C). In contrast, caspase-3 activation and apoptosis were clearly observed in xenografted embryos injected with Y-CADY/siCIP1-cy5 nanoparticles ($n = 25$, 100% of embryos are caspase-3 positive) (Figure 6D; Figure S5, Supporting Information).

The results collectively demonstrate the ability of the targeting cell penetrating peptide Y-CADY to reach the tumor xenograft and to induce apoptosis more potently in comparison with CADY.

3. Conclusions

In summary, we designed and engineered a novel and efficient vector for gene therapy, by grafting the laminin pentapeptide YIGSR to the well-known non-covalent secondary amphipathic cell penetrating peptide CADY, in order to target cancer cells which express high level of the 37/67 kDa LR. The targeting peptide did not alter the physico-chemical properties of the cell penetrating peptide since the encapsulation capacity; size and charge of the obtained nanoparticles were not modified. This functionalized peptide (Y-CADY) was significantly more potent in gene silencing even in cultured cells and in vivo. Importantly, Y-CADY is more efficient for targeting cancer cells when injected intravenously in zebrafish embryos. The results of this study indicated that the designed peptide vectors displayed high gene transfection efficiency and low cytotoxicity. Finally, we showed that Y-CADY/siRNA nanoparticles accumulated actively in human xenograft cancer cells and efficiently induced apoptosis by activating caspase-3.

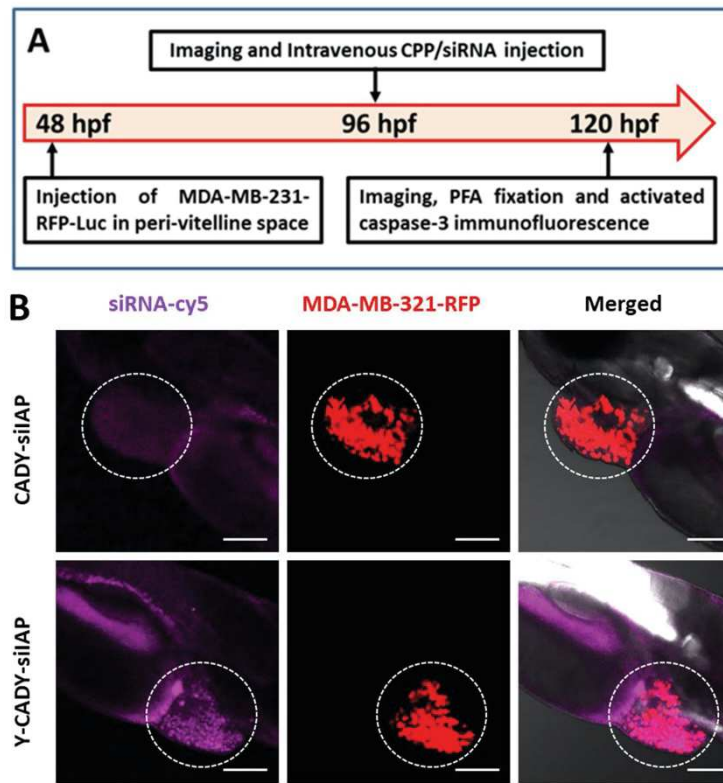


Figure 5. Tumor targeting and therapeutic efficacy of Y-CADY/siCIAP1 nanoparticles in vivo. A) Protocol of different steps of zebrafish embryos injected with human MDA-MB-231-Luc-RFP cancer cells and the intravenous injection of CPP/siCIAP1-cy5 followed by confocal imaging. B) Near-infrared (NIR) imaging of the xenograft targeting (red) by CADY/siCIAP1-cy5 nanoparticles (magenta, upper panel) and by Y-CADY/siCIAP1-cy5 nanoparticles (magenta, lower panel). These images are representative of 25 zebrafish embryos for each condition. Bars represent 200 μm .

4. Experimental Section

Materials: The cell-penetrating peptides CADY and Y-CADY were prepared by solid-phase peptide synthesis in the authors' laboratory (SynBio 3 peptide platform, IBMM, Montpellier). The peptide sequences for CADY and Y-CADY were as follows GLWRALWRLRLSLWRLWK and YIGSRSGLWRALWRLRLSLWRLWK, respectively. The purity (>95%) and the molecular weight of the peptides were confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry analyses.

Unlabeled siRNA and fluorescently labeled siRNA* were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). The different siRNA sequences were as follows:

siRNA	Sequences
Firefly Luciferase (siFLuc)	5'-CUUACGCGUAGUACUUCGAdTdT-3'
Inhibitor Apoptotic Protein* (siCIAP1*)	5'-CUAGGAGACAGUCCAUUCdTTdT-3'
Green Fluorescent Protein* (siGFP*)	5'-GGCUACGUCCAGGAGCCAdTTdT-3'
Ctrl-labeled siRNA* (siCtrl*)	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTTdT-3'

Gel Electrophoresis with siRNA: Gel retardation assays with siRNA were performed using 100 pmoles of siCtrl, which were mixed with the appropriate amounts of CPP (in order to reach the desired molar ratio) in RNase free water. Blue 6X loading dye (Fisher Scientific) was added and electrophoresis was carried out on a 2% w/v agarose gel mixed with GelRed nucleic acid gel stain (Interchim, France) in 1X TBE (90 mM Tris-borate/2 mM EDTA, pH 8.2). The gel was run in 0.5X TBE at 50 V for 1 h. The reference for the gel was a 100 bp DNA ladder from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, S4 France). The GelRed-stained siRNA was visualized on an ultraviolet transilluminator and imaged with an Infinity Gel documentation Imaging device (Vilber Lourmat, France).

CD Measurements: CD spectra were recorded with an optical path of 1 mm on a Jasco 810 (Japan) dichrograph in quartz suprasil cells (Hellma). For each condition, same concentrations of peptide (40 μM) were used. Spectra of three accumulations were recorded between 190 and 260 nm (0.5 nm data pitch, 1 nm bandwidth).

Particle Size and Zeta Potential Measurements: Particle size and zeta potential measurements were carried out on a Zetasizer Nano ZS (Malvern, United Kingdom). Particle size was carried out in transparent ZEN0040 disposable microcuvette cells (40 μL) at 25 $^{\circ}\text{C}$. The siRNA/ CPP

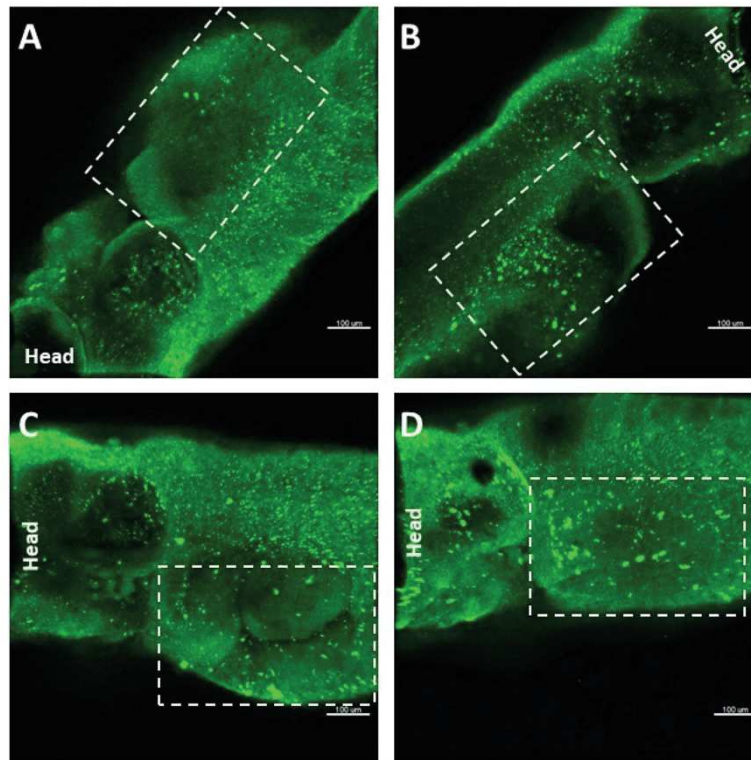


Figure 6. Xenograft apoptosis induced by gene silencing of CIAP1 (Inhibitory Apoptosis Protein). Confocal microscopy imaging of positive caspase-3 immunostained fixed control A) xenografted zebrafish embryos at 6 dpf; B) xenografted zebrafish embryos injected with naked siCIAP1-cy5; C) xenografted zebrafish embryos injected with CADY/siCIAP1-cy5 nanoparticles and D) xenografted zebrafish embryos injected with Y-CADY/siCIAP1-cy5 nanoparticles. These images are representative of 25 zebrafish embryos for each condition. Bars represent 100 μm .

nanoparticles were prepared in glucose solution (5%) at a molar ratio $R = 20$ using siCtrl at a final concentration of 1 μM . A molar ratio of 20 ($R = 20$) corresponds to 20-fold higher molar concentration of CPP compared to siRNA. Measurements were performed immediately after nanoparticle formation and after 1 h incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$. For zeta potential analyses, the CPP solutions were diluted in 5 mM NaCl. The siRNA/ CPP nanoparticles were prepared by mixing appropriate amounts of CPP (20 μM) and siRNA (1 μM) which corresponds to the molar ratio $R = 20$ and diluted in glucose solution (5%) at a final volume of 1000 μL . Measurements were carried out in zeta potential DTS1070 cuvette at 25 $^{\circ}\text{C}$. All measurements were collected in triplicate and expressed as mean \pm standard errors. Each measurement consisted of at least 12 runs.

GFP Silencing Experiment: HCT-116-GFP cells, generous gift from Daniel Fisher Laboratory (IGMM, Montpellier, France), were seeded at a density of 65 000 cells per well in 24-well plates that had a round-glass coverslip (12 mm diameter), and were incubated for 24 h prior to transfection. The cells were incubated with Cy5-labeled-siGFP/ CPP nanoparticles at a molar ratio of 20 in complete medium for 48 h. Final concentration of siRNA during cell transfection procedure was 50 nM. Lipofectamine^R RNAiMAX Reagent (Invitrogen) was used as the positive control transfection reagent following the manufacturer's protocol. Cells were incubated

for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 . Then, the media was replaced with fresh one and cells were incubated for 48 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 . After incubation, cells were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min, and washed twice with PBS. Nuclei were stained using a DAPI solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). The cell-containing coverslips were mounted on the slides using Dako fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA). The slides were examined with Leica confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH, Germany). Three laser lines were used: 405 nm (to detect cell nuclei stained with DAPI), 488 nm (to detect GFP), and 633 nm (to detect Cy5 labeled siRNA). Analysis of the recorded images was carried out by using the Fiji software (NIH Image, Bethesda, MD, USA).

Quantification of GFP Silencing by Flow Cytometry: HCT-116-GFP cells were treated or not with CADY/siGFP (50 nM), Y-CADY/siGFP (50 nM), Lipofectamine/siGFP (50 nM) and siRNA GFP alone (50 nM) for 72 h. After treatment, control and treated cells were washed once in cold Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested and centrifuged (1300 rpm, 5 min). Cell pellets were resuspended in PBS enriched with $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2 +$ and stained with propidium iodide (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), a cell death indicator. Flow cytometric determination of living cells and treated positive cells was done by FACS NovoCyt with a minimum of

20 000 living cells collected. Data were analyzed with NovoExpress software (ACEA Biosciences, Inc.).

Cell Luciferase Assay: MDA-MB-231-Luc-RFP stable cell line, obtained from AMSBIO (SC041, Abingdon, UK), was seeded at a density of 5000 cells per well in 96-well white opaque tissue culture plates in 150 μ L phenol red-free F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were then washed with PBS and incubated with CPP/siLuc complex formulations at a molar ratio $R = 20$ with the siLuc concentrations of 20, 40 and 80 nm in Opti-MEM at 37 °C for 4 h. Thereafter, 50 μ L of 40% serum containing medium was added to reach the final volume of 200 μ L. Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Invitrogen) was used as the positive control transfection reagent following the manufacturer's protocol. 2 days after transfection, expression of luciferase was assessed by addition into culture medium of luciferin (10^{-3} M, final concentration) purchased from Promega (France). Living cell luminescence was measured 10 min after by a plate reader CLARIOstar High Performance Monochromator Multimode Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) and were averaged from triplicates. The percentage of luminescence of treated cells was calculated by using the control cell as 100%. Each assay was repeated at least twice. Luciferase activity was normalized in accordance to the total number of living cells in each sample as determined by the MTT assay described elsewhere.^[33]

Zebrafish Embryos: Casper zebrafish were purchased from the Zebrafish International Resource Center (ZIRC) as embryos and raised to adulthood in MMDN, Inserm U1198 lab's facilities, Montpellier. Ethic approval for the animal experiments was done according to the recommendations of INSERM, University of Montpellier, and the European Convention for the Protection of Animals used for Experimental and Scientific Purposes. Zebrafish larvae were followed up to 6 days old at the end of the protocol, and consequently experiments were conducted according to the guidelines of the European Community Council directive 2010/63/EU. The accreditation number of the zebrafish facility is A34-172-37 and the experimental authorization was attributed under the number APAFIS#8884-2017021011315319v5. Only fish directly from ZIRC or their F offspring were used as egg producers to avoid inbreeding effects. Embryos were obtained from pairs of adult fish by natural spawning and raised at 28.5 °C in tank water. Embryos and larvae were staged according to Kimmel et al.^[34]

Injection and Imaging of MDA-MB-231 in Zebrafish Embryos: The MDA-MB-231-Luc-RFP cells were seeded in a 75 cm dish and incubated for 24 h. The cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in a sufficient volume of PBS containing 10% FCS, to achieve a cell concentration of 10^7 cells mL⁻¹. The cell populations were kept on ice until injection.

The Casper embryos at 48 hpf were anesthetized with tricaine solution at 17 mg mL⁻¹ 10 min prior to injection. Each embryo was placed in an agar mold for the microinjection of MDA-MB-231-Luc-RFP cells. 10% of phenol red was added to each cell population to visualize cells in the circulation of the embryo at the time of injection. Needles made of borosilicate glass with an internal diameter of 0.78 mm were loaded with 4 μ L of the desired cell suspension. The cells were then injected into perivitelline space. Each embryo received three pulses of 5 nL cell suspension of $2 \cdot 10^7$ cells mL⁻¹ to get 400–500 injected cells per embryo. The embryos were then placed in a 96-well plate (1 embryo per well in 200 μ L of water), incubated at 34 °C and observed regularly after injection. 2 days later, the embryos were imaged using the Carl Zeiss LSM780 Microscope (objective: NA 0.3, 10x) and embryos bearing homogeneous and comparable xenografts were kept for further experimental use. The different siRNA (Cy5-labeled siCtrl or Cy5-labeled siCIP1) at 5 μ M complexed with CPP at a molar ratio $R = 20$ diluted in water containing 1% phenol red were intravenously injected (10 nL) into xenografted zebrafish larvae. After 24 h, the targeting of the CPP/siRNA nanoparticles in the xenografts was assessed by imaging the embryos with the same microscope.

Caspase-3 Immunofluorescence with Zebrafish Embryos: The caspase-3 immunofluorescence experiments were done according to Jimenez

et al.^[35] Briefly, the control embryos and those bearing xenografts injected or not with CPP/siRNA nanoparticles were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA), dehydrated through a series wash of methanol/PBST (25%/50%/75%/100% MeOH/PBST (PBS/0.1% tween), 10 min for each step). The embryos were placed in the freezer (-20 °C) overnight then rehydrated through a series wash of methanol/PBST (100%/75%/50%/25% MeOH/PBST, 5 min for each step), washed three times with PBST, with Tris buffer (150 mM Tris-HCl pH 9.0) for 5 min. The embryos were equilibrated in Tris buffer at 70 °C for 15 min and washed with PBST for twice, 5 min for each wash. The following step was to rinse the embryos quickly with dH2O twice on the ice then penetrate them with pre-chilled Acetone (-20 °C) in the freezer at -20 °C for 20 min. After quick washes with dH2O twice for 5 min (three times), embryos were blocked with 10% NGS/2% BSA/PBT (0.1 M phosphate buffer pH 7.4 + 0.8% Triton X-100) for 4 h at 4 °C then incubated with affinity-purified rabbit anti-human active caspase-3 (1/100, Millipore, Temecula USA) diluted in 2% NGS/2% BSA/PBT at 4 °C for 1 day. Embryos were washed with PBT for 30 min (four times) and incubated with AlexaFluor-488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.) diluted in 2% NGS/2% BSA/PBT for 3 h at RT (in dark), washed five times in PBST (5 min each). After washing, embryos were fixed again with 4% PFA for 20 min at RT and washed with PBST for 5 min (5 times). The embryos were mounted and finally examined under a Carl Zeiss confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 880, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Analysis of the recorded images was carried out with the Imapris 9.2 software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

Statistical Analysis: Data are presented as the mean \pm SD. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. The comparison between groups was analyzed with Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05 ($p < 0.05$). The level of significance was defined at ns (not significative), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors thank the CNRS and the Montpellier University for financial support. The authors are grateful to Dr. Lubomir Vezekov (IBMM, Montpellier) for peptide synthesis, Dr. Daniel Fisher (IGM Montpellier) for the generous gift of the HCT-116-GFP cells and MRI (Montpellier RIO Imaging) platform for confocal imaging facilities access. The authors thank Drs. Magali Gary-Bobo and Jean-Olivier Durand for critical reading of the manuscript and Dr. May Morris for English improvement and critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

37/67 kDa LR, cell penetrating peptide, siRNA, targeting, xenograft, zebrafish

Received: November 25, 2019

Published online:

- [1] T. Schluep, J. Lickliter, J. Hamilton, D. L. Lewis, C. L. Lai, J. Y. Lau, S. A. Locarnini, R. G. Gish, B. D. Given, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2017**, *6*, 350.
- [2] D. Strumberg, B. Schultheis, U. Traugott, C. Vank, A. Santel, O. Keil, K. Giese, J. Kaufmann, J. Dreves, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2012**, *50*, 76.
- [3] K. Suzuki, J. Yokoyama, Y. Kawauchi, Y. Honda, H. Sato, Y. Aoyagi, S. Terai, K. Okazaki, Y. Suzuki, Y. Sameshima, T. Fukushima, K. Sugahara, R. Atreya, M. F. Neurath, K. Watanabe, H. Yoneyama, H. Asakura, *J. Crohn's Colitis* **2017**, *11*, 221.
- [4] M. J. Wagner, R. Mitra, M. J. McArthur, W. Baze, K. Barnhart, S. Y. Wu, C. Rodriguez-Aguayo, X. Zhang, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1114.
- [5] S. Deshayes, K. Konate, G. Aldrian, L. Crombez, F. Heitz, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 2304.
- [6] A. H. van Asbeck, A. Beyerle, H. McNeill, P. H. Bovee-Geurts, S. Lindberg, W. P. Verdurmen, M. Hallbrink, U. Langel, O. Heidenreich, R. Brock, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3797.
- [7] L. Crombez, G. Divita, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *683*, 349.
- [8] T. H. Hsieh, C. Y. Hsu, C. F. Tsai, C. C. Chiu, S. S. Liang, T. N. Wang, P. L. Kuo, C. Y. Long, E. M. Tsai, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19156.
- [9] H. Hu, J. Wang, H. Wang, T. Tan, J. Li, Z. Wang, K. Sun, Y. Li, Z. Zhang, *Theranostics* **2018**, *8*, 3597.
- [10] E. Vives, J. Schmidt, A. Pelegrin, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1786*, 126.
- [11] T. Letoha, A. Keller-Pinter, E. Kusz, C. Kolozsi, Z. Bozso, G. Toth, C. Vitzler, Z. Olah, L. Szilak, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 2258.
- [12] C. Zuber, S. Knackmuss, G. Zemora, U. Reusch, E. Vlasova, D. Diehl, V. Mick, K. Hoffmann, D. Nikles, T. Frohlich, G. J. Arnold, B. Brenig, E. Wolf, H. Lahm, M. Little, S. Weiss, *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 530.
- [13] H. Yam, E. Chew, H. Chen, S. Wu, S. Chengchew, L. Yang, S. Wang, C. Liew, B. Wu, *Oncol. Rep.* **1997**, *4*, 115.
- [14] F. A. van den Brule, A. Berchuck, R. C. Bast, F. T. Liu, C. Gillet, M. E. Sobel, V. Castronovo, *Eur. J. Cancer* **1994**, *30A*, 1096.
- [15] A. Pesapane, P. Ragno, C. Selleri, N. Montuori, *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 4745.
- [16] I. Vande Broek, K. Vanderkerken, C. De Greef, K. Asosingh, N. Straetmans, B. Van Camp, I. Van Riet, *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 1387.
- [17] J. Graf, R. C. Ogle, F. A. Robey, M. Sasaki, G. R. Martin, Y. Yamada, H. K. Kleinman, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6896.
- [18] J. Graf, Y. Iwamoto, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, F. A. Robey, Y. Yamada, *Cell* **1987**, *48*, 989.
- [19] V. DiGiacomo, D. Meruelo, *Biol. Rev.* **2016**, *91*, 288.
- [20] K. Yamamura, M. C. Kibbey, S. H. Jun, H. K. Kleinman, *Semin. Cancer Biol.* **1993**, *4*, 259.
- [21] Z. Meng, Z. Kang, C. Sun, S. Yang, B. Zhao, S. Feng, Q. Meng, K. Liu, *Nanoscale* **2018**, *10*, 1215.
- [22] K. Konate, L. Crombez, S. Deshayes, M. Decaffmeyer, A. Thomas, R. Brasseur, G. Aldrian, F. Heitz, G. Divita, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3393.
- [23] L. A. Lopez-Barcons, D. Polo, F. Reig, A. Fabra, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *69*, 155.
- [24] L. Crombez, G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz, G. Divita, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 95.
- [25] V. Cioce, V. Castronovo, B. M. Shmookler, S. Garbisa, W. F. Grigioni, L. A. Liotta, M. E. Sobel, *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 29.
- [26] S. Deshayes, K. Konate, A. Rydstrom, L. Crombez, C. Godefroy, P. E. Milhiet, A. Thomas, R. Brasseur, G. Aldrian, F. Heitz, M. A. Munoz-Morris, J. M. Devoisselle, G. Divita, *Small* **2012**, *8*, 2184.
- [27] M. Nomizu, K. Yamamura, H. K. Kleinman, Y. Yamada, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3459.
- [28] F. H. Igney, P. H. Krammer, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 277.
- [29] R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, S. W. Lowe, *Cell* **2002**, *108*, 153.
- [30] Q. L. Deveraux, J. C. Reed, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 239.
- [31] S. Nicoli, D. Ribatti, F. Cotelli, M. Presta, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2927.
- [32] R. Fior, V. Povoja, R. V. Mendes, T. Carvalho, A. Gomes, N. Figueiredo, M. G. Ferreira, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8234.
- [33] P. Kumar, A. Nagarajan, P. D. Uchil, *Cold Spring Harbor Protoc.* **2018**, *2018*, pdb.prot095505.
- [34] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253.
- [35] C. M. Jimenez, D. Aggad, J. G. Croissant, K. Tresfield, D. Laurencin, D. Berthomieu, N. Cubedo, M. Rossel, S. Alsaïari, D. H. Anjum, R. Sougrat, M. A. Roldan-Gutierrez, S. Richeter, E. Oliviero, L. Raehm, C. Charnay, X. Cattoen, S. Clement, M. W. C. Man, M. Maynadier, V. Chaleix, V. Sol, M. Garcia, M. Gary-Bobo, N. M. Khashab, N. Bettache, J. O. Durand, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1800235.

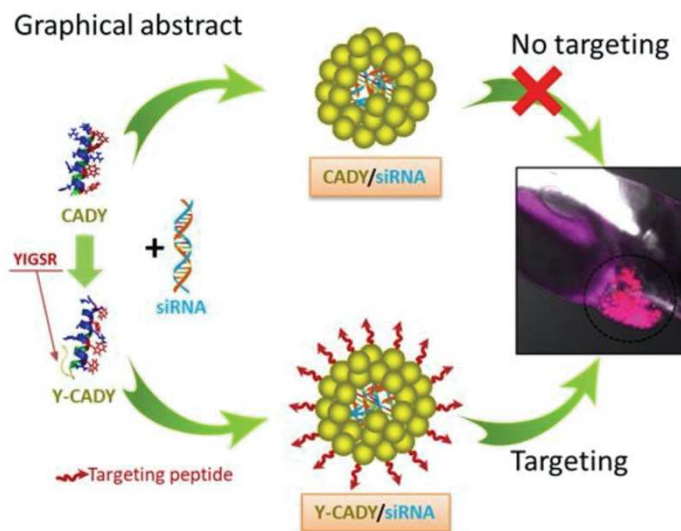
SUPPORTING INFORMATION

Title: Improvement of cell penetrating peptide for efficient siRNA targeting of tumor xenografts in zebrafish embryos.

Author(s), and Corresponding Author* Nabila Laroui^a, Nicolas Cubedo^b, Dr. Mireille Rossel^b and Dr. Nadir Bettache^{a*}

^aInstitut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, 15, avenue Charles Flahault, BP14491, F-34093 Montpellier cedex 5, France. Email : nadir.bettache@umontpellier.fr

^bINSERM, U1198, University of Montpellier, F-34095, Montpellier, France, EPHE, Paris, F-75014, France.



Experimental Section

1- Crystal violet cell proliferation assay:

Cell proliferation was measured by Crystal violet assay as the percentage of live cells treated with CPP/siRNA nanoparticles compared to the control¹. HeLa cells (ATCC® CCL-2™), obtained from ATCC (LGC Standards Sarl, Molsheim, France), were plated at 3×10^5 per well in 96-well tissue culture plates and grown in DMEM–1% FBS. Three different conditions were used: (a) control cells without any treatment, (b) cells treated with CADY/siCtrl nanoparticles at a molar ratio R=20 with 1 μ M siRNA concentration and (c) cells treated with Y-CADY/siCtrl nanoparticles at a molar ratio R=20 with 1 μ M siRNA concentration. At the indicated time points (0, 6, 24 and 48h), cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and rinsed with PBS. The cells were then stained with crystal violet (0.1%) for 30 minutes at room temperature (RT). After three washes in distilled water the plates were dried and crystal violet was solubilized in acetic acid (10%) for 40 min. Absorbance of solubilized crystal violet was measured at 595 nm. Cell viability was calculated as the percentage of live cells compared to the control. The viability assay was performed in triplicate in three independent experiments.

2- In-cell ELISA:

The cell lines CCD45-SK (healthy human fibroblasts derived from skin, were purchased from ATCC® CRL 1506) and MDA-MB 231 were seeded in a 96 wells plate (10×10^3 cells/well; 70% confluent) and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂. Cells were fixed with PBS-4% PFA for 15 min, washed and blocked with Blocking Solution “BS” for 30 min. Supernatants were then gently aspirated and the primary antibody (Rb pAb anti-RPSA, GenTex) diluted 1:1000 in BS/washing buffer “WB” was added and incubated overnight at 4 °C. The reaction was revealed using an anti-rabbit-IgG-peroxidase conjugate (1:400 in WB; 30 min at RT). After three washes with WB, the TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate was added and incubated for 15 min at RT protected from light. The reaction was stopped with a TMB STOP solution and plate was read at 450 nm. To account for differences in cell seeding density was normalized to the Janus Green staining dye. Briefly, after the in-cell assay protocol was completed, the plate was washed twice with ultrapure water and Janus Green stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) was added (100 μ L/well). The plate was incubated for 5 min at RT. Then the dye was removed and after 5 washes, the plate was incubated with 100 μ L elution buffer and read at 615 nm. Once normalized, TMB-optical density (OD) values of each sample were subtracted from the mock-treated wells (corrected OD values) and averaged from triplicate wells. Each assay was repeated at least twice.

3- Caspase-3 immunofluorescence in vitro

After treating or not MDA-MB 231 cells with CPPs/siIAP, they were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) for 10 min at RT, washed 3 times with PBS and then permabilized with PBS/0.2 % Triton X-100[®] for 5 min at RT, washed again 3 times with PBS and treated with blocking buffer (PBS/0.1 % Tween 20[®], 5 % normal goat serum) for 2h at RT. After blocking, cells were washed once with PBS then incubated overnight at 4°C with affinity-purified rabbit anti-human caspase-3 active (1/100, Cell Signaling Technology). The following day, cells were washed twice with PBS, twice with PBS/0.1 % Tween 20[®] and twice with PBS. Cells were treated with goat anti-rabbit IgG conjugated with AlexaFluor-488 (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc) for 2 hours at RT protected from light and finally washed twice with PBS. The Hoechst dye (stock 7.5 mg mL⁻¹) was added to the last wash, dilution 1/1000 and incubated for 10 minutes then washed 3 times (5 min) with PBS/0.1 % Tween 20[®]. Slides were finally examined under a Carl Zeiss confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 880, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Analysis of the recorded images was carried out by using the Fiji software (NIH Image, Bethesda, MD, USA).

4- Time-lapse imaging of zebrafish embryos

Casper zebrafish embryos with homogeneous MDA-MB-231-Luc-RFP xenografts were chosen for time-lapse imaging. Two groups of xenografted embryos were injected in the caudal vein with the CADY/siCtrl-cy5 and Y-CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles respectively. Immediately, the injected embryos were anesthetized with 0.02 % tricaine to prevent embryo twitching. The embryos were then embedded in 0.5% agarose in embryo medium² and viewed with ANDOR confocal spinning disk on an inverted NIKON microscope (Ti Eclipse). The embryos were imaged each five minutes during five hours with 33 Z-stacks (1,357 μm /each). The obtained images were then processed with the Imaris 9.2 software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

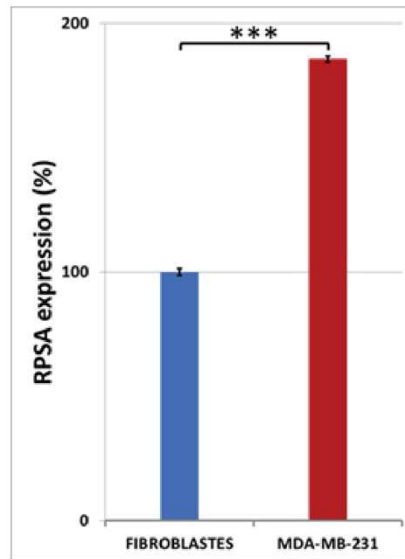


FIGURE S1: In-cell ELISA analysis of 37/67 kDa LR expression in normal fibroblasts and in MDA-MB-231 cancer cells. 37/67 kDa LR expression in fibroblasts is arbitrarily fixed as 100%. The results correspond to the average of 3 separates experiments. *** $p < .001$.

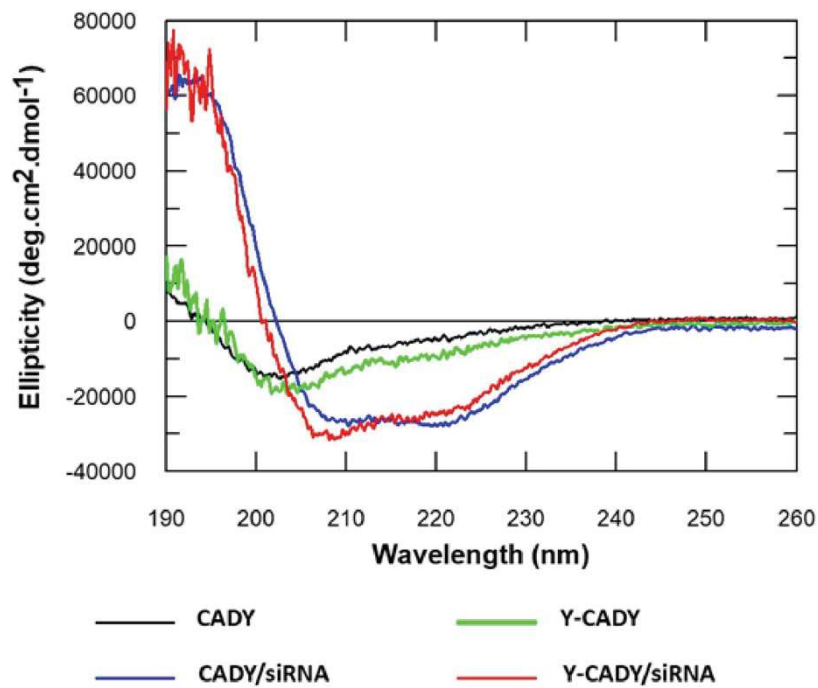


FIGURE S2: The CD spectra of CPP/siRNA complexes were also recorded after 3h incubation at 25°C. Mean molar ellipticity per residues is expressed in $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

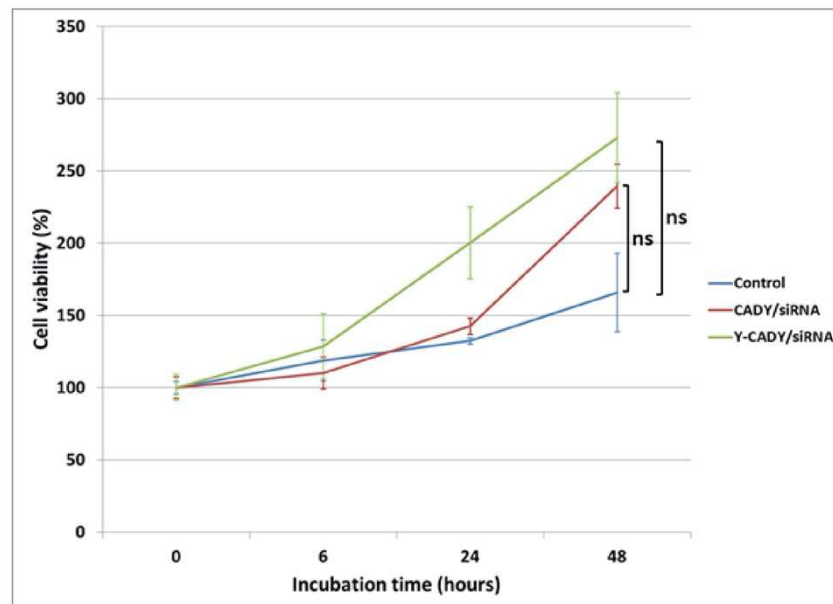


FIGURE S3: Proliferation of HeLa cells treated with CPP/siCtrl nanoparticles assessed by crystal violet. The CPP/siRNA nanoparticles did not interfere with cell proliferation. ns: no significant.

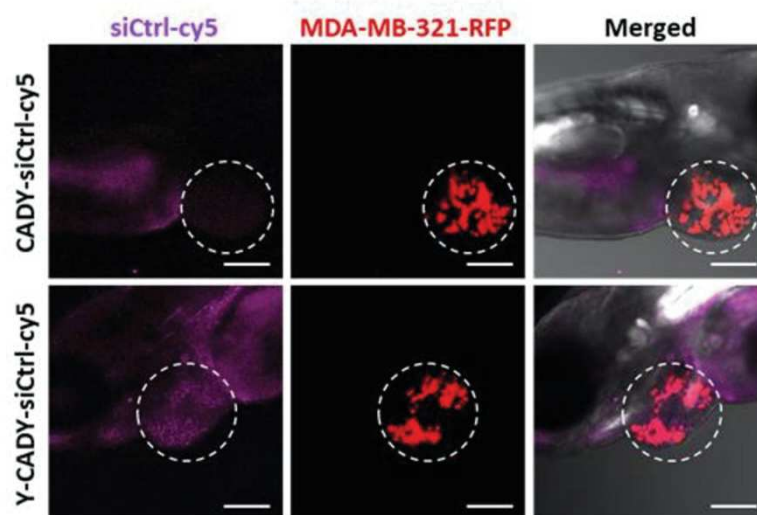


Figure S4: Tumor targeting and therapeutic efficacy of Y-CADY/siCtrl nanoparticles *in vivo*. The zebrafish embryos injected with human MDA-MB-231-Luc-RFP cancer cells and the intravenous injections of CPP/siCIAP1-cy5 were followed by confocal imaging. Near-infrared (NIR) imaging of the xenograft targeting (red) by CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles (magenta, upper panel) and by Y-CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles (magenta, lower panel). Bars represent 200 μm .

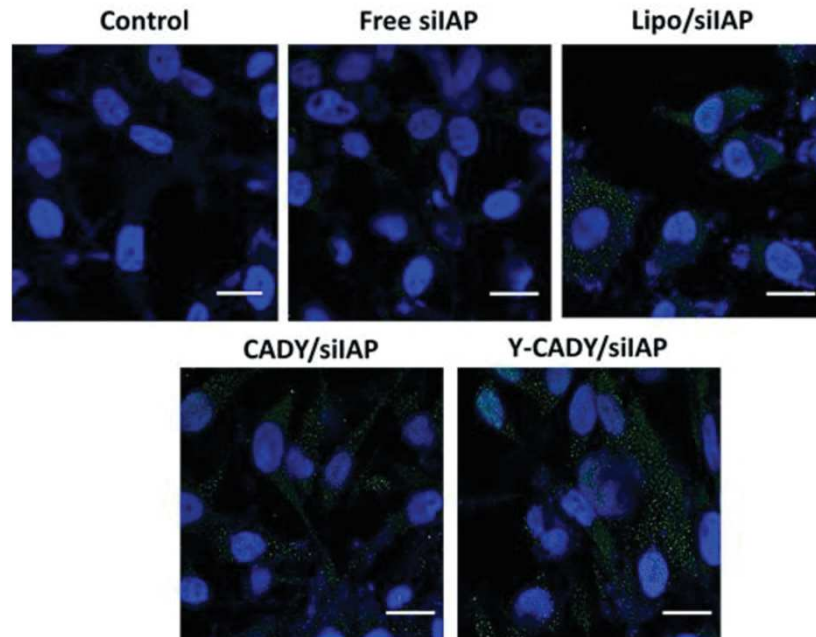


FIGURE S5: Immunofluorescent images of activated caspase-3 protein in MDA-MB-231 cells. Compared with the control (Ctrl), caspase-3 immunofluorescence is increased in the cytoplasm of cells transfected with Lipofectamine/siAP (Lipo/siAP1) and in cells treated with CADY/siAP1 and its targeting analog Y-CADY/siAP1 nanoparticles. Bars represent 20 μ m.

Supplementary Video 1. Representative time lapse confocal movie showing the phase contrast and the fluorescence of the MDA-MB-231-RFP-Luc cells xenograft in the peri-vitelline space of Casper zebrafish embryo and the CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles injected in the caudal vein. Images were taken every 5 minutes for 5 hours.

Supplementary Video 2. Representative time lapse confocal movie showing the phase contrast and the fluorescence of the MDA-MB-231-RFP-Luc cells xenograft in the peri-vitelline space of Casper zebrafish embryo and the Y-CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles injected in the caudal vein. Images were taken every 5 minutes for 5 hours.

Supplementary Video 3. Representative time lapse confocal movie showing only the fluorescence of the MDA-MB-231-RFP-Luc cells xenograft in the peri-vitelline space of Casper zebrafish embryo and the CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles injected in the caudal vein. Images were taken every 5 minutes for 5 hours.

Supplementary Video 4. Representative time lapse confocal movie showing only the fluorescence of the MDA-MB-231-RFP-Luc cells xenograft in the peri-vitelline space of Casper zebrafish embryo and the Y-CADY/siCtrl-cy5 nanoparticles injected in the caudal vein. Images were taken every 5 minutes for 5 hours.

References

1. Gillies, R. J.; Didier, N.; Denton, M., *Analytical biochemistry* **1986**, 159 (1), 109-13.
2. Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 3rd ed. . Univ. of Oregon Press Eugene **1995**

3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons décrit et mis au point un nouveau vecteur efficace pour la thérapie génique, en greffant le pentapeptide YIGSR au peptide amphipathique secondaire CADY, afin de cibler les cellules du cancer du sein surexprimant le LR 37 / 67 kDa. Notre travail suggère clairement que la surexpression du récepteur laminine pourrait être un biomarqueur du développement du cancer du sein et également une cible thérapeutique prometteuse permettant de démontrer le potentiel du nouveau vecteur ciblant le récepteur laminine pour le traitement du cancer.

Mon travail a permis de valider le potentiel de vectorisation ciblé du siRNA par l'utilisation de ce peptide fonctionnalisé « Y-CADY ». Comme nous l'avons discuté précédemment, Y-CADY était significativement plus puissant et efficace dans l'inhibition de gène spécifique *in vitro* et surtout *in vivo*. Ainsi, nous supposons que l'activation du mécanisme apoptotique dans les xénogreffes est la résultante de i) l'effet inhibiteur spécifique de siIAP grâce à la reconnaissance spécifique du peptide YIGSR à son récepteur, ii) de la présence multivalente du peptide de ciblage YIGSR obtenue sur les complexes CPP/siRNA formés à un ratio de 20/1. En effet, des travaux précédents du groupe de Divita ont montré que les complexes CADY/siRNA s'auto-associent dans une structure de type « Raspberry ou framboise » dans laquelle chaque « grain de framboise » est constitué d'un complexe unique de 20 peptides pour 1 siRNA [424]. De plus, les travaux de Nomizo *et al.* ont montré que leur peptide synthétique ramifié multimérique contenant 16 unités de YIGSR (Ac-16Y) permet d'inhiber la croissance tumorale et les métastases par un effet anti-angiogénique [425].

Ainsi, cette nouvelle approche de vecteur ciblé permet d'ouvrir une voie vers de nouvelles stratégies de thérapie génique anti-cancéreuse.

Chapitre II : Stapled peptides pour la délivrance du siRNA

Pour cette deuxième partie de ma thèse, nous avons travaillé sur une nouvelle génération de CPP appelé « stapled peptides » ou « peptide agrafé » pour la vectorisation du siRNA. Cette étude est issue d'une étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Muriel Amblard de l'IBMM dont le travail a abouti à une publication dans laquelle je suis co-premier auteur [426].

1. Contexte et objectifs

Pour cette étude, plusieurs « stapled » peptide ont été synthétisés par le Dr. Matthieu Simon de l'équipe du Dr. Muriel Amblard dans le but d'étudier leur capacité de délivrance de siRNA pour le traitement du cancer.

L'utilisation des peptides dans le domaine pharmacologique présente plusieurs avantages : ils présentent une absorption systémique rapide et permettent le transport de plusieurs molécules thérapeutiques vers la cellule cible. Cependant, ils se heurtent souvent à des problèmes majeurs de stabilité et de dégradation par protéases. Pour cela, il a été démontré que le repliement hélicoïdal de ces peptides améliore leur stabilité ainsi que leur délivrance cellulaire. En effet, comme nous l'avons présenté dans notre première étude (cf. Publication N°1) les CPP comme le CADY adoptent une conformation hélicoïdale lorsqu'ils interagissent avec les siRNA et les membranes biologiques.

Plus récemment, il a été démontré que les contraintes conformationnelles des peptides amphipathiques, par multi-cyclisation ou introduction de résidus α , α -di-substitués dans la séquence en tant que promoteurs hélicoïdaux, peuvent augmenter leur internalisation cellulaire [427], [428]. Dans cette étude, nous avons décidé d'élargir et d'explorer davantage le domaine des peptides structurés. Ainsi, afin d'induire le repliement du peptide en une hélice α biologiquement active, notre stratégie s'est basée sur l'introduction d'un « Staple » entièrement hydrocarbonée dans la séquence peptidique. La technique du « peptide stapling » peut stabiliser la structure α -hélicoïdale, l'affinité de liaison, la résistance à la protéolyse et surtout, favoriser l'internalisation cellulaire [316].

2. Aperçu des principaux travaux

En se basant sur les travaux du groupe Yu qui démontrent l'encapsulation et l'internalisation efficace de siRNA par des stapled peptides hydrocarbonés cationiques riches en histidine [322], nous avons préparé quatre stapled peptides fluorescents amphipathiques (JMV 6337, JMV6580, JMV6582 et JMV6583) de moins de 10 acides aminés et qui sont contraints à avoir une structure α -hélicoïdale. Ces peptides se différencient en fonction de leur nombre de charges positives ainsi que leur composition en acides aminés (présence ou absence de cystéine par exemple) (Figure 1c de l'article).

Dans ce travail, j'ai étudié premièrement la biocompatibilité et le potentiel d'internalisation cellulaire des stapled peptides seuls par des analyses de cytotoxicité et des mesures de fluorescence. En effet, les résultats de cytotoxicité ont montré que tous les stapled peptides synthétisés sont biocompatibles sauf pour le composé JMV6337 qui présente une cytotoxicité élevée (jusqu'à 92% de mortalité cellulaire à 20 μ M de concentration) sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 (Figure 2a de l'article). L'absence de cytotoxicité des autres peptides (JMV6580, JMV6582 et JMV6583) peut être expliquée par la présence de la cystéine à leur extrémité C-terminale qui peuvent former des liaisons disulfures comme le décrit le groupe de Fant [429]. En effet, le peptide (JMV6337) est le seul peptide du lot testé qui ne présente pas de cystéine à l'extrémité C-terminale.

Les résultats d'internalisation cellulaire montrent que les stapled peptides non cytotoxiques sont plus efficaces que le peptide linéaire non agrafé : JMV6579 ainsi que le peptide contrôle de référence : la pénétratine. En effet, les trois stapled peptides (JMV6580, JMV6582 et JMV6583) ont montré une internalisation plus élevée que la pénétratine d'un facteur supérieur à 3 (Figure 2b de l'article). Cette capacité d'internalisation et leur caractère cationique nous suggèrent leur potentielle utilisation en tant que vecteurs de délivrance de siRNA. Pour cela, j'ai étudié la capacité d'encapsulation du siRNA par électrophorèse sur gel d'agarose et caractérisé les complexes formés par des mesures de taille et de charge. Les résultats ont montré (Figure 3 de l'article) :

- Une complexation complète du siRNA par les stapled peptides avec un ratio de charge N/P=5 pour JMV6582 et N/P = 2 pour JMV6580 et JMV6583). La valeur N/P correspond au rapport des charges positives apportées par l'amine contenue dans les peptides aux charges négatives apportées par les phosphodiesteres de siRNA.

- Une taille et une charge positive adaptée à l'internalisation cellulaire pour le complexe JMV6582 /siRNA.

Par la suite, nous avons étudié le potentiel de vectorisation du siRNA *in vitro* par des expériences de microscopie confocale et quantifié l'efficacité de transfection par des mesures d'activité luciférase. Les résultats d'imagerie confocale sur la lignée cellulaire HeLa nous montrent que les trois stapled peptides pénètrent dans les cellules et sont capables de délivrer le siCtrl-Cy5 dans le cytoplasme après 4 h d'incubation (Figure 4 de l'article). De plus, les résultats obtenus avec l'activité luciférase ont montré que les trois complexes stapled peptides/siLuc inhibaient efficacement l'activité de la luciférase de manière dose-dépendante sur les cellules MDA-MB-231-Luc-RFP et plus particulièrement le complexe JMV6582/siLuc qui avait une action plus importante avec une inhibition maximale de 89 % d'activité luciférase, à une concentration siLuc de 200 nM (Figure 5 de l'article). Ceci constitue un des rares exemples de petits peptides (8 acides aminés avec uniquement 2 charges cationiques) pouvant complexer le siRNA avec une bonne efficacité d'internalisation cellulaire et d'inhibition de gène.



Article

Hydrocarbon-Stapled Peptide Based-Nanoparticles for siRNA Delivery

Matthieu Simon ^{1,†,‡}, Nabila Laroui ^{1,‡}, Marianne Heyraud ¹, Guillaume Laconde ¹, Lamiaa M. A. Ali ^{1,2}, Kevin Bourbiaux ¹, Gilles Subra ¹, Lubomir L. Vezekov ¹, Baptiste Legrand ¹, Muriel Amblard ^{1,*} and Nadir Bettache ^{1,*}

¹ IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, 34093 Montpellier, France; matthieusimon.work@gmail.com (M.S.); nabila.laroui@etu.umontpellier.fr (N.L.); marianneheyraud@hotmail.fr (M.H.); guillaumelaconde@gmail.com (G.L.); lamiaa.ali@umontpellier.fr (L.M.A.A.); kevin.bourbiaux@gmail.com (K.B.); gilles.subra@umontpellier.fr (G.S.); lubomir.vezekov@enscm.fr (L.L.V.); baptiste.legrand@umontpellier.fr (B.L.)

² Department of Biochemistry, Medical Research Institute, University of Alexandria, Alexandria 21561, Egypt

* Correspondence: muriel.amblard@umontpellier.fr (M.A.); nadir.bettache@umontpellier.fr (N.B.)

† Present address: IRMB, CARTIGEN, CHU de Montpellier, 34090 Montpellier, France.

‡ These authors contributed equally to this work.

Received: 16 October 2020; Accepted: 21 November 2020; Published: 25 November 2020



Abstract: Small interfering RNAs (siRNAs) are promising molecules for developing new therapies based on gene silencing; however, their delivery into cells remains an issue. In this study, we took advantage of stapled peptide technology that has emerged as a valuable strategy to render natural peptides more structured, resistant to protease degradation and more bioavailable, to develop short carriers for siRNA delivery. From the pool of stapled peptides that we have designed and synthesized, we identified non-toxic vectors that were able to efficiently encapsulate siRNA, transport them into the cell and induce gene silencing. Remarkably, the most efficient stapled peptide (JMV6582), is composed of only eight amino-acids and contains only two cationic charges.

Keywords: CPP; Stapled peptides; siRNA; gene silencing

1. Introduction

Small interfering RNA (siRNA) represents an interesting class of molecules that specifically target and downregulate their mRNA and the corresponding expressed proteins. The ability of siRNAs to “switch off” specific genes makes them attractive to develop new highly specific therapies. Unfortunately, siRNAs are anionic molecules that are unable to cross the cell membrane by themselves because of electrostatic repulsion with the anionic phospholipids of the biological membranes. Furthermore, naked siRNA molecules are rapidly degraded by serum RNases, preventing their direct blood injection as therapeutic treatment [1,2]. Thus, one of the main current challenges to develop siRNA therapies is to improve their delivery into the cytosol while preventing their degradation. Indeed, many different siRNA delivery systems have been investigated such as viral vectors, liposomes, micelles, polymeric nanoparticles, and cell penetrating peptides (CPPs) [3–5]. In this study, we focused on the last group of cargo carriers, CPPs, which represent short peptides composed of less than 30 amino acids. CPPs are often amphipathic oligomers with positively charged residues (arginine or lysine), allowing them to enter into the cell and drive the internalization of a wide range of bioactive cargos such as nanoparticles, RNA, proteins or cytotoxic agents. In most cases, the cell delivery of such peptides is improved by their folding, as it was previously observed for some CPPs that naturally adopt a helical fold when

they interact with the biological membranes [3–8]. More recently, it has been demonstrated that conformational constraints of amphipathic peptides, through multicyclization [9,10] or introduction of α , α -disubstituted residues in the sequence as helical promoters [11,12], can dramatically increase their cellular uptake.

Therefore, in this study we decided to further expand and explore the domain of structured cell penetrating peptide by designing and synthesizing helical peptides for cytosolic delivery. However, the amino acid sequence of natural peptides, even if similar to a natural protein helix, is not sufficient to allow its proper α -helix folding. One strategy to overcome this entropic penalty and induce peptide folding into a biologically active α -helix is the introduction of an all-hydrocarbon staple in the peptide sequence, through ring-closing metathesis (RCM) reaction [13–15]. This stapling system, further developed by the Verdine and Walensky groups [16–22], has been shown to significantly increase α -helical content in short peptide sequences, binding affinity, resistance to proteolysis and importantly to promote efficient cellular uptake [17,20]. The stapled peptide strategy is currently considered as the “gold standard” [23] to stabilize an α -helix and turn a peptide into a biologically active molecule. It allowed the emergence of a new class of biomolecules as suitable pharmacological drug candidates [21,24–28]. A recent publication by the group of Jaehoon Yu provided an elegant proof of concept for the siRNA encapsulation and internalization by Histidine rich cationic stapled peptides [26].

In this study, by taking advantage of the property of hydrocarbon-stapled peptide to internalize into cells, short α -helical peptide sequences were carefully designed and synthesized. After confirmation of their helical folding, we demonstrated their ability to transport efficiently a fluorophore inside the cells without cytotoxicity. Next, we investigated the capacity of these short α -helical peptides to deliver siRNA molecules, as a highly relevant biological cargo. We were able to efficiently encapsulate siRNA and induce gene silencing in the nanomolar range with a short helical stapled peptide, possessing only eight amino-acids and two cationic charges.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Reagents

All reagents and solvents were obtained from commercial sources and were used without further purification. Analytical HPLC analyses were run on an Agilent Technology 1220 Infinity LC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 × 4.6 mm, 5 μ m) with a gradient from 100% (H₂O/TFA 0.1%) to 100% (CH₃CN/TFA 0.1%) in 5 min; flowrate 4 mL/min; UV detection at 214 nm (conditions B). LC/MS analyses were recorded on a Quattro micro ESI triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with a Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 × 4.6 mm, 5 μ m) and an Alliance HPLC System (Waters, Milford, MA, USA); gradient from 100% (H₂O/HCO₂H 0.1%) to 100% (CH₃CN/HCO₂H 0.1%) in 3 min; flowrate 3 mL/min; UV detection at 214 nm. High-Resolution Mass Spectrometric analyses were performed with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) fitted with an electrospray ionization source (ESI) in positive ion mode.

The different siRNA sequences are for anti-firefly luciferase (siLuc): 5'-CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT-3' (sense strand), and 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (anti-sense strand) and for siRNA without biological activity, used as control (siCtrl): 5'-CGUACGCGGAAUACUUCG AdTdT-3' (sense strand) and 5'-UCGAAGUAUCCGCGUACG dTdT-3' (anti-sense strand), and the cy5-labelled control siRNA (siCtrl-cy5) were purchased from Eurogentec (Serring, Belgium).

Lipofectamine RNAiMAX reagent was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Luciferin was purchased from Promega (Charbonnières-les-bains, France). Cell viability reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2. Synthesis and Purification of Peptides and Stapled Peptides

Solid phase peptide synthesis was performed on an Amphispheres® (Agilent, Santa Clara, CA, USA) Rink Amide resin loaded at 0.38 mmol/g using Fmoc/t-Bu chemistry. First, resin was soaked in Dichloromethane (DCM) (Sasu Carlo Erba reagents, Val de Reuil, France) for 10 min and filtered. For each coupling reaction, 5 equivalents (eq.) of Fmoc-Amino Acid, 5 eq. of Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium (HATU) and 10 eq. of *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) were added to a fritted reaction vessel and stirred in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (2 × 5 min at r.t.). For the coupling of olefinic amino acid, 3 eq. of Fmoc-(S)-pentenylalanine, 3 eq. of HATU and 5 eq. of DIEA were added to the reactor and stirred in DMF (2 × 30 min). Deprotection of the Fmoc group at the N-terminus was performed using a 20% piperidine/DMF (Sasu Carlo Erba reagents, Val de Reuil, France) solution (2 × 5 min at r.t.). After each coupling and deprotection steps, resin was washed three times with DMF. After removal of the Fmoc group of the 6-(Fmoc-amino)hexanoic acid linker (Ahx), peptides were labelled by using 2 eq. of fluorescein isothiocyanate and 4 eq. of DIEA in DMF and stirred for 3 h.

Ring closing metathesis was directly performed on the solid support for peptides containing (S)-pentenylalanine residues in their sequence by using 0.4 eq. of Grubbs catalyst (first generation) in 1,2 dichloroethane, under inert atmosphere (stirred 2 × 2 h at r.t.), then resin was washed with 3 × DCM, 3 × DMF, 3 × DMF.

Peptides were then cleaved from the resin with a TFA/TIS/H₂O 95/2.5/2.5 v/v solution (2 × 90 min at r.t.). Resins were washed (1 × DCM, 1 × TFA, 1 × DCM) and filtrates were evaporated under reduced pressure. Compounds were precipitated by addition of 50 mL of diethyl ether (Sasu Carlo Erba reagents, Val de Reuil, France) and centrifuged (3000 rpm, 20 min). Crude peptides were then solubilized in acetonitrile/water 1/1 v/v solution and purified by preparative RP-HPLC (Waters, Milford, MA, USA) on a Waters system controller equipped with a C18 Waters Delta-Pack column (100 × 40 mm, 100 Å); flowrate 50 mL/min; UV detection at 214 nm using a Waters 486 Tunable Absorbance Detector and a linear gradient of A = H₂O (0.1% TFA) and B = CH₃CN (0.1% TFA). Peptides were recovered as TFA salts. Final compound purity was assessed by LC-MS analysis.

2.3. Circular Dichroism (CD) and Determination of Helical Content

Circular dichroism experiments were carried out using a Jasco J815 spectropolarimeter. Spectra (Jasco, Easton, MD, USA) were typically recorded with 100 μM of peptides dissolved in a water/TFE mixture (95/5), pH 7, using a 1 mm pathlength CD cuvette at 20 °C, over a wavelength range of 190–260 nm. The peptide concentrations were normalized measuring the OD at 490 nm considering a molar coefficient extinction (ϵ_{490}) for the FITC of 76,900 cm⁻¹ M⁻¹. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.1 nm steps and a bandwidth of 2 nm. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two scans. Baseline was corrected by subtracting the background from the sample spectrum. Alpha helical content was determined using the following equation: % Helix = ($[\theta]$)_{obs} × 100 / (-39,500 × (1 - 2.57/n)), where ($[\theta]$)_{obs} is the mean residue ellipticity at 222 nm and n the number of peptide bonds [28].

2.4. Gel Retardation Assay

In RNase free water, a fixed concentration, 100 picomoles, of siCtrl was mixed with the appropriate amounts of stapled peptide in order to reach an amine-phosphate (N/P) ratio of 2, 5, 10, and 20. Blue 6X loading dye (Fisher Scientific) was added to the mixture. Electrophoresis was carried out on a 2% w/v agarose gel mixed with GelRed™ nucleic acid gel stain (Interchim, Montluçon, France) in 1X TBE buffer (90 mM Tris-borate/2 mM EDTA, pH 8.2). The gel was run in 0.5X TBE at 50 V for 1 h. A 100 bp DNA ladder from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, S4 France) was used as a reference for the gel. The GelRed-stained siRNA was visualized using a TFX-20 M model-UV transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and gel photographs were obtained with a smartphone camera

2.5. Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential Measurements

The stapled peptides/siRNA complexes were prepared using siCtrl as previously described to achieve the desired N/P ratio, and then were diluted in glucose 5%. Measurements were performed immediately after the complexes formation using Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) with transparent ZEN0040 disposable micro-cuvette at 25 °C. For Zeta potential analyses, complexes were prepared as previously described and then diluted in glucose 5% and NaCl (5 mM, pH = 7.0) to obtain a final volume of 1 mL. Measurements were performed using Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern, UK) and DTS 1070 zeta potential cells (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) at 25 °C. Three measurements were made with 12 runs for each.

2.6. Cell Culture

Human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231, ATCC[®] CRM-HTB-26[™]) cell line and HeLa human cervix cancer cells (ATCC[®] CCL-2[™]) were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). MDA-MB-231-Luc-RFP stable cell line was obtained from AMSBIO (SC041, Abingdon, UK). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and gentamycin (0.05 mg mL⁻¹) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.7. Cell Viability (MTT) Assay

MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) assay was performed to evaluate the cell viability [29]. Briefly, 2000 cells were seeded into a 96 multi-well plate in 200 µL complete culture medium. Twenty four hours after seeding, increasing concentrations (from 0 to 20 µM) of stapled peptides were added to cells with or without an excess of 10 equivalent of Dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich Chimie Sarl, Saint Quentin Fallavier, France) (from 0 to 200 µM) for 72 h. Cells treated with the vehicle were considered as a control. After this incubation, cells were treated for 4 h with 0.5 mg mL⁻¹ of MTT in media. The MTT/media solution was then removed and the precipitated crystals were dissolved in EtOH/DMSO (1:1). The solution absorbance was read at 540 nm. The percentage of viable cells were calculated according to the following equation (Ab test/Ab control × 100).

2.8. Cellular Uptake of FITC-Stapled Peptides

MDA-MB-231 cells were seeded in black 96-well plate in 200 µL of their corresponding medium. After 24 h of cell growth, cells were treated with 5 µM concentration of FITC-stapled peptides for 4 h. Total fluorescence (TF) was measured using CLARIOstar[®] High Performance Monochromator Multimode Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at excitation/emission of 483-14/530-30 nm. Cells were washed three times with PBS and remaining fluorescence (RF) was measured using the same conditions. The percentage of uptake values were presented as relative mean fluorescence and normalized with respect to Penetratin used as a standard control and set at 100%.

2.9. Imaging

One day prior to the experiment, HeLa cells were seeded into 12 well plate containing an 18 mm diameter glass coverslip (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) at a density of 2000 cells cm⁻² in their corresponding medium. Twenty-four hours after cell growth, adherent cells were washed once with DPBS and incubated in 1 mL culture medium containing complex stapled peptides/siCtrl-cy5 (100 nM concentration of siRNA) at N/P = 5 for JMV6582 and N/P = 2 for JMV6580 and JMV6583, stapled peptides alone, Lipofectamine/siCtrl-cy5 (50 nM) and siCtrl-cy5 alone (100 nM) for 4 h. After incubation, adherent cells were washed and fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA). Prior to the microscopic observation, cells were washed gently 3 times with DPBS, then incubated with DPBS containing CellMask[™] orange plasma membrane stain (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

and Hoechst 33,342 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at a final concentration of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively for 15 min. Cells were washed twice then were visualized with a Zeiss LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Microscope, France) at 649 nm for siCtrl-cy5, 488 nm for stapled peptide, 561 nm for cell membranes and 360 nm for Hoechst 33342 at high magnification (40×/1.4 OIL Plan-Apo).

2.10. Cell Luciferase Assay

MDA-MB-231-Luc-RFP cells were seeded at a density of 2000 cells per well in 96-well white opaque tissue culture plates in 200 μL of phenol red free DMEM medium. Twenty four hours after, cells were washed with PBS and incubated with stapled peptide/siLuc complex formulations at the appropriate N/P ratio with the siLuc concentrations of 50, 100, and 200 nM at 37 °C for 4 h. Thereafter, 50 μL of 40% serum containing medium was added to reach the concentration of 10% serum and a final volume of 200 μL . Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was used as the positive control transfection reagent following the manufacturer's protocol. Three days after transfection, expression of luciferase was assessed by addition of luciferin (10^{-3} M, final concentration) into culture medium. After 10 min, living cell luminescence was measured using a plate reader CLARIOstar® (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 562 nm and were averaged from triplicates. The percentage of luminescence of treated cells was calculated by using the control cell as 100%. Each assay was repeated three times. Luciferase activity was normalized in accordance to the total number of living cells in each sample as determined by the MTT assay as previously described.

2.11. Statistical Analysis

Each assay was repeated three times. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The comparison between groups was analyzed with Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05 ($p < 0.05$). The level of significance was defined at ns (not significant), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3. Results and Discussion

3.1. Design, Synthesis, and Characterization of the CPPs

In this study, we focused on the design and selection of short amphipathic peptide sequences (less than 10 amino acids) containing an all-hydrocarbon staple for their ability to efficiently enter into cells and to encapsulate siRNA and translocate them to the cells. To achieve this goal, we have built a series of stapled peptides that incorporated cationic and hydrophobic amino acids, in particular Arg and Ile residues, respectively and that adopted a stable helix structure (Figure 1a). Noteworthy, Arg was preferred to Lys residues due to the stronger interaction of the guanidinium group of the Arg residues with the phospholipid head groups of the biological membranes compared to the amino group of the Lys residues, thus resulting in a better internalization [30]. For the evaluation of the cellular uptake of all peptides, an amino hexanoic acid spacer followed by a fluorescein at their N-terminal extremity was introduced and the well-known CPP Penetratin [31] was also synthesized to be used as a positive control (Figure 1a).

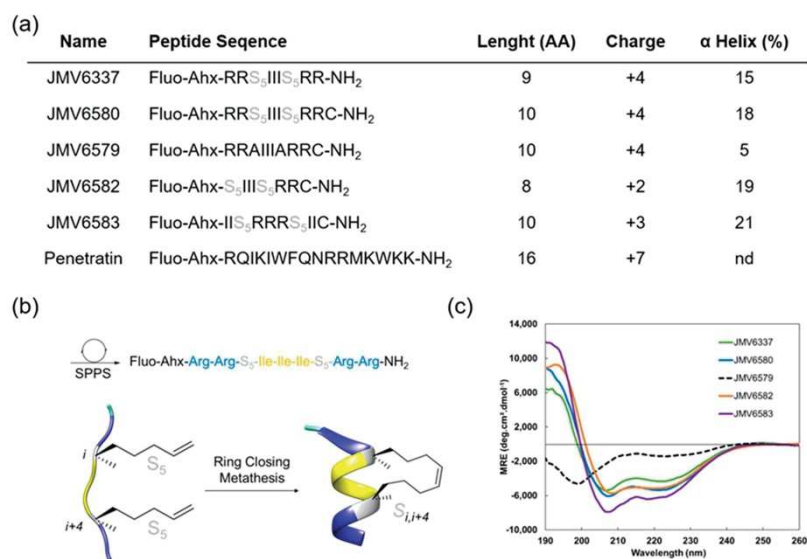


Figure 1. (a) Summary of fluorescent peptides used in this study. (b) Schematic representation of fluorescent stapled peptide synthesis by ring-closing metathesis (JMV6337), S5 corresponds to the (S)-pentenylalanine residue, (c) Overlay of far-UV circular dichroism (CD) spectra of stapled peptides. Experiment were performed at 20 °C in a water/TFE mixture (95/5).

A first stapled peptide, JMV6337 was synthesized. Four arginine residues were introduced in this peptide sequence since it was previously described that best internalization was achieved using stapled peptides with a +3 to +5 formal charge at physiological pH [9]. The hydrophobic part of the peptide was made of a sequence of three isoleucine residues. This sequence was chosen according to the work performed by Matsumoto et al. [32] who showed that the incorporation of a hydrophobic Phe-Phe-Ile or Ile-Ile-Ile sequence increases the potency of their vectors. Even if the sequence Phe-Phe-Ile was shown to be the most effective hydrophobic sequence for internalization, we focused on the Ile-Ile-Ile sequence, in order to prevent steric hindrance between the staple and the phenyl group of the phenylalanine residues.

Finally, in order to induce a stable alpha-helical secondary structure, a property that is given to favor cellular uptake, we introduced a stapling system into the peptide sequence (Figure 1b).

Given the dependence of cell-penetration with helicity but also hydrophobicity, we decided to introduce an all-hydrocarbon stapling according to the Verdine technology [19]. For that purpose, di-substituted amino acid residues were introduced before and after the Isoleucine sequence at positions i , $i + 4$. Several analogues of the peptide JMV6337 were then synthesized (Figure 1a). First, in order to conjugate the stapled peptides to different cargo molecules through thiol-maleimide chemistry, a Cysteine at the C-terminal extremity of JMV6337 was introduced to lead to peptide JMV6580. Then, its corresponding linear analogue JMV6579, with two Ala residues instead of the di-substituted amino acids, was synthesized in order to assess the importance of the staple for the efficiency of this family of molecules in the internalization process and the cellular uptake of siRNA. We also reduced the number of positive-charged residues by synthesizing an analogue that contains only two Arginine residues (JMV6582). Finally, in order to evaluate the impact of reversing the positions of the hydrophobic and hydrophilic parts inside the sequence, we built the reversed peptide JMV6583 by Arginine and Leucine residues. First, Figure 1c showed that the ruthenium-catalyzed, ring-closing olefin metathesis reaction between the two α -methyl, α -alkenyl glycine residues allowed the induction of helical conformation

over the peptide sequences. Indeed, all stapled peptides displayed typical α -helix CD profiles with two negative bands at 208 nm and 222 nm and a strong positive band centered at 195 nm while the linear peptide (JMV6579) remained partially unfolded with two minima at 199 and 226 nm. Despite the short peptide sequences, the incorporation of the hydrocarbon-stapling conferred a significant enhancement of the α -helical content up to 20%.

3.2. Cytotoxicity and Cellular Uptake Studies

In a first instance, cell viability in the presence of stapled peptides was evaluated on human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells for 72 h at different concentrations. Results showed that JMV6579, JMV6580, JMV6582, and JMV6583 had low cytotoxic effect up to 20 μ M concentration, with cell viability values of $83 \pm 5\%$, $75 \pm 6\%$, $88 \pm 6\%$, and $77 \pm 2\%$, respectively (Figure 2a). In contrast, JMV6337 exhibited higher cytotoxicity at 5 μ M with a cell death percentage value of $70 \pm 5\%$. At higher concentration, we observed a drastic increase of cytotoxicity that reached $93 \pm 2\%$ of cell death at 20 μ M.

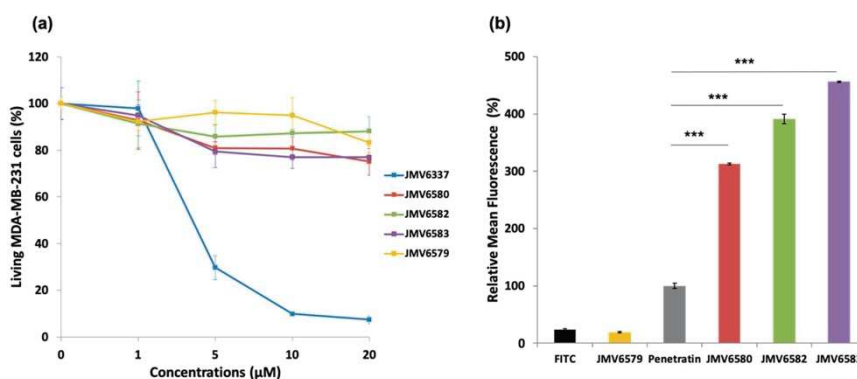


Figure 2. Cytotoxicity and cellular uptake studies of FITC-stapled peptides (a) Cytotoxicity study in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells incubated with increasing concentrations (from 0 to 20 μ M) of the stapled peptides for 72 h. (b) Uptake of FITC-stapled peptides at 5 μ M final concentration in MDA-MB-231 cells after 4 h of incubation represented as relative mean fluorescence. The values are normalized with respect to penetratin. Results are presented as means \pm standard deviations of three independent experiments performed in triplicate.

The difference between the non-cytotoxic stapled peptides (JMV6580, JMV6582, and JMV6583) and the cytotoxic one (JMV6337) is the absence of a Cys residue at the C-terminal extremity of the peptide JMV6337. In order to evaluate whether the absence of cytotoxicity was due to the presence of the cysteine residue, responsible for disulfide bond formation, we assessed the cytotoxicity of the stapled peptides in reducing conditions. As shown in Figure S1 (Supplementary Materials), the stapled peptides containing cysteine were still non cytotoxic even in the presence of a reducing agent (dithiothreitol). As expected JMV6337 remained cytotoxic and its Cys-containing analogue JMV6580 was moderately cytotoxic. This result showed that the absence of cytotoxicity in cysteine-containing stapled peptides cannot be explained by the dimerization of the stapled peptides via disulfide bond formation as shown by Amand et al. [33] but may be related to a difference in their physicochemical properties. According to these results, the stapled peptide JMV6337 was not selected as potential vectors for binding and shuttling siRNA into cells. Nevertheless, this peptide was tested for siRNA complexation and gene silencing activity. Even complexed to siRNA, this peptide is toxic and has no appreciated luciferase inhibitory effect as shown in Figures S2 and S3 respectively (Supplementary Materials).

The ability of the stapled peptides to penetrate cells was assessed using fluorescence emission measurements. MDA-MB-231 cells were incubated with FITC-stapled peptides at 5 μ M concentration for 4 h. Results showed that all stapled peptides tested were more efficiently internalized than the positive control penetratin (Figure 2b). The peptide JMV6583 showed the highest internalization efficiency with $456 \pm 1\%$ relative mean FITC fluorescence compared to $100 \pm 5\%$ of fluorescence obtained by penetratin. The stapled peptides JMV6582 and JMV6580 also showed high internalization with the values of $391 \pm 8\%$ and $313 \pm 2\%$ respectively compared to penetratin internalization. The data showed that all the studied stapled peptides exhibited a good internalization efficiency that was more than 3-fold higher than that of penetratin. The linear peptide JMV6579 was almost not able to enter cells. This result supported that the all-hydrocarbon stapling is a key element for high cellular uptake of this series of molecules.

We then further investigated the ability of the more potent and less toxic stapled peptides, i.e., JMV6580, JMV6582, and JMV6583 to assemble with siRNA and mediate efficient siRNA delivery into cells.

3.3. siRNA Delivery Studies

To validate the hypothesis that the positively charged stapled peptides (from 2 to 4 charges) could potentially complex the negatively charged siRNA, we first studied the complexation of the siRNA with the stapled peptide by agarose shift assay (Figure 3a). This assay was used to follow the complexation state in a charge ratio-dependent manner because siRNA migration into the agarose gel will be prevented by cationic stapled interactions. In this experiment, we used siCtrl and tested different N/P ratios (2, 5, 10, and 20). The results showed that there was no complete shift of the siRNA at N/P ratio of 2 for JMV6582 suggesting an only partial complexation. However, a strong retardation effect was observed with a complete disappearance of the band corresponding to the native siRNA at N/P = 5. In contrast, the compounds JMV6580 and JMV6583 were able to complex siCtrl at N/P = 2. In conclusion, agarose gel assay clearly showed that the three tested stapled peptides have the ability to efficiently complex siRNA.

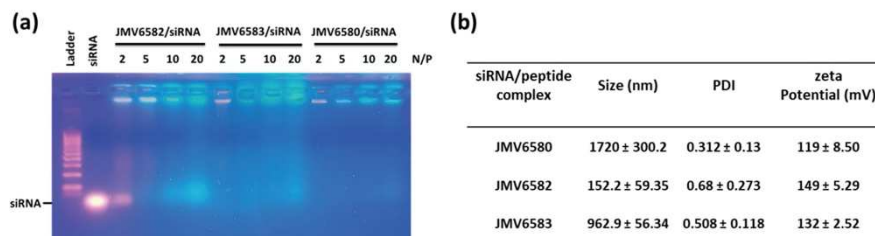


Figure 3. Studies of stapled peptides complexation with siRNA (a) Gel electrophoresis analysis for different stapled peptides at N/P = 2, 5, 10, and 20. (b) Physicochemical characterization (Particle size, polydispersity index (PDI) and ζ -potential measurements) of stapled peptide/siRNA complex at N/P = 2 for JMV6580 and JMV6583, and N/P = 5 for JMV6582. The values are represented as mean \pm SD (n = 3).

The particle size and the charge of the complex are important factors for cellular uptake and nucleic acid delivery. The condensation of siCtrl into nanoparticles, promoted by stapled peptides, was studied by dynamic light scattering experiment at N/P = 5 for JMV6582 and N/P = 2 for JMV6580 and JMV6583. Size and homogeneity were determined for each complex as shown in Figure 3b. DLS measurements revealed that JMV6582 leads to small nanoparticles with a hydrodynamic diameter of 152 ± 59 nm and polydispersity index (PDI) of 0.68 ± 0.27 . However, we observed the formation of much larger particles with the two other compounds JMV6580 and JMV6583 (average diameters were

1720 ± 300 nm and 963 ± 56 nm respectively, with PDI of 0.31 ± 0.13 and 0.51 ± 0.11, respectively). Charge surface of siRNA/stapled peptide complex was also evaluated by zeta potential measurements revealing close values of +119 ± 9, +149 ± 5, and +132 ± 3 mV for JMV6580, JMV6582, and JMV6583 complexes, respectively. The formed complexes are positively charged, which is an important factor for cell entry.

3.4. Cellular Uptake

Cellular uptake of the stapled peptide/siRNA complexes was evaluated in HeLa cells by fluorescence confocal microscopy as shown in Figure 4. The results were compared with those of the siRNA alone (Free siRNA) and the Lipo/siRNA complex. After 4 h of incubation, while the siRNA alone was not able to enter cells, the Lipo/siRNA complex was able to deliver siRNA into cells. Interestingly, the three selected stapled peptides in complex with siCtrl-cy5 were also able to be internalized into the cells (FITC, green staining) and deliver the siCtrl-cy5 into the cytoplasm (siCtrl-cy5, magenta staining). The cellular uptake of the complexes was quantified by flow cytometry and the results showed similar extent of internalization for all the stapled peptide/siRNA complexes (96.65%, 92.24%, and 83.75% for JMV6580/siRNA, JMV6582/siRNA and JMV6583, respectively; Figure S4, Supplementary Materials). The extent of cellular uptake of the stapled peptide/siRNA complexes was slightly different from the cellular uptake of the stapled peptides alone (Figure 2b). The cytosolic localization of the stapled peptides/siRNA complexes is especially interesting for therapeutic applications, due to the large number of potential targets localized in this compartment. Such small peptides constituted attractive molecules for further investigation in the delivery of bioactive siRNA. As a proof of concept, we investigated their efficiency to inhibit the luciferase activity in MDA-MB-Luc-RFP cell line.

3.5. Inhibition of Luciferase Activity in MDA-MB-231-RFP-Luc Cells

As described above and to evaluate the therapeutic potential of these nanovectors for siRNA delivery, we set up experiments using siRNA targeting the expression of luciferase gene in MDA-MB-231-Luc-RFP cells. The results showed that the three stapled peptides/siLuc complexes inhibited luciferase activity in a dose-dependent manner in MDA-MB-231-Luc-RFP cells. (Figure 5). Whereas, both JMV6580/siLuc and JMV6583/siLuc complexes inhibited moderately luciferase activity by 34 ± 9% of and 38 ± 12%, respectively, it is noteworthy that the shortest stapled peptide (JMV6582) with only eight amino-acids and two cationic charges exhibited the highest luciferase inhibition. To test the specificity of the stapled peptides/siRNA complexes to inhibit the luciferase activity, we evaluated the luciferase activity by using a control siRNA (siCtrl). As expected, there is no inhibition of luciferase activity with siCtrl (Figure S5; Supplementary Materials). Importantly, the data showed that all the stapled peptide/siRNA complexes were non-toxic compared to the lipofectamine/siRNA transfection. The efficiency of gene silencing of JMV6582 compared to JMV6580 and JMV6583 may be explained by the difference of the stapled peptide/siRNA particle size. Indeed, the smaller size of JMV6582/siRNA complex (152.2 nm) compared to larger sizes of JMV6580/siRNA and JMV6583/siRNA complexes (1720 nm and 963 nm respectively) is more favorable for transfection efficiency [34].

In consequence, the JMV6582/siRNA formulation has the potential to be further developed as a non-invasive siRNA delivery system since the designed stapled peptides are shown to be non-immunogenic with viable pharmacokinetics and high levels of in vivo stability [35].

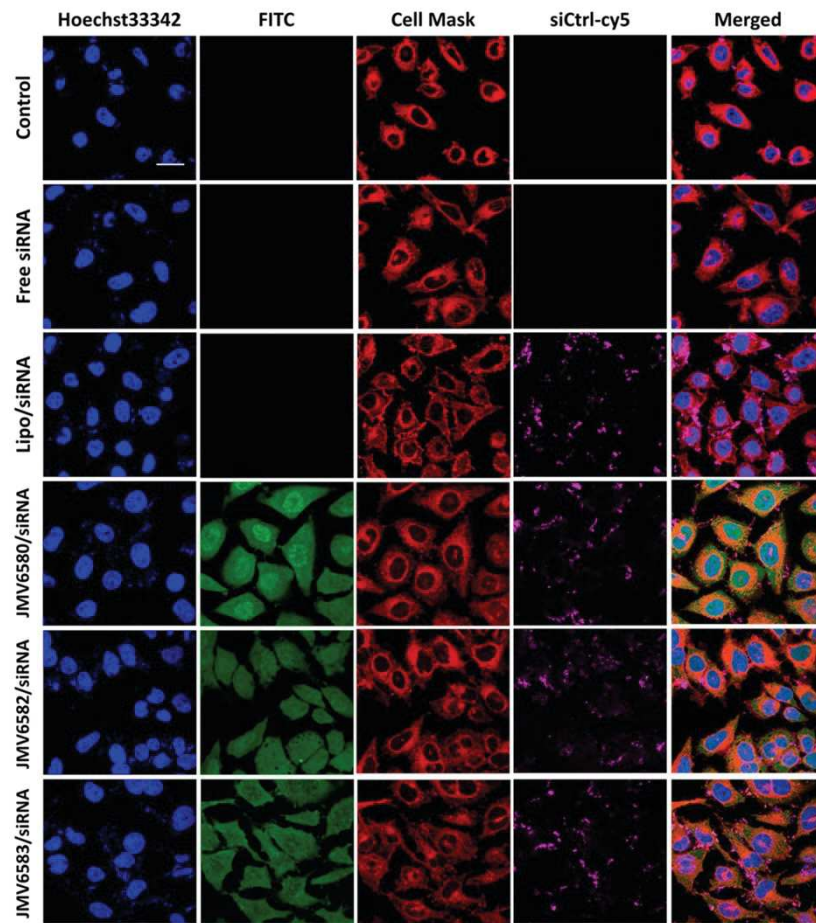


Figure 4. Cellular uptake of stapled peptides/siRNA complexes in HeLa cells visualized by fluorescence confocal microscopy. From the top to the bottom respectively: Untreated cells, cells incubated with 100 nM of siCtrl-cy5, cells incubated with the lipofectamine/siCtrl-cy5 complex at 50 nM, and finally cells incubated with the complex formed between stapled peptides (JMV6580, JMV6582 and JMV6583 respectively) and siCtrl-cy5 (100 nM) at N/P = 2 for JMV6580 and JMV6583, and N/P = 5 for JMV6582. The blue fluorescence indicates the nuclei, stapled peptides appear in green color, cell mask appears in red color, siCtrl-cy5 appears in magenta color. Scale bar = 20 μ m.

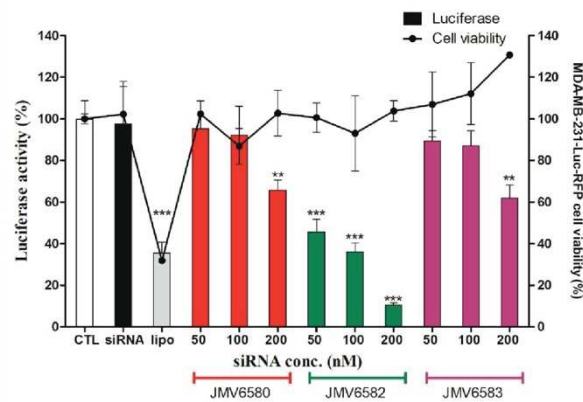


Figure 5. Luciferase activity assay showing the transfection of a 21-mer small interfering RNAs (siRNAs) targeting the expression of luciferase inside MDA-MB-231-Luc-RFP cells. The experiments were carried out with increasing amounts of siLuc (from 50 to 200 nM) complexed with the stapled peptides. The corresponding concentrations of the peptides are from 1.05 μ M to 4.2 μ M for JMV6580, from 1.4 μ M to 5.6 μ M for JMV6583 and from 5.25 μ M to 21 μ M for JMV6582. For lipofectamine transfection, the siRNA concentration used is 50 nM. In parallel, cell viability was measured for each condition. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Statistically different, the level of significance was defined ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

4. Conclusions

In this study, we have designed and synthesized stapled peptides for the delivery of siRNA into cells. These peptides are no longer than 10 amino acids, they contain only 2 to 4 positively charged amino acids and, except for JMV6337, they contain a C-terminal Cys residue. Surprisingly, this latter peptide exhibited a high toxicity. Our study revealed that all the Cys-containing stapled peptides (JMV6580, JMV6582, and JMV6583) were efficiently internalized into cells. As expected, the data showed that the linear peptide JMV6579 failed to enter cells, supporting the importance of the secondary helical structure for efficient cellular uptake of this family of compounds. Then, we demonstrated that these three stapled peptides were capable of complexing siRNA and forming positively charged nanoparticles of different sizes, leading to the translocation of luciferase siRNA. These conditions favor membrane interactions leading to their internalization inside cells. Indeed, the cell-internalized complexes are efficient to target the selected gene and to inhibit its expression. Remarkably, the most efficient stapled peptide JMV6582 is composed of only eight amino-acids and two cationic charges that constitutes to our knowledge, the smaller peptide that was capable to form non-covalent complexes with siRNA and inhibit the luciferase gene expression with a good efficiency.

Finally, although we used siRNA targeting luciferase to explore the efficacy of this novel delivery system, our results open the way for the use of stapled peptide vectors as relevant siRNA targeting genes involved in several diseases including cancer.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4991/10/12/2334/s1>. Figure S1: Cytotoxicity study; human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells were incubated with increasing concentrations (from 0 to 20 μ M) of the stapled peptides and an excess of 10 equivalents of DTT (from 0 to 200 μ M), respectively, for 72 h. Results are presented as means \pm standard deviations of three independent experiments performed in triplicate, Figure S2: JMV6337 stapled peptide complexation with siRNA monitored by agarose gel electrophoresis analysis at N/P = 2, 5, 10 and 20, Figure S3: Luciferase activity assay showing the transfection of a 21-mer siRNA targeting the expression of luciferase inside MDA-MB-231-Luc-RFP cells. The experiments were carried out with increasing amounts of siLuc (from 50 to 200 nM) complexed with the JMV6337 stapled peptide at N/P = 2. The corresponding concentrations of the JMV6337 are from 1.05 μ M to 4.2 μ M, Figure S4: Cellular uptake quantified by flow cytometric analysis of MDA-MB-231 cells treated with stapled peptide/siRNA

complexes. MDA-MB 231 cells alone (upper left), cells incubated with the complex formed between JMV6580 and siCtrl-cy5 at N/P = 2 (upper right), cells incubated the complex formed between JMV6582 and siCtrl-cy5 at N/P = 5 (lower left) and finally, cells incubated with the complex formed between JMV6583 and siCtrl-cy5 at N/P = 2 (lower right). Numbers in the profiles indicate the percentage of cells present in this area, Figure S5: Luciferase activity assay showing the transfection of a non-targeting 21-mer siRNA inside MDA-MB-231-Luc-RFP cells. The experiments were carried out with increasing amounts of siCtrl (from 50 to 200 nM) complexed with the stapled peptides. The corresponding concentrations of the peptides are from 1.05 μ M to 4.2 μ M for JMV6580, from 1.4 μ M to 5.6 μ M for JMV6583 and from 5.25 μ M to 21 μ M for JMV6582. The concentration of the siCtrl used in Lipofectamine condition is 50 nM.

Author Contributions: M.A. and N.B. designed the study, M.A., M.S., G.L., K.B., and G.S. designed peptides, M.S. synthesized the peptides, M.S.; and B.L. performed CD analyses, N.L., L.M.A.A., M.H., and N.B. performed the cellular uptake and cell-viability experiments, prepared the siRNA/peptide complexes. N.B., M.A., M.S., N.L. and L.L.V. analyzed the data and wrote the manuscript with contributions from all authors. N.L. and M.S. prepared figures. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Authors thank the “Ministère Algérien de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique” for the Ph.D. grant to Nabila Laroui and the Franco-Algerian steering committee for its support.

Acknowledgments: We acknowledge the imaging facility MRI (Montpellier RIO Imaging) platform, member of the national infrastructure FranceBioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investments for the future”) for confocal imaging facilities access. We also thank LMP (Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM Montpellier) for providing access to CD facilities and the team “Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé” at IGMM for access to the Malvern NanoZS instrument.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Turner, J.J.; Jones, S.W.; Moschos, S.A.; Lindsay, M.A.; Gait, M.J. MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA degradation in serum confirms an RNase A-like activity. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 43–50. [\[CrossRef\]](#)
2. Reischl, D.; Zimmer, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: Potentials and limits of nanosystems. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2009**, *5*, 8–20. [\[CrossRef\]](#)
3. Ahmadzade, T.; Reid, G.; McKenzie, D.R. Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 69–86. [\[CrossRef\]](#)
4. Laroui, N.; Cubedo, N.; Rossel, M.; Bettache, N. Improvement of Cell Penetrating Peptide for Efficient siRNA Targeting of Tumor Xenografts in Zbrafish Embryos. *Adv. Ther.* **2020**, *3*, 3. [\[CrossRef\]](#)
5. Singh, T.; Murthy, A.S.N.; Yang, H.-J.; Im, J. Versatility of cell-penetrating peptides for intracellular delivery of siRNA. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1996–2006. [\[CrossRef\]](#)
6. Konate, K.; Crombez, L.; Deshayes, S.; Decaffmeyer, M.; Thomas, A.; Brasseur, R.; Aldrian, G.; Heitz, F.; Divita, G. Insight into the cellular uptake mechanism of a secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery. *Biochemistry* **2010**, *49*, 3393–3402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Nygren, P.; Lundqvist, M.; Liedberg, B.; Jonsson, B.-H.; Ederth, T. Secondary structure in de novo designed peptides induced by electrostatic interaction with a lipid bilayer membrane. *Langmuir* **2010**, *26*, 6437–6448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Walrant, A.; Bauzá, A.; Girardet, C.; Alves, I.D.; LeComte, S.; Illien, F.; Cardon, S.; Chaianantakul, N.; Pallerla, M.; Burlina, F.; et al. Ionpair-pi interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2020**, *1862*, 183098. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Nagel, Y.A.; Raschle, P.S.; Wennemers, H. Effect of Preorganized Charge-Display on the Cell-Penetrating Properties of Cationic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 122–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Vezenkov, L.L.; Martin, V.; Bettache, N.; Simon, M.; Messerschmitt, A.; Legrand, B.; Bantignies, J.-L.; Subra, G.; Maynadier, M.; Bellet, V.; et al. Ribbon-like Foldamers for Cellular Uptake and Drug Delivery. *ChemBiochem* **2017**, *18*, 2110–2114. [\[CrossRef\]](#)
11. Yamashita, H.; Misawa, T.; Oba, M.; Tanaka, M.; Naito, M.; Kurihara, M.; Demizu, Y. Development of helix-stabilized cell-penetrating peptides containing cationic α,α -disubstituted amino acids as helical promoters. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1846–1851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Yamashita, H.; Oba, M.; Misawa, T.; Tanaka, M.; Hattori, T.; Naito, M.; Kurihara, M.; Demizu, Y. A Helix-Stabilized Cell-Penetrating Peptide as an Intracellular Delivery Tool. *ChemBiochem* **2016**, *17*, 137–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Blackwell, E.H.; Grubbs, R.H. Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281–3284. [[CrossRef](#)]
14. Miller, J.S.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. Application of ring-closing metathesis to the synthesis of rigidified amino acids and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606–9614. [[CrossRef](#)]
15. Miller, J.S.; Grubbs, R.H. Synthesis of Conformationally Restricted Amino-Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855–5856. [[CrossRef](#)]
16. Bird, G.H.; Bernal, F.; Pitter, K.; Walensky, L.D. Synthesis and biophysical characterization of stabilized alpha-helices of BCL-2 domains. *Methods Enzymol.* **2008**, *446*, 369–386.
17. Chu, Q.; Moellering, R.E.; Hilinski, G.J.; Kim, H.K.; Grossmann, T.N.; Yeh, J.T.-H.; Verdine, G.L. Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *Medchemcomm* **2015**, *6*, 111–119. [[CrossRef](#)]
18. Schafmeister, E.C.; Po, J.; Verdine, G.L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891–5892. [[CrossRef](#)]
19. Verdine, L.G.; Hilinski, G.J. Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods Enzymol.* **2012**, *503*, 3–33.
20. Walensky, D.L.; Bird, G.H. Hydrocarbon-stapled peptides: Principles, practice, and progress. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6275–6288. [[CrossRef](#)]
21. Walensky, L.D.; Kung, A.L.; Escher, I.; Malia, T.J.; Barbutto, S.; Wright, R.D.; Wagner, G.; Verdine, G.L.; Korsmeyer, S.J. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* **2004**, *305*, 1466–1470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Walensky, L.D.; Pitter, K.; Morash, J.; Oh, K.J.; Barbutto, S.; Fisher, J.; Smith, E.; Verdine, G.L.; Korsmeyer, S.J. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 199–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Robertson, N.S.; Spring, D.R. Using Peptidomimetics and Constrained Peptides as Valuable Tools for Inhibiting Protein(-)Protein Interactions. *Molecules* **2018**, *23*, 959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bernal, F.; Tyler, A.F.; Korsmeyer, S.J.; Walensky, L.D.; Verdine, G.L. Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2456–2457. [[CrossRef](#)]
25. Bouclier, C.; Simon, M.; Laconde, G.; Pellerano, M.; Diot, S.; Lantuejoul, S.; Busser, B.; Vanwonterghem, L.; Vollaire, J.; Jossierand, V.; et al. Stapled peptide targeting the CDK4/Cyclin D interface combined with Abemaciclib inhibits KRAS mutant lung cancer growth. *Theranostics* **2020**, *10*, 2008–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hyun, S.; Yu, J.; Lee, H.N.; Lee, C.; Oh, D.; Lee, D.-K.; Lee, C.; Lee, Y.; Yu, J. Construction of histidine-containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for in vitro and in vivo delivery of siRNAs. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 3820–3827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Moellering, R.E.; Cornejo, M.; Davis, T.N.; Del Bianco, C.; Aster, J.C.; Blacklow, S.C.; Kung, A.L.; Gilliland, D.G.; Verdine, G.L.; Bradner, J.E. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* **2009**, *462*, 182–188. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, H.; Zhao, Q.; Bhattacharya, S.; Waheed, A.A.; Tong, X.; Hong, A.; Heck, S.; Curreli, F.; Goger, M.; Cowburn, D.; et al. A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor. *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 565–580. [[CrossRef](#)]
29. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
30. Park, J.; Ryu, J.; Kim, K.-A.; Lee, H.J.; Bahn, J.H.; Han, K.; Choi, E.Y.; Lee, K.S.; Kwon, H.Y.; Choi, S.Y. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83 Pt 5*, 1173–1181. [[CrossRef](#)]
31. Dupont, E.; Prochiantz, A.; Joliot, A. Penetratin Story: An Overview. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1324*, 29–37. [[PubMed](#)]
32. Matsumoto, R.; Okochi, M.; Shimizu, K.; Kanie, K.; Kato, R.; Honda, H. Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Åmand, H.L.; Nordén, B.; Fant, K. Functionalization with C-terminal cysteine enhances transfection efficiency of cell-penetrating peptides through dimer formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418*, 469–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Van Asbeck, A.H.; Beyerle, A.; McNeill, H.; Bovee-Geurts, P.H.; Lindberg, S.; Verdurmen, W.P.; Hällbrink, M.; Langel, Ü.; Heidenreich, O.; Brock, R. Molecular Parameters of siRNA-Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3797–3807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Verdine, G.L.; Hilinski, G.J. All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins. *Drug Discov. Today Technol.* **2012**, *9*, e1–e70. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



1 *Supplementary Material*

2 **Hydrocarbon-stapled peptide based-nanoparticles for**
 3 **siRNA delivery**

4 *Matthieu Simon*^{1,2,†}, *Nabila Laroui*^{1,†}, *Marianne Heyraud*¹, *Guillaume Laconde*¹, *Lamiaa M.A. Ali*
 5 ^{1,3}, *Kevin Bourbiaux*¹, *Gilles Subra*¹, *Lubomir L. Vezekov*¹, *Baptiste Legrand*¹, *Muriel*
 6 *Amblard*^{1,*}, *Nadir Bettache*^{1,*}

7 1 IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, 34093, Montpellier, France. matthieusimon.work@gmail.com
 8 (M.S.); nabila.laroui@etu.umontpellier.fr (N.L.); marianneheyraud@hotmail.fr (M.H.);
 9 guillaumelaconde@gmail.com (G.L.); lamiaa.ali@umontpellier.fr (L.M.A.A.); kevin.bourbiaux@gmail.com
 10 (K.B.); gilles.subra@umontpellier.fr (G.S.); lubomir.vezekov@enscm.fr (L.L.V.);
 11 baptiste.legrand@umontpellier.fr (B.L.); muriel.amblard@umontpellier.fr (M.A.);
 12 nadir.bettache@umontpellier.fr (N.B.)

13 2 Present address: IRMB, CARTIGEN, CHU de Montpellier, 34090 Montpellier, France.
 14 matthieusimon.work@gmail.com (M.S.)

15 3 Department of Biochemistry, Medical Research Institute, University of Alexandria, Alexandria 21561,
 16 Egypt. lamiaa.ali@umontpellier.fr (L.M.A.A.)

17 * Correspondence: muriel.amblard@umontpellier.fr (M.A.); nadir.bettache@umontpellier.fr (N.B.)

18 † These authors contributed equally to this work.

19

20 **1. Materials and Methods** 2

21 **2. Results** 2

22 2.1. Cytotoxicity study of stapled peptides in reducing conditions 2

23 2.2. Gel electrophoresis of the complex JMV6337/siRNA 3

24 2.3. Luciferase activity of JMV6337 on MDA-MB-231-Luc-RFP cells 3

25 2.4. Cellular uptake quantified by flow cytometric analysis of MDA-MB-231 cells 4

26 2.5. Luciferase activity using siCtrl complexed with stapled peptides in MDA-MB-231-

27 Luc-RFP cells 4

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

Supplementary Material

38

1. Materials and Methods

39 *Internalization Quantification by Flow Cytometry*

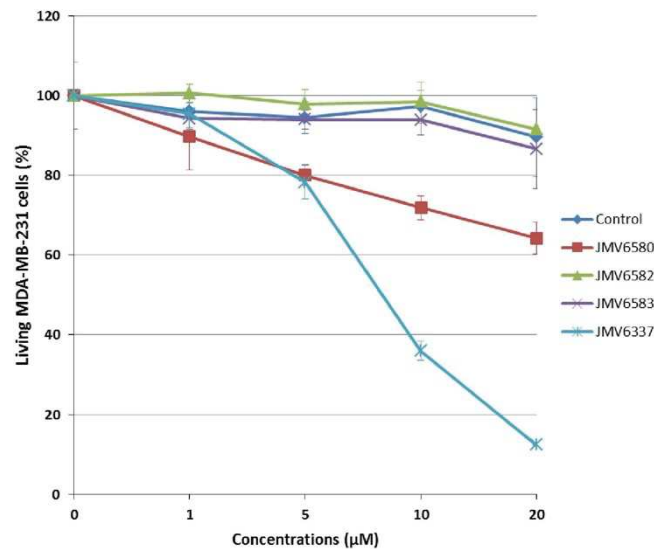
40 Cells were treated or not with Stapled peptides/siCtrl-cy5 (100 nM) at N/P = 5 for JMV6582 and N/P
 41 = 2 for JMV6580 and JMV6583 for 4 h. After treatment, control and treated cells were washed once in
 42 cold Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested and centrifuged (1300 rpm, 5 min). Cell pellet were
 43 resuspended in PBS enriched with $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$ and stained with propidium iodide ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
 44 (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), a cell death indicator. Flow cytometric determination of living
 45 cells and treated positive cells was done by FACS Novocyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, Inc.,
 46 San Diego, CA, USA) with a minimum of 20,000 living cells collected. Data were analysed with
 47 NovoExpress software (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA).
 48

49

2. Results

50

2.1. Cytotoxicity study of stapled peptides in reducing conditions



51

52 **Figure S1** : Cytotoxicity study; human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells were incubated
 53 with increasing concentrations (from 0 to 20 μM) of the stapled peptides and an excess of 10
 54 equivalents of DTT (from 0 to 200 μM), respectively, for 72 h. Results are presented as means \pm
 55 standard deviations of three independent experiments performed in triplicate.

56

57

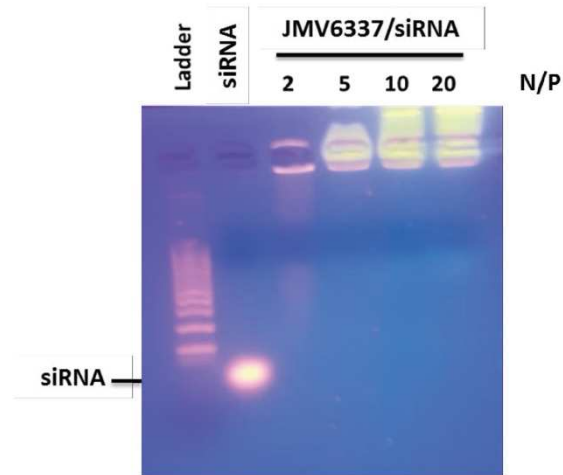
58

59

60

61

2.2. Gel electrophoresis of the complex JMV6337/siRNA



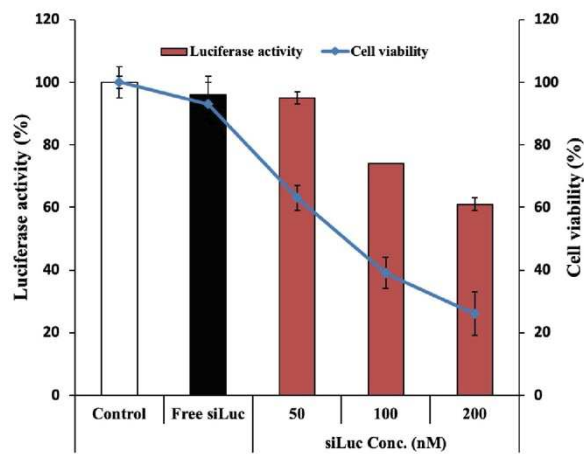
62

63 **Figure S2:** JMV6337 stapled peptide complexation with siRNA monitored by agarose gel electrophoresis
 64 analysis at N/P = 2, 5, 10 and 20.

65

66

2.3. Luciferase activity of JMV6337 on MDA-MB-231-Luc-RFP cells



67

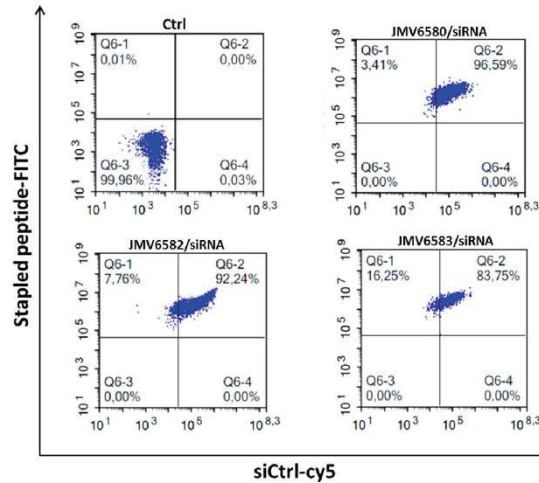
68

69 **Figure S3:** Luciferase activity assay showing the transfection of a 21-mer siRNA targeting the expression of
 70 luciferase inside MDA-MB-231-Luc-RFP cells. The experiments were carried out with increasing amounts of
 71 siLuc (from 50 to 200 nM) complexed with the JMV6337 stapled peptide at N/P = 2. The corresponding
 72 concentrations of the JMV6337 are from 1.05 μ M to 4.2 μ M.

73

74

2.4. Cellular uptake quantified by flow cytometric analysis of MDA-MB-231 cells



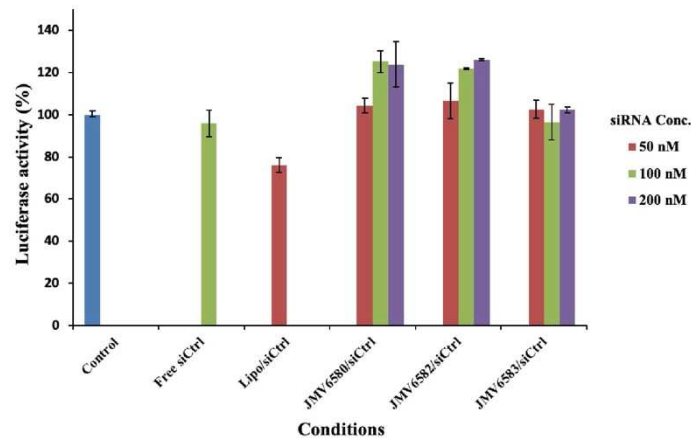
75

76 **Figure S4:** Cellular uptake quantified by flow cytometric analysis of MDA-MB-231 cells treated with stapled
 77 peptide/siRNA complexes. MDA-MB 231 cells alone (upper left), cells incubated with the complex formed
 78 between JMV6580 and siCtrl-cy5 at N/P = 2 (upper right), cells incubated the complex formed between JMV6582
 79 and siCtrl-cy5 at N/P = 5 (lower left) and finally, cells incubated with the complex formed between JMV6583 and
 80 siCtrl-cy5 at N/P = 2 (lower right). Numbers in the profiles indicate the percentage of cells present in this area.

81

82

2.5. Luciferase activity using siCtrl complexed with stapled peptides in MDA-MB-231-Luc-RFP cells



83

84 **Figure S5:** Luciferase activity assay showing the transfection of a non-targeting 21-mer siRNA inside MDA-MB-
 85 231-Luc-RFP cells. The experiments were carried out with increasing amounts of siCtrl (from 50 to 200 nM)
 86 complexed with the stapled peptides. The corresponding concentrations of the peptides are from 1.05 μ M to 4.2

87 μM for JMV6580, from 1.4 μM to 5.6 μM for JMV6583 and from 5.25 μM to 21 μM for JMV6582. The concentration
88 of the siCtrl used in Lipofectamine condition is 50 nM.

3. Conclusion et perspectives

Dans cet article, nous avons synthétisé des petits stapled peptides cationiques de moins de 10 acides aminés, qui semblent répondre aux besoins actuels pour la vectorisation de siRNA et qui permettent d'inhiber de façon significative l'expression d'un gène spécifique.

Nous avons montré à travers ce travail que la technologie des stapled peptides hydrocarbonés peut être utilisée pour améliorer la délivrance du siRNA. En effet, nous avons observé que ces peptides α -hélicoïdaux amphipathiques avaient des capacités de pénétration cellulaire plus élevées que le peptide linéaire non agrafé (Figure 32). De plus, il est à noter que l'efficacité des stapled peptides utilisés dans cette étude est lié indirectement à leur mécanisme d'internalisation. Effectivement, nos résultats d'imagerie confocale et d'activité luciférase suggèrent que ces peptides peuvent pénétrer dans la cellule cancéreuse par un mécanisme indépendant de l'endocytose, ce qui constitue un grand avantage pour éviter les limitations d'échappement endosomal.

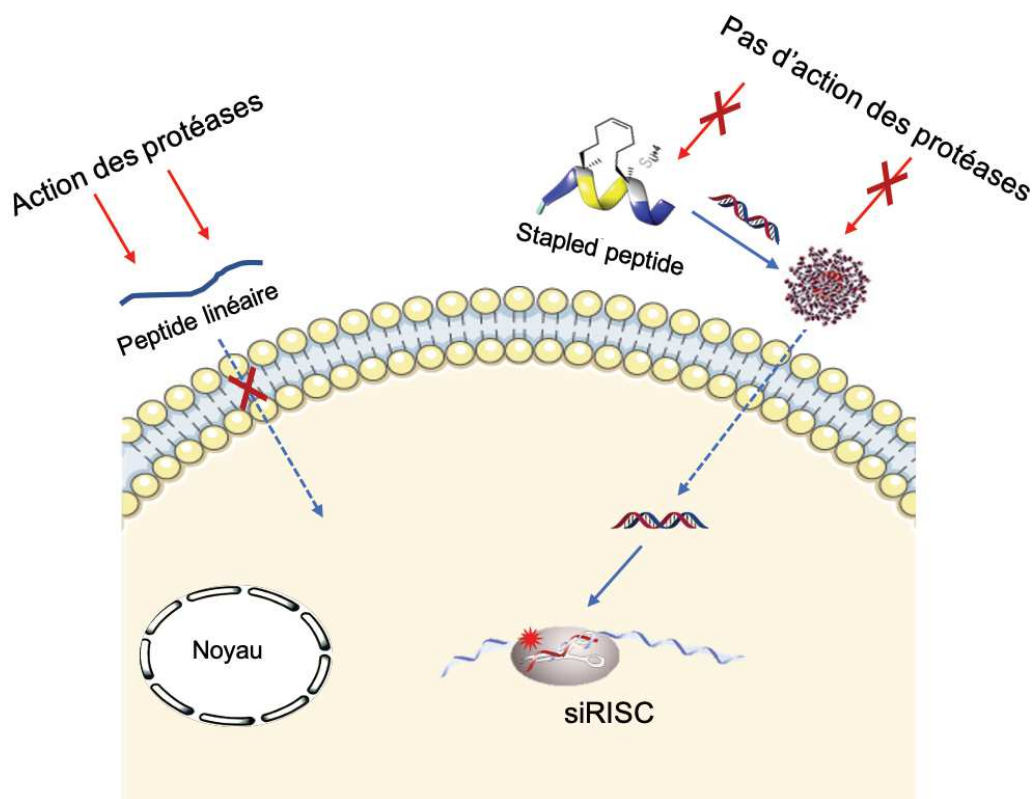


Figure 32 : Représentation schématique de stapled peptides pour la délivrance de siRNA

Parmi les stapled peptides étudiés, le peptide JMV6582 s'est avéré présenter la capacité de délivrance de siRNA la plus élevée, laissant suggérer qu'il pourrait être un bon candidat pour la thérapie anti-cancéreuse ainsi que pour d'autres maladies. En effet, la formulation de ce nouveau vecteur peptidique a le potentiel d'être développée davantage en tant que système de délivrance de siRNA non invasif puisque les stapled peptides sont considérés non immunogènes avec des niveaux élevés de stabilité *in vivo* [430].

Chapitre III : Auto-assemblage de polymères dynamiques covalents pour la vectorisation ciblée du siRNA.

Cette troisième partie de ma thèse s'est orienté vers le développement d'une nouvelle génération de vecteurs obtenus par auto-assemblage. Ces travaux sont décrits et illustrés dans un manuscrit qui vient d'être accepté pour publication dans lequel je suis co-premier auteur [431].

1. Contexte et objectifs

Dans le contexte de la délivrance d'acides nucléiques, les polymères dynamiques covalents (PDC) connaissent actuellement un intérêt croissant pour la vectorisation. En effet, ces PDC auto-assemblés, dynamiques et adaptables à la cible siRNA, miment ainsi les processus d'auto-assemblage viraux et présentent donc un fort potentiel pour la vectorisation d'oligonucléotides thérapeutiques. Le concept de cette approche repose sur l'auto-fabrication d'un vecteur « sur mesure » par la cible elle-même. Cette faculté d'adaptation est un atout majeur de ces systèmes puisque c'est le siRNA qui guide et assiste la formation du vecteur.

La formation de PDC auto-assemblé provient des « dynamic covalent libraries (DCL) » qui résultent de l'association covalente réversible, sous contrôle thermodynamique ou cinétique, de monomères ou « building blocks » complémentaires. En effet, Les DCL constitués de building blocks bi-fonctionnels peuvent générer des macrocycles ou des polymères linéaires et cet équilibre est fortement dépendant de la concentration. Il est bien connu que des concentrations élevées (≥ 100 mM) favorisent la formation de PDC linéaires tandis que de faibles concentrations favorisent la formation des cycles.

En se basant sur ces approches, notre groupe avait synthétisé des polymères covalents dynamiques linéaires grâce à un processus de polycondensation exploitant les liaisons acyl-hydrzones. La première génération de ces PDC linéaires (Figure 33) a été conçue pour combiner des monomères cationiques à base de guanidinium ou d'éthylèneimine avec de courtes chaînes éthylène-glycol [432]. Les résultats montrent que les oligomères s'auto-assemblent effectivement lorsque la réaction de polycondensation est réalisée à haute

concentration et que les polymères résultants présentent une liaison multivalente à l'ADN plasmidique dans un milieu aqueux ainsi que dans un milieu biologique contenant du sérum. De plus, il a été démontré que les polymères à base d'acyl-hydrazone sont sensibles au pH et subissent une dégradation à $\text{pH} \approx 5$ correspondant au pH des endosomes tardifs, tout en restant stables à pH physiologique sur une période beaucoup plus longue.

La deuxième génération de PDC linéaires (Figure 33) comprend des acides aminés modifiés impliquant des réactions de condensation acyl-hydrazone et oxime pour la formation de polymères [231]. Cette approche synthétique a permis de tester différents acides aminés modifiés (Arg, Hys, Lys) et l'arginine s'est distinguée pour conférer une meilleure liaison à l'ADN. En effet, les résultats obtenus par électrophorèse sur gel démontrent une bonne complexation non seulement avec de l'ADN mais également avec du siRNA. De plus, les expériences biologiques sur des cellules vivantes ont montré une transfection efficace de siRNA - dépassant même la lipofectamine - avec une cytotoxicité limitée.

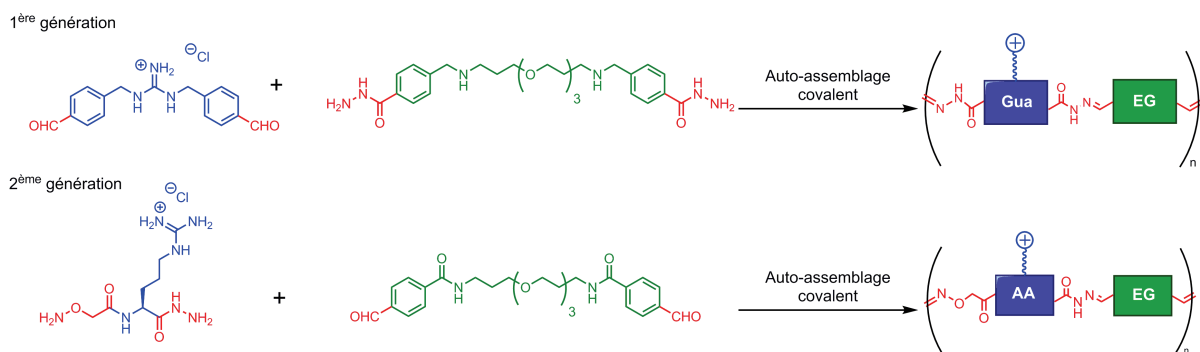


Figure 33 : Schéma représentant l'assemblage dynamique covalent des 2 générations de PDC pour la complexation de l'ADN et la délivrance du siRNA.

En plus du facteur de concentration, les effets de template, peuvent également affecter l'équilibre macrocycles/polymères. En effet, en augmentant la concentration locale de monomères pré-associés, la présence d'une biomolécule rigide telle que des acides nucléiques peut déclencher et assister la polymérisation. A ce jour, le groupe de Aida montre le seul exemple d'un système covalent dynamique qui subit une polymérisation par un effet template de siRNA. Leur système est basé sur des monomères cationiques qui conduisent à des polydisulfures grâce à une polymérisation oxydative basée sur un siRNA, favorisée par l'iodure de potassium/diiodure (KI/I_2) et qui peut être réalisée à une faible concentration d'environ 0,9 mM.

L'auto-vecteur formé a montré une efficacité de transfection de siRNA-Luc *in vitro* sur cellules de carcinome hépatocellulaire (environ 30 à 35% d'activité luciférase a été observée) [433].

A cet égard, nous voulions exploiter cette approche d'auto-assemblage par effet de template de siRNA. Pour cela, nous avons testé notre système « PDC acyl-hydrazone » pour sa capacité à s'auto-assembler à partir de monomères hydrosolubles grâce un effet de template. Nous avons également exploré si cette approche permettrait d'appliquer une stratégie de ciblage actif. Ces enjeux ont fait l'objet d'une étude que j'ai réalisée pendant ma thèse.

2. Aperçu des principaux travaux

Compte tenu de ces résultats prometteurs et dans le cadre de ma thèse, nous avons développé une nouvelle génération de PDC qui devraient i) par l'effet template du siRNA s'auto-assembler à plus faibles concentrations grâce à un processus de poly-condensation impliquant des réactions de liaison oxime et acylhydrazone, ii) cibler des cellules cancéreuses et faciliter l'internalisation du siRNA grâce à la présence multivalente du *D*-mannose fonctionnalisé sur un building block.

Dans la première partie de cette étude, différents monomères constitués de tétra-peptides cationiques modifiés : Ald1 (non fonctionnalisé), Ald2 (fonctionnalisé avec du *D*-mannose) et Ox-Arg₃-Hyd ont été synthétisés (Figure 34).

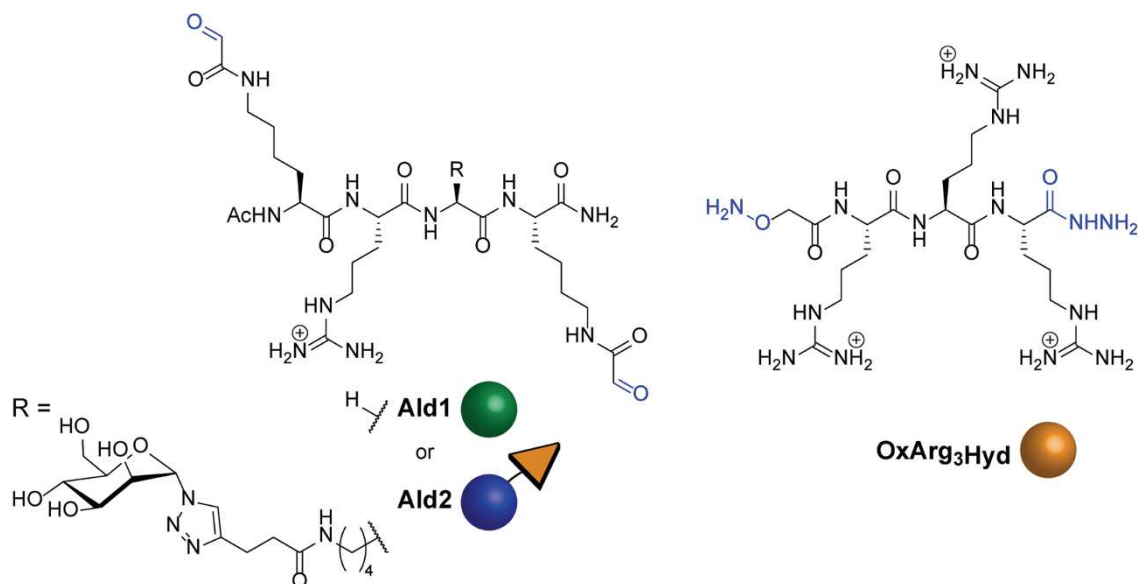


Figure 34 : Représentation schématique des tétra-peptides Ald1, Ald2 et Ox-Arg₃-Hyd.

Nous avons sélectionné ces peptides modifiés très courts possédant i) deux acides aminés modifiés aux deux extrémités qui permettent de placer des groupes réactifs pour l'auto-assemblage covalent dynamique, ii) une position cliquable pour la fonctionnalisation du ligand, et iii) un/des acides aminés cationiques qui servent à établir les interactions avec les acides nucléiques.

Les tétra-peptides modifiés ont été obtenus par synthèse peptidique en phase solide. Mon travail dans cette partie reposait principalement sur la synthèse des acides aminés modifiés Fmoc-L-Lys [Boc-L-Ser (OtBu)] -OH et Fmoc-L-Lys [acide N-4-pentynoïque] -OH qui ont donné les bisaldéhydes Ald1 et Ald2 souhaités après une coupure oxydante et une cycloaddition catalysées par le cuivre (CuAAC) avec l'azide α -D-mannopyranosyle. Ces deux dernières étapes ont été réalisées avec la doctorante Maëva Coste.

Ainsi, j'ai réalisé la synthèse et la purification des acides aminés selon un protocole établi par l'équipe. Brièvement, la préparation de l'acide aminé modifié Fmoc-L-Lys [acide N-4-pentynoïque]-OH se fait en deux étapes : tout d'abord l'acide pent-4-ynoïque est activé en ester par ajout de N-hydroxy succinimide (NHS) et de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'ester activé 4-Pentynoic acid succinimidyl est ensuite couplé au Fmoc-lysine en présence de DIPEA. Après purification par RP-HPLC, le produit souhaité a été obtenu avec un rendement de 71% (Figure 35).

Parallèlement, j'ai effectué la synthèse de l'acide aminé modifié Fmoc-L-Lys [Boc-L-Ser (OtBu)]-OH qui se fait également en deux étapes : tout d'abord le N-(tert-butoxycarbonyl)-O-(tert-butyl)serine est activé en ester par ajout de NHS et de DCC. L'ester activé Boc-Ser(t-Bu)-N-hydroxysuccinimide est ensuite couplé au Fmoc-lysine en présence de DIPEA. Après purification, par RP-HPLC, le produit souhaité a été obtenu avec un rendement de 83% (Figure 35).

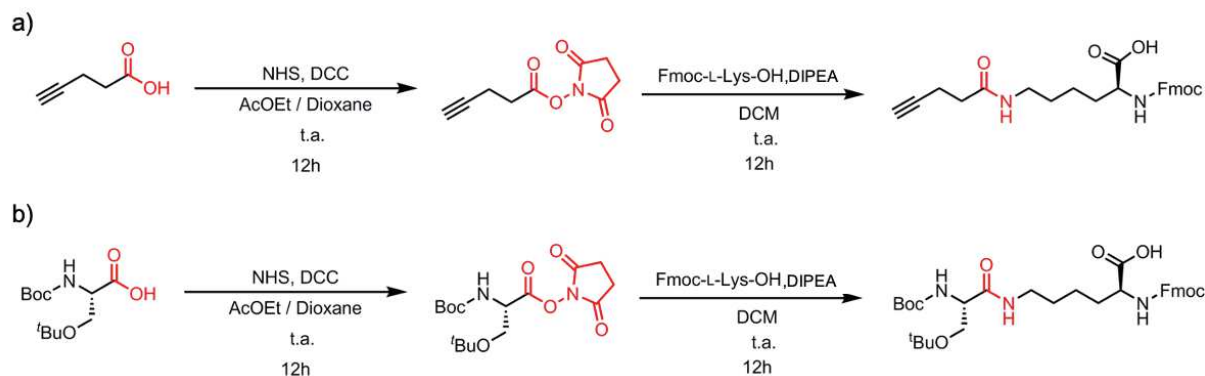


Figure 35 : Synthèse des acides aminés modifiés : a) Fmoc-L-Lys [acide N-4-pentynoïque] -OH. b) Fmoc-L-Lys [Boc-L-Ser (OtBu)] -OH.

La synthèse de Ox-Arg₃-Hyd a été réalisée par la doctorante Dandan Su. Pour l'obtention de ce monomère, nous avons utilisé une résine d'hydrazine protégée par Fmoc pour installer le groupe C-hydrazide, et nous avons couplé le N-terminal à l'ester N-Boc-aminoxyacétyl N-hydroxysuccinimide pour installer la fonction aminoxy. Un clivage dans des conditions légèrement acides a donné le peptide protégé qui a été purifié par RP-HPLC, avant d'être complètement déprotégé dans du TFA pour donner, par précipitation dans l'éther diéthylique, l'Ox-Arg₃-Hyd souhaité.

Suite à la synthèse et la caractérisation des différents monomères, j'ai pu étudier l'aspect de complexation de siRNA *in situ* par simple mélange, à température ambiante de Ald1 et Ox-Arg₃-Hyd à faible concentration (concentration finale de chacun : 0,4 mM), en présence de siRNA et dans un tampon aqueux pH 5,5. Nos observations sur gel d'électrophorèse montrent une complexation complète du siRNA à N/P = 20 après 16h d'incubation. Des résultats similaires ont été observés lorsque Ald2 et Ox-Arg₃-Hyd ont été incubés dans les mêmes conditions mais avec un degré de complexation plus faible à N/P = 10. De plus, une complexation par suivi cinétique a montré que la complexation complète du siRNA pouvait être atteinte 30 min après incubation des monomères et du siRNA (Figure 2A et 2B de l'article).

J'ai pu également montrer que l'incubation avec un excès de méthoxyamine en (MeONH₂, 170 équivalents par rapport à Ald1) conduit à une suppression complète de complexation de siRNA (Figure 2C de l'article). En effet, les acyl-hydrzones sont connus pour subir un échange avec des oxyamines afin de former des oximes [434]. Ainsi, le résultat obtenu indique le rôle des réactions de condensation dans la complexation du siRNA.

Dans le même contexte, pour élucider si les macrocycles ou les polymères linéaires sont responsables de la complexation de siRNA observée, nous avons préformé le polymère DCP1 (Ald1 et Ox-Arg₃-Hyd à haute concentration (50 mM)) et nous avons testé la complexation de siRNA qui, selon l'électrophorèse sur gel, était complète à N/P = 20). Tandis que la formation des macrocycles a été réalisée par l'incubation des deux monomères à faible concentration mais cette fois en l'absence de siRNA (pré-équilibré : Ald1 et Ox-Arg₃-Hyd à faible concentration (0,4 mM) incubés seuls pendant 24h). Ainsi, seule une complexation partielle a été initialement observée, indiquant que les macrocycles sont moins efficaces pour la complexation du siRNA que les polymères DCP. Cependant, à des temps d'incubation plus longs (≥ 16 h), une complexation complète a été observée indiquant ainsi une adaptation du système par la présence de siRNA, en réorganisant les macrocycles en polymères. (Figure 2D de l'article).

Suite à ce travail, j'ai réalisé des études de caractérisation des complexes formés notamment par des mesures de taille et de charge. Cette étude a également démontré l'aspect adaptable de ce système. En effet, les macrocycles formés du système pré-équilibré possédaient une charge positive (potentiel $z=11.9$ mV) mais ne formaient pas de nanoparticules. Cependant, après 16 h d'incubation du pré-équilibré avec le siRNA, on retrouve des nanoparticules d'une taille d'environ 320 nm ; quasi similaire au système auto-assemblé *in situ* incubés en présence de siRNA qui était de 387 nm (Tableau 1 de l'article). Ce résultat montre clairement l'effet template du siRNA pour l'auto-assemblage des monomères et l'adaptabilité du système pré-équilibré et donc la complexation efficace du siRNA par interaction électrostatique. En effet, le fait que les potentiels ζ des complexes formés soient neutres indique que les polyplexes sont formés par interaction électrostatique et que l'effet template fonctionne jusqu'à la neutralisation de la charge.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons démontré le grand potentiel de vectorisation ciblée du siRNA des PDC en comparant le DCP1 non ciblant (complexe *in situ* de : Ald1 et Ox-Arg₃-Hyd) et le DCP2 ciblant (complexe *in situ* de : Ald1 et Ox-Arg₃-Hyd) sur les cellules du cancer colorectal HCT-116 sur-exprimant le récepteur mannose [381]. Ainsi, l'activité cellulaire de ces DCP a été évaluée par des expériences d'inhibition d'activité luciférase sur HCT-116-Luc et malheureusement, les résultats obtenus ne montrent aucune activité d'inhibition ni par DCP1 ou DCP2. Nous avons ainsi pensé que la densité de *D*-mannose était trop élevée dans le DCP2 et pouvait affecter la complexation du siRNA et / ou gêner la liaison au récepteur. Un tel effet a été précédemment rapporté dans des travaux précédents de notre

groupe montrant qu'un pourcentage élevé de mannose ancré à la surface des MSN (mesoporous silica nanoparticle) altère l'efficacité des nanoparticules due à un encombrement stérique excessif, réduisant un éventuel effet de reconnaissance entre le mannose sur les nanoparticules et les lectines [435]. Pour cela, nous avons préparé le copolymère DCP3 contenant 1 équiv. de Ox-Arg₃-Hyd, 0,8 équiv. de Ald1 et 0,2 équiv. de Ald2 et nous avons observé une importante inhibition de luciférase dose-dépendante (53% d'inhibition de luciférase a été observé dans les cellules traitées avec le complexe DCP3/siLuc par rapport à 29% et 12% d'inhibition luciférase sur les cellules traitées avec le complexe DCP2/siLuc et DCP1/siLuc, respectivement) (Figure 3 de l'article). De plus, aucune activité de siLuc n'a été obtenue en utilisant DCP2 et DCP3 sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7-Luc qui ne sur-expriment pas les récepteurs du mannose (Figure S11 de l'article). Ainsi, ces résultats démontrent : i) le ciblage des cellules HCT-116 *via* le récepteur mannose, ii) l'importance de la quantité (pourcentage) de mannose fonctionnalisé dans les PDC formés, et iii) l'internalisation du complexe et la libération efficace du siRNA pour activer la machinerie d'interférence.

Dans le même sens, l'internalisation cellulaire de siRNA en utilisant DCP3 comme vecteur de ciblage a été étudiée plus en détail par microscopie confocale. Alors que le siCtrl-CY5 libre était mal internalisé seul, l'utilisation de DCP3 s'est avérée favoriser son internalisation cellulaire sur les cellules cancéreuses colorectales HCT-116 avec une co-localisation significative avec le lysotracker indiquant la présence des complexes dans les compartiments endo-lysosomales et suggérant ainsi une voie d'internalisation par endocytose. De plus, l'implication du récepteur mannose dans l'endocytose active des DCP3/siRNA a été démontrée par l'inhibition compétitive de l'endocytose des complexes en utilisant un excès de *D*-mannose. Les résultats d'imagerie par microscopie confocale ont montré que l'addition en excès de *D*-mannose inhibe totalement l'internalisation des complexes DCP3/siCtrl-ATTO488 suggérant que le *D*-mannose avait bloqué l'endocytose active du complexe *via* le récepteur mannose (Figure 4 de l'article).



A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker

Angewandte Chemie

GDCh

International Edition

www.angewandte.org

Accepted Article

Title: Cell-selective siRNA delivery using glycosylated dynamic covalent polymers self-assembled in situ by RNA-templating

Authors: Nabila Laroui, Maëva Coste, Dandan Su, Lamiaa Ali, Yannick Bessin, Mihail Barboiu, Magali Gary-Bobo, Nadir Bettache, and Sebastien Ulrich

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Angew. Chem. Int. Ed.* 10.1002/anie.202014066

Link to VoR: <https://doi.org/10.1002/anie.202014066>

WILEY-VCH

Cell-selective siRNA delivery using glycosylated dynamic covalent polymers self-assembled *in situ* by RNA-templating

Nabila Laroui,^{[a],[+]} Maëva Coste,^{[a],[+]} Dandan Su,^{[a],[b]} Lamiaa M. A. Ali,^{[a],[c]} Yannick Bessin,^[a] Mihail Barboiu,^[b] Magali Gary-Bobo,^[a] Nadir Bettache,^{[a]*} and Sébastien Ulrich^{[a]*}

Dedicated to Prof. Eric T. Kool on the occasion of his 60th birthday.

[a] N. Laroui, M. Coste, D. Su, Dr. L. M. A. Ali, Dr. Y. Bessin, Dr. M. Gary-Bobo, Dr. N. Bettache, and Dr. S. Ulrich
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Montpellier, France. Email: nadir.bettache@umontpellier.fr, sebastien.ulrich@enscm.fr

[b] D. Su, Dr. M. Barboiu
Institut Européen des Membranes, Adaptive Supramolecular Nanosystems Group, Université de Montpellier, ENSCM, CNRS, Place Eugène Bataillon, CC 047, F-34095 Montpellier, France.

[c] L. M. A. Ali
Department of Biochemistry, Medical Research Institute, University of Alexandria, 21561 Alexandria, Egypt.

[+] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

Abstract: Dynamic covalent libraries enable exploring complex chemical systems from which bioactive assemblies can adaptively emerge through template effects. In this work, we studied dynamic covalent libraries made of complementary bifunctional cationic peptides, yielding a diversity of species from macrocycles to polymers. Although polymers are typically expressed only at high concentration, we found that siRNA act as a template in the formation of dynamic covalent polymers at low concentration in a process guided by electrostatic binding. Using a glycosylated building block, we were able to show that this templated polymerization further translates into the multivalent presentation of carbohydrate ligands, which subsequently promotes cell uptake, and even cell-selective siRNA delivery.

Dynamic Covalent Libraries (DCLs) result from the reversible covalent association of complementary building blocks.^[1] DCLs are constitutionally complex chemical systems, colloquially called "mixtures", from which networks, bioactive assemblies, and even life-like behaviors can all emerge spontaneously.^[2] The past few years have witnessed a growing interest in using DCLs in delivery applications, in particular for finding smart delivery vectors that self-assemble *in situ* and are capable of adaptation throughout the delivery process.^[3] DCLs made of bifunctional building blocks can generate macrocycles ("rings") or polymers ("chains"), and quite often those two species co-exist. However, such ring-chain equilibrium is strongly affected by concentration.^[4] It is well-known that high concentrations (≥ 50 mM) favor chains (Dynamic Covalent Polymers,^[5] DCPs),^[6] while low concentrations favor rings.^[7] Rare examples of *in situ* polymerization in aqueous media take place at low concentration. Rao and co-workers used rigid monomers to achieve *in situ* polymerization with 80% conversion into polymers at concentration as low as 0.1 mM.^[8] Template effects, a hallmark of supramolecular chemistry, can affect ring-chain equilibria by increasing the local concentration of pre-associated monomers. Previous reports have shown that nucleic acids (NA) can act as templates and trigger a templated polymerization.^[9]

RNA interference therapy uses small interfering RNA (siRNA) which can be delivered into cells by cationic DCPs.^[10] However, despite two recent approvals (Onpatro[®], Givlaari[®]) and continuous progresses,^[11] the targeted delivery of siRNA remains a critical issue. In this context, we have evidenced constitutional adaptation of vectors in the presence of NA,^[12] but few examples discussed how NA templates can affect ring-chain equilibria. Bouteiller, Sollogoub and co-workers described a supramolecular system based on capped β -cyclodextrins that undergoes DNA-templated cooperative supramolecular polymerization by preventing self-inclusion of the heterobifunctional monomer.^[13] siRNA complexation and delivery was shown at a monomer concentration as low as 0.4 mM. Using amphiphilic dendrimers, Peng and co-workers have also reported that siRNA templates supramolecular assemblies.^[14] However, Aida and co-workers have provided the only example, followed by others,^[15] of a dynamic covalent system that undergoes siRNA-templated polymerization.^[16] The system is based on homobifunctional dithiol monomers bearing guanidinium groups that lead to cationic polydisulfides through a siRNA-templated oxidative polymerization, promoted by KI/I₂, occurring at a monomer concentration of about 0.9 mM. While siRNA activity using those DCPs rivalled the transfection reagent DharmaFECT, reaching about 30-35% luciferase activity, the amount of siRNA taken up was five-fold smaller. Conjugation to oligoarginines (Arg₆) provided a significant improvement, suggesting that a limitation of such electrostatically-driven siRNA-templated polymerization arises from the resulting polyplexes lacking an excess of cationic groups which is often beneficial for triggering cell uptake but unfortunately can elicit cytotoxicity as well. We hypothesize that a multivalent display of carbohydrate ligands such as D-mannoses onto DCPs could improve the cell uptake, possibly in a selective manner, by a receptor-mediated internalization pathway. The mannose receptors (MR) are transmembrane proteins belonging to the C-type lectin superfamily of carbohydrate-binding receptors.^[17] While they bind single sugars with low affinity, they are capable of clustering and thus susceptible to multivalent binding effects.^[18] MR are interesting targets because they participate in endocytosis,^[17] being able to activate

the cell uptake of nanoparticles, especially in cancer cells where they can be over-expressed.^[19] Glycosylation has been proposed to regulate the internalization of vectors,^[20] but, to date, there are only two reports on glycosylated DCPs.^[21] Herein, we report on DCLs made of two complementary bifunctional cationic peptides (Figure 1). We show that siRNA-

templated polymerization take place at low concentration, yielding DCPs through a poly-condensation process. Using a clickable building block appended with *D*-mannose, we show that the siRNA-templated polymerization translates into a multivalent presentation of *D*-mannoses that promote cell uptake and cell-selective siRNA delivery.

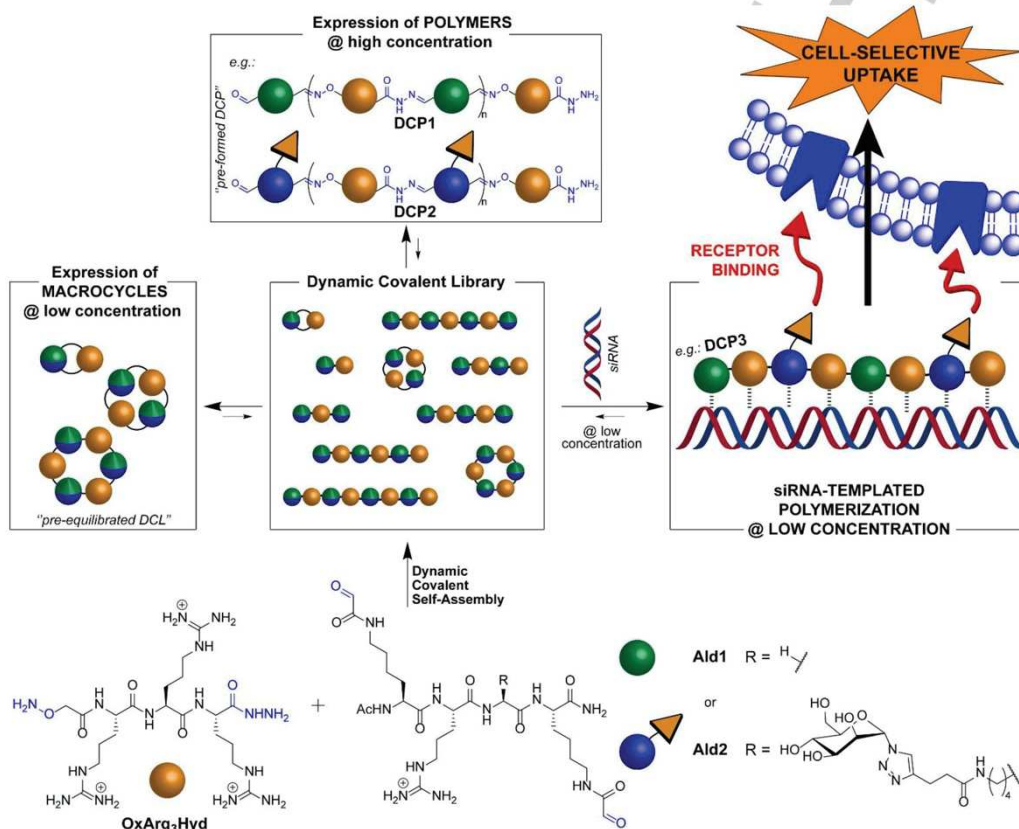


Figure 1. Representation of the dynamic covalent self-assembly of Ald1 and Ald2 with OxArg₃-Hyd that produces dynamic covalent libraries (DCLs: DCL1: Ald1 + OxArg₃-Hyd; DCL2: Ald2 + OxArg₃-Hyd; DCL3: Ald1 (0.8 equiv.) + Ald2 (0.2 equiv.) + OxArg₃-Hyd) from which macrocycles or dynamic covalent polymers (DCPs) can be expressed depending on the concentration or the presence of a nucleic acid template. Herein we demonstrate that the siRNA-templated polymerization results in a multivalent presentation of *D*-mannoses that trigger cell-selective uptake.

The building blocks Ald1, Ald2, and Ox-Arg₃-Hyd consist in modified cationic peptides and were obtained through solid-phase peptide synthesis (see Supporting Information). While Ald1 is a non-functionalized bisaldehyde, Ald2 bears a *D*-mannose. Ox-Arg₃-Hyd is a complementary building block, made of three *L*-arginines, with hydrazide and aminoxy groups at, respectively, the C and N termini. Our previous work showed that such cationic peptide-based building blocks lead, through acylhydrazone and oxime ligations, to macrocycles or DCPs at, respectively, low and high concentrations – the latter being

oligomers (DP ≈ 7-10) that are able to complex DNA through multivalent binding and deliver siRNA.^[7, 22] We tested *in situ* siRNA complexation by mixing, at room temperature, Ald1 and Ox-Arg₃-Hyd at low concentration (0.4 mM of each), in the presence of siRNA. The formation of this DCL1 was carried out in aqueous buffer at pH = 5.5 (100 mM AcONa), which is optimal for both oxime and acylhydrazone ligations with glyoxylic aldehydes, and different N/P ratios^[23] were screened. After an initial overnight incubation, we observed, by gel electrophoresis, a complete complexation of siRNA at N/P = 20 (Figure 2A, left). The DCL2 formed at the same low

concentration (0.4 mM) by combining **Ald2** and **Ox-Arg₃-Hyd** displayed a similar behavior, with a slightly worse degree of complexation at N/P = 10 (Figure 2A, right). Kinetic monitoring showed that complete complexation is reached 30 min after mixing (Figure 2B). The presence of an excess of methoxyamine (MeONH₂) in the **DCL1** completely suppresses siRNA complexation, pointing out the role of condensation reactions (Figure 2C). To elucidate whether macrocycles or polymers are responsible for siRNA complexation, we pre-formed **DCP1** at high concentration (50 mM) and tested siRNA complexation which was complete at N/P = 20 (Figure 2D). When testing **DCL1** at low concentration (0.4 mM) in the absence of siRNA ("pre-equilibrated **DCL1**"), only a partial complexation was initially observed (Figure 2D), showing that the constitution expressed at low concentration is less active towards siRNA complexation than the one formed at high concentration – in other words macrocycles are less effective than DCPs. However, a complete complexation was observed at longer incubation times (≥ 16 h) (Figure 2D), suggesting that constitutional adaptation take place in the presence of siRNA, by rearranging macrocycles into DCPs. These results show that **DCP1** and **DCP2** are the active components of the DCLs for siRNA complexation and that their expression results from a templated polymerization (Figure 1).

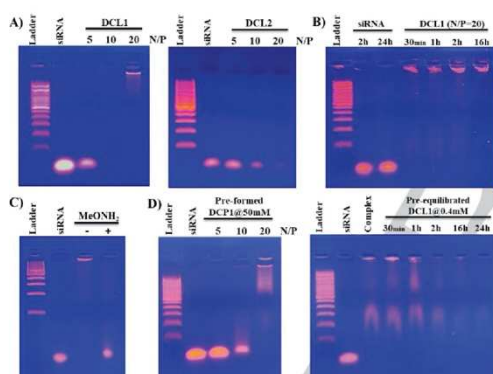


Figure 2. Gel electrophoresis analysis of siRNA complexation: A) by **DCL1** (left) and **DCL2** (right) formed *in situ* at low concentration in the presence of siRNA – N/P = 5, 10, and 20 tested; B) kinetic monitoring of siRNA complexation at N/P = 20 by **DCL1** formed *in situ* at low concentration; C) by **DCL1** (N/P = 20, 30 min incubation) in the absence (-) and in the presence (+) of methoxyamine (67 mM, 170 equivalents, with respect to **Ald1**); D) by pre-formed **DCP1** at N/P = 5, 10, and 20 (left), and kinetic monitoring of siRNA complexation (N/P = 20) by pre-equilibrated **DCL1** (low concentration (0.4 mM) in the absence of siRNA) (right).

Nanoparticles were observed by dynamic light scattering (DLS) when mixing pre-formed **DCP1** with siRNA (190.9 nm), the aforementioned siRNA-templated **DCL1** and the self-adapted **DCL1** (pre-equilibrated **DCL1** incubated with siRNA for 16 hours) both giving nanoparticles of similar and larger size (respectively, 387.3 nm and 319.0 nm), which further prove the ability of **DCL1**, and especially of **DCP1**, to complex siRNA (Table 1 and Figure S10). The polyplex made from pre-formed **DCP1** gave a positive ζ -potential (20.9 mV) while the siRNA-

templated and self-adapted **DCL1** tend to neutral values (1.25 and 2.49 mV, respectively), indicating that electrostatic interactions are likely the main driving force for polyplex formation and that template effects operate until charge neutralization (Table 1). Considering the number of guanidinium groups in each building block and the fact that each siRNA strand is 21-mer, we expect that oligomers of DP ≈ 10 are formed, which is in line with the DP previously observed for this class of DCPs,^[7, 22] and also consistent with the observation of Aida and co-workers that hexamers of their tetra-guanidylated monomers were formed by siRNA-templated polymerization.^[16]

Table 1. Characterization of polyplexes (N/P = 20) by dynamic light scattering and ζ -potential measurements.

Compounds	Size \pm SD (nm)	PDI \pm SD	ζ -potential \pm SD (mV)
siRNA	n.d.	n.d.	-26.9 \pm 1.3
DCL1 ^[a]	n.d.	n.d.	11.9 \pm 1.6
Pre-formed DCP1 ^[b]	190.9 \pm 2.6	0.27 \pm 0.01	20.9 \pm 5.7
siRNA-templated DCL1 ^[c]	387.3 \pm 92.8	0.39 \pm 0.07	1.25 \pm 0.59
Pre-equilibrated DCL1 ^[c]	319.0 \pm 64.0	0.41 \pm 0.1	2.49 \pm 0.89

[a] without siRNA; [b] from **DCL1** prepared at 50 mM, 30 min incubation with siRNA; [c] incubation 16 hours in the presence of siRNA. SD: standard deviation; PDI: polydispersity index.

The cellular activity of DCPs, made from siRNA-templated DCLs as described above, was assessed through knock-down experiments of luciferase activity on HCT-116-Luc colorectal cancer cells which overexpress the mannose receptors.^[19a] Unfortunately, neither **DCP1** nor **DCP2** showed activity. We hypothesized that the density of *D*-mannose could be too high in **DCP2** and could hinder siRNA complexation and/or receptor-binding – a mannose density of 21% being best for promoting cell uptake using polymeric nanoparticles.^[24] The copolymer **DCP3** was prepared from a siRNA-templated DCL made of 1 equiv. **Ox-Arg₃-Hyd**, 0.8 equiv. **Ald1** and 0.2 equiv. **Ald2**, and a dose-dependent silencing of luciferase activity was observed, down to 47% luciferase activity at a siRNA concentration much lower (0.2 vs. 5 μ M) than in a previous study reporting similar activity (Figure 3).^[13] Moreover, no significant cytotoxicity was observed in these conditions, which contrast with the more effective but cytotoxic Lipofectamine RNAiMax (Figure 3). In contrast, no siRNA activity was achieved using **DCP2** and **DCP3** on MCF-7 human breast adenocarcinoma cells which do not overexpress the MR (Figure S11).^[19a]

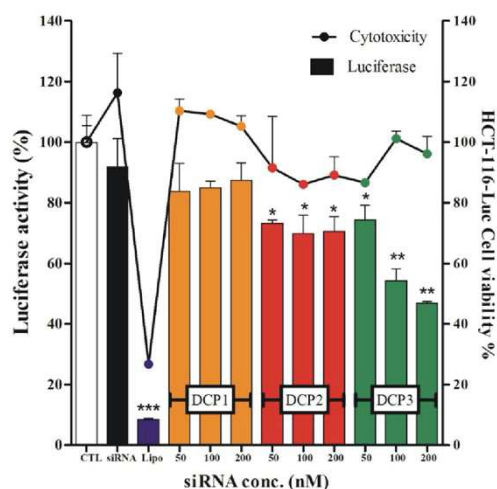


Figure 3. Knock-down of luciferase activity by DCPs/siLuc on HCT-116-Luc colorectal cancer cells (bars), and cell viability (dots). DCPs are made *in situ* from siRNA-templated DCLs. White bar: HCT-116-Luc cells alone; black bar: cells incubated with siLuc alone at 100 nM; colored bars: cells transfected with control lipoplex (Lipofectamine RNAiMax/siLuc at 50nM concentration of siRNA), DCPs/siLuc at N/P = 20 at various siLuc concentrations (50, 100 and 200 nM) and DCPs concentrations (10, 21 and 42 μ M, respectively). The luciferase activity was adjusted by cell viability. Experiments were done in triplicates (means \pm SEM). * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.0005.

Confocal fluorescence microscopy showed that **DCP3** promotes cell uptake of a cy5-labelled siRNA (siCY5) in HCT-116 cancer cells (Figure 4A). A competition experiment using an excess of *D*-mannose completely suppressed cell uptake, showing the key role of the interaction with MR (Figure 4B). Interestingly, cell uptake was much weaker on MCF-7 cells (Figure S12). An overlap with LysoTracker® Green was seen, indicating the presence of the polyplex in the endolysosomal compartments and suggesting an endocytotic internalization pathway (Figure 4A). While this endolysosomal trapping can limit siRNA activity, it has been shown that endosomal escape at low efficiency (1–2%) can be sufficient to trigger a significant siRNA effect.^[25] Overall, these results confirm that **DCP3** is an effective delivery vehicle of siRNA displaying improved uptake and cell-selective delivery thanks to a receptor-mediated internalization.

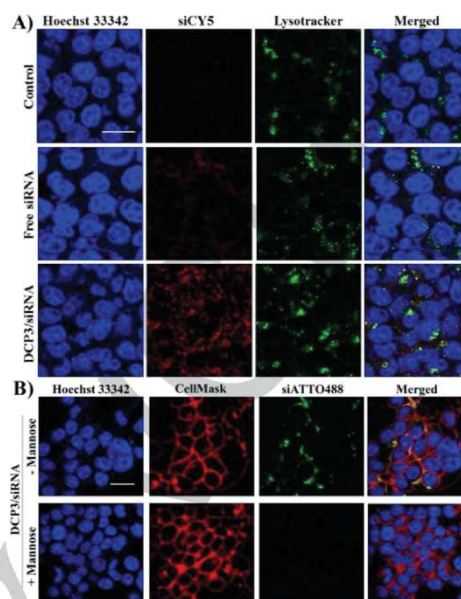


Figure 4. Cell uptake of siRNA in HCT-116 cancer cells visualized by confocal fluorescence microscopy: A) uptake of red stained siCY5 alone and complexed by **DCP3**, and co-localization with LysoTracker®; B) competition experiments of siATTO488 (100 nM) delivery by **DCP3** in absence (-) or in presence (+) of excess *D*-mannose (40 mM). Scale bars: 20 μ m.

In conclusion, we described a new generation of DCPs made of clickable cationic peptides that can be expressed *in situ* by siRNA templating. By clicking a *D*-mannose group onto one peptide building block, we showed that the corresponding siRNA-templated DCPs promoted cell-uptake through binding to mannose receptors. Finally, cell-selective siRNA delivery in cell lines that over-express the MR was achieved using **DCP3**. We believe that the versatility of this templated self-assembly approach coupled to the ability to click functional groups will unleash wider perspectives toward self-fitted DCP-based vectors of nucleic acids.

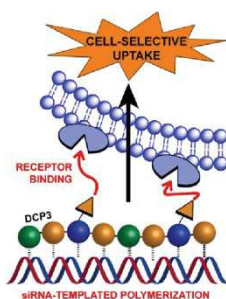
Acknowledgements

We thank the ANR (ANR-17-CE07-0042-01), the LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) and the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de l'Hérault, for funding. NL thanks the Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique for a PhD fellowship. We thank Montpellier RIO Imaging platform (ANR-10-INBS-04), member of FranceBioImaging, for imaging facilities, and IRCM Cell culture unit (INCa-DGOS Inserm 6045) for providing HCT-116-Luc cells.

Keywords: Dynamic covalent polymer • siRNA delivery • mannose targeting • template effects • self-assembly

- [1] a) W. Zhang, Y. Jin, *Dynamic Covalent Chemistry: Principles, Reactions, and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2017; b) Y. H. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6634-6654; c) F. B. L. Cougnon, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 2211-2221; d) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wieler, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* 2006, 106, 3652-3711; e) S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 898-952.
- [2] a) J. Solà, C. Jimeno, I. Alfonso, *Chem. Commun.* 2020, DOI: 10.1039/D1030CC04170J; b) J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 3276-3289; c) J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 2836-2850; d) J. W. Li, P. Nowak, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 9222-9239; e) S. Otto, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 2200-2210; f) N. Giuseppone, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 2178-2188; g) R. A. R. Hunt, S. Otto, *Chem. Commun.* 2011, 47, 847-858.
- [3] a) J. Lopez-Andarias, J. Saabach, D. Moreau, Y. Y. Cheng, E. Derivery, Q. Laurent, M. Gonzalez-Gaitan, N. Winssinger, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 4784-4792; b) Y. Y. Cheng, L. L. Zong, J. Lopez-Andarias, E. Bartolami, Y. Okamoto, T. R. Ward, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 9522-9526; c) S. Ulrich, *Acc. Chem. Res.* 2019, 52, 510-519.
- [4] H. Jacobson, W. H. Stockmayer, *J. Chem. Phys.* 1950, 18, 1600-1606.
- [5] a) Y. Liu, J. M. Lehn, A. K. H. Hirsch, *Acc. Chem. Res.* 2017, 50, 376-386; b) F. Garcia, M. M. J. Smulders, *J Polym Sci Pol Chem* 2016, 54, 3551-3577; c) N. Roy, B. Bruchmann, J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 3786-3807.
- [6] a) G. S. Pulcu, N. S. Galenkamp, Y. J. Qing, G. Gasparini, E. Mikhailova, S. Matile, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 12444-12447; b) G. Gasparini, E. K. Bang, G. Molinar, D. V. Tulumello, S. Ward, S. O. Kelley, A. Roux, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 6069-6074; c) E. K. Bang, G. Gasparini, G. Molinar, A. Roux, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2088-2091.
- [7] C. Bouillon, D. Paolantoni, J. C. Rote, Y. Bessin, L. W. Peterson, P. Dumy, S. Ulrich, *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 14705-14714.
- [8] L. Cui, S. Vivona, B. R. Smith, S.-R. Kothapalli, J. Liu, X. Ma, Z. Chen, M. Taylor, P. H. Kierstead, J. M. J. Fréchet, S. S. Gambhir, J. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 15575-15584.
- [9] M. Surin, S. Ulrich, *Chemistryopen* 2020, 9, 480-498.
- [10] a) Y. Zhang, Y. Qi, S. Ulrich, M. Barboiu, O. Ramström, *Mater. Chem. Front.* 2020, 4, 489-506; b) D. Su, M. Coste, A. Diaconu, M. Barboiu, S. Ulrich, *J. Mater. Chem. B* 2020, DOI: 10.1039/d1030tb01836h.
- [11] Y. W. Dong, T. Z. Yu, L. Ding, E. Laurini, Y. Y. Huang, M. J. Zhang, Y. H. Weng, S. T. Lin, P. Chen, D. Marson, Y. F. Jiang, S. Giorgio, S. Prich, X. X. Liu, P. Rocchi, L. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 16264-16274.
- [12] a) E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 10183-10187; b) E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy, S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 9427-9438.
- [13] P. Evenou, J. Rossignol, G. Pembouang, A. Gothland, D. Colesnic, R. Barbeyron, S. Rudiuk, A. G. Marcelin, M. Menand, D. Baigl, V. Calvez, L. Bouteiller, M. Sollgoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 7753-7758.
- [14] X. X. Liu, J. H. Zhou, T. Z. Yu, C. Chen, Q. Cheng, K. Sengupta, Y. Y. Huang, H. T. Li, C. Liu, Y. Wang, P. Posocco, M. H. Wang, Q. Cui, S. Giorgio, M. Femeiglia, F. Q. Qu, S. Prich, Y. H. Shi, Z. C. Liang, P. Rocchi, J. J. Rossi, L. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 11822-11827.
- [15] J. Zhou, L. Sun, L. P. Wang, Y. C. Liu, J. Y. Li, J. Y. Li, H. H. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 5236-5240.
- [16] a) A. Kohata, P. K. Hashim, K. Okuro, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 2862-2866; b) P. K. Hashim, K. Okuro, S. Sasaki, Y. Hoashi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 15608-15611.
- [17] L. East, C. M. Isacke, *Bba-Gen Subjects* 2002, 1572, 364-386.
- [18] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2348-2368.
- [19] a) M. Gary-Bobo, Y. Mir, C. Rouxel, D. Brevet, I. Basile, M. Maynadier, O. Vaillant, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, A. Morere, M. Garcia, J. O. Durand, L. Raehm, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 11425-11429; b) D. Brevet, M. Gary-Bobo, L. Raehm, S. Richeter, O. Hocine, K. Amro, B. Looock, P. Couleaud, C. Frochet, A. Morere, P. Maillard, M. Garcia, J. O. Durand, *Chem. Commun.* 2009, 1475-1477.
- [20] L. Dutot, P. Lécorché, F. Burlina, R. Marquant, V. Point, S. Sagan, G. Chassaing, J.-M. Mallet, S. Lavielle, *J. Chem. Biol.* 2010, 3, 51-65.
- [21] a) I. Gallego, A. Rioboo, J. J. Reina, B. Diaz, A. Canales, F. J. Canada, J. Guerra-Varela, L. Sanchez, J. Montenegro, *Chembiochem* 2019, 20, 1400-1409; b) P. Morelli, E. Bartolami, N. Sakai, S. Matile, *Helv. Chim. Acta* 2018, 101, e1700266.
- [22] C. Bouillon, Y. Bessin, F. Poncet, M. Gary-Bobo, P. Dumy, M. Barboiu, N. Bettache, S. Ulrich, *J. Mater. Chem. B* 2018, 6, 7239-7246.
- [23] The N/P ratio corresponds to the total number of cationic guanidinium groups in solution divided by the number of phosphodiester groups brought by the siRNA.
- [24] S. Chu, C. Tang, C. H. Yin, *Biomaterials* 2015, 52, 229-239.
- [25] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stoter, H. Epstein-Barash, L. G. Zhang, V. Kotliansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle,

Entry for the Table of Contents



Dynamic covalent polymers are expressed at low concentration by siRNA templating from peptide-based dynamic covalent libraries. Using a glycosylated building block, we evidenced that this templated polymerization further translates into the multivalent presentation of carbohydrate ligands, which subsequently promotes cell uptake, and even cell-selective siRNA delivery.

Accepted Manuscript

SUPPORTING INFORMATION

1. General procedures and materials.....	2
2. Synthesis of Ald1 and Ald2	6
a. Synthesis of Ald1	6
b. Synthesis of Ald2	9
3. Synthesis of Ox-Arg₃-Hyd	12
4. Dynamic Light Scattering (DLS)	15
5. Knock-down of luciferase activity on MCF-7 breast cancer cells	15
6. Confocal fluorescence microscopy on MCF-7 breast cancer cells.....	16
7. References.....	16

1. General procedures and materials

All reagents and solvents were obtained from commercial sources and were used without further purification. The dipeptide Fmoc-L-Lys[Boc-L-Ser(O^tBu)]OH^[1] and N'-Boc-aminoxyacetyl N-hydroxysuccinimide ester^[2] were synthesized following previously reported protocols.^[3] The Fmoc-protected hydrazine resin (0.595 mmol/g) was prepared from the 2-chlorotrityl chloride resin (loading; 1.60 mmol Cl/g) as previously described.^[3-4]

Fmoc-L-Lys[N-4-pentynoic acid]-OH^[5] and α -D-mannopyranosyl azide 6^[6] were synthesized following the cited literature procedures.

The different siRNA sequences are for anti-firefly luciferase (siLuc): 5' CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (sense strand), and 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAAdTdT-3' (anti-sense strand) and for siRNA without biological activity, used as control (siCtrl): 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3' (sense strand) and 5'-UCGAAGUACUUCGCGUACG dTdT-3' (anti-sense strand), the ATTO488-labelled control siRNA (siATTO488), and the cy5-labelled control siRNA (siCY5) were purchased from Eurogentec (Serring, Belgium). Lipofectamine RNAiMAX was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cell viability reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C (Bruker Avance 400 instruments) in deuterated solvents. Peaks were referenced in ppm with respect to the residual solvent peak. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet), coupling constant (*J* in Hertz), and integration.

High-performance liquid chromatography (HPLC). Analytical reverse-phase HPLC (RP-HPLC) analyses were performed on a Waters HPLC 2695 (EC Nucleosil 300-5 C18, (125 x 3 mm) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 996 DAD detector with the following linear gradients of solvent B (acetonitrile 100%) into solvent A (TFA 95% and acetonitrile 5%): Method: 0 to 95% of solvent B in 5 min; flow: 1 mL/min. Retention times (*t_R*) are given in minutes. Preparative HPLC was performed on i) a Waters Prep LC Controller HPLC (XSelect CSH Prep C18, 5 μ m, (250 x 30 mm) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 2489 detector, flow 30 mL/min [HPLC 1], or on ii) a VWR International LaPrep pump P110, a VWR LaPrep P314 Dual I absorbance detector and EZChrom software (15 C₁₈ reversed-phase column Waters x-bridge, RP-18, 25 x 250 mm, 5 μ m), flow 40 mL/min [HPLC 2], using a binary gradient elution. HPLC eluents: (Solution A: 99.9% Water, 0.1% TFA; Solution B: 99.9% Acetonitrile, 0.1% TFA).

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Analyses were performed on a Shimadzu LCMS2020 (Phenomex Kenetex C18, 2.6 μ m x 7.5 cm, 100Å) equipped with a SPD-M20A detector with the following linear gradient of solvent B (99.9% acetonitrile, 0.1% HCOOH) and solvent A (99.9% water and 0.1% HCOOH): 5 to 95% of solvent B in 5 min; flow 1 mL/min. Retention times (*t_R*) are given in minutes.

Mass spectrometry (MS). Electrospray ionization (ESI-MS) analyses were carried out at the Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM, Université de Montpellier using Micromass Q-ToF instruments.

Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). All peptide syntheses were based on a Fmoc strategy and were carried out manually. The following conditions were used:

-Resin deprotection (Fmoc removal): piperidine/DMF (2/8);

-Coupling conditions: Fmoc-AA-OH (3 eq.), HATU (3 eq.), DIEA (6 eq.), DMF, stirred at r.t. for 30 min (double coupling (30 min) was used);

-Fmoc deprotection conditions: piperidine/DMF (2/8) at r.t. for 1 min (twice);

-Acetylation: Ac₂O (150 equiv.)/DCM 1/1 v/v;

-Deprotection (Boc, Pbf) and cleavage conditions: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) at r.t. for 12 h, then precipitation in Et₂O. Mild cleavage conditions (TFA/CH₂Cl₂ (1/99) for 5 minutes, 4 times, then MeOH/Pyridine (8/2)) were used in the synthesis of **Ox-Arg₃-Hyd** in order to cleave the peptide without deprotecting the amino acid side chains.

The final peptides **Ald₁**, **Ald₂**, and **Ox-Arg₃-Hyd** were all titrated by ¹H NMR (D₂O) using *tert*-butanol as internal reference in order to determine the exact concentration. For this, the compound was solubilized in D₂O (final concentration around 5 mM) and *tert*-butyl alcohol was added (25 μL, 13.3 mM) in the NMR tube (total volume of 600 μL). ¹H NMR was recorded and the relative peak integration was used to calculate the exact concentration of the compound.

Gel retardation assay. In RNase free water, a fixed concentration, 2 μM, of siCtrl was mixed with the appropriate amounts of DCL/DCP in order to reach an N/P ratio of 5, 10 and 20 and incubated for different time intervals (30 min, 1 h, 2 h, 16 h and 24 h). After time incubation, blue 6X loading dye (Fisher Scientific) was added to the mixture. Electrophoresis was carried out on a 2 % w/v agarose gel mixed with GelRed™ nucleic acid gel stain (Interchim, France) in 1X TBE buffer (90 mM Tris-borate/2 mM EDTA, pH 8.2). The gel was run in 0.5X TBE at 50 V for 1 h. A 100 bp DNA ladder from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, S4 France) was used as a reference for the gel. The GelRed-stained siRNA was visualized using a TFX-20 M model-UV transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and gel photographs were obtained with a smartphone camera.

Dynamic light scattering (DLS) and ζ-potential measurements. siRNA complexes were prepared using siCtrl as described above to achieve the desired N/P ratio, and then diluted in sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.5). Measurements were performed after the defined time (30 min for pre-formed DCP, 16 h for siRNA-templated DCL1, 16 h for pre-equilibrated DCL1) complexes formation using Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern, United Kingdom) with transparent ZEN0040 disposable micro-cuvette (40 μL) at 25°C. For ζ-potential analyses, complexes were prepared as previously described to obtain a final volume of 1 mL. Measurements were performed using Zetasizer Nano-ZS instrument and DTS 1070 zeta potential cells at 25°C. Three measurements were made with 12 runs for each.

Cell culture. Human Colorectal cancer (HCT-116, ATCC® CCL-247™) cell line and Human Breast cancer (MCF-7, ATCC® HTB-22™) cell line were purchased from ATCC (Manassas, Virginia, USA). The HCT-116-Luc cell line was obtained from IRCM Cell Culture Unit (Montpellier, France). The MCF-7-Luc cell line derived from MCF-7 human breast cancer cells by stable transfection of firefly luciferase gene (PCDNA 3.1 CMV-Luc-SVNeo) were generously provided by Dr. P. Balaguer (ICM Montpellier, France). Selection of resistant clones was performed by geneticin addition at 1 mg.mL⁻¹ in free phenol red medium until experiments. HCT-116 cells were grown in McCoy's 5a Medium (Modified) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and antibiotic (50 µg.mL⁻¹ gentamycin). MCF-7 cells were grown in F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 100 U.mL⁻¹ penicillin and 100 µg.mL⁻¹ streptomycin. All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cell luciferase assay. HCT-116-Luc cells and MCF-7-Luc were seeded at a density of 5000 cells per well in 96-well white opaque tissue culture plates in 200 µL of their corresponding medium. Twenty-four hours after, cells were washed with PBS and incubated with 100 µL of medium containing DCP/siLuc complex formulations at the appropriate N/P ratio with the siLuc concentrations of 50, 100 and 200 nM at 37°C for 4 h. Thereafter, 50 µL of 40% serum containing medium was added to reach the concentration of 10% serum and a final volume of 200 µL. Three days after transfection, expression of luciferase was assessed by addition of luciferin (10⁻³ M, final concentration) into culture medium. After 10 min, living cell luminescence was measured using a plate reader CLARIOstar® at 562 nm and were averaged from triplicates. The percentage of luminescence of treated cells was calculated by using the control cell as 100%. Each assay was repeated three times. Luciferase activity was normalized in accordance to the total number of living cells in each sample as determined by the MTT assay as previously described.

Cell viability (MTT) assay. MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed to evaluate the cell viability.^[7] Briefly, 5000 cells were seeded into a 96 multi-well plate in 200 µL complete culture medium. Twenty-four hours after seeding, cells were treated with DCP/siLuc for 72 h as described in the section of "cell luciferase assay". Cells treated with the vehicle were considered as a control. After this incubation, cells were treated for 4 h with 0.5 mg.mL⁻¹ of MTT in media. The MTT/media solution was then removed and the precipitated crystals were dissolved in EtOH/DMSO (1:1). The solution absorbance A was read at 540 nm. The percentage of viable cells was calculated according to the following equation: %viability = $A_{\text{measured}} / A_{\text{control}} * 100$.

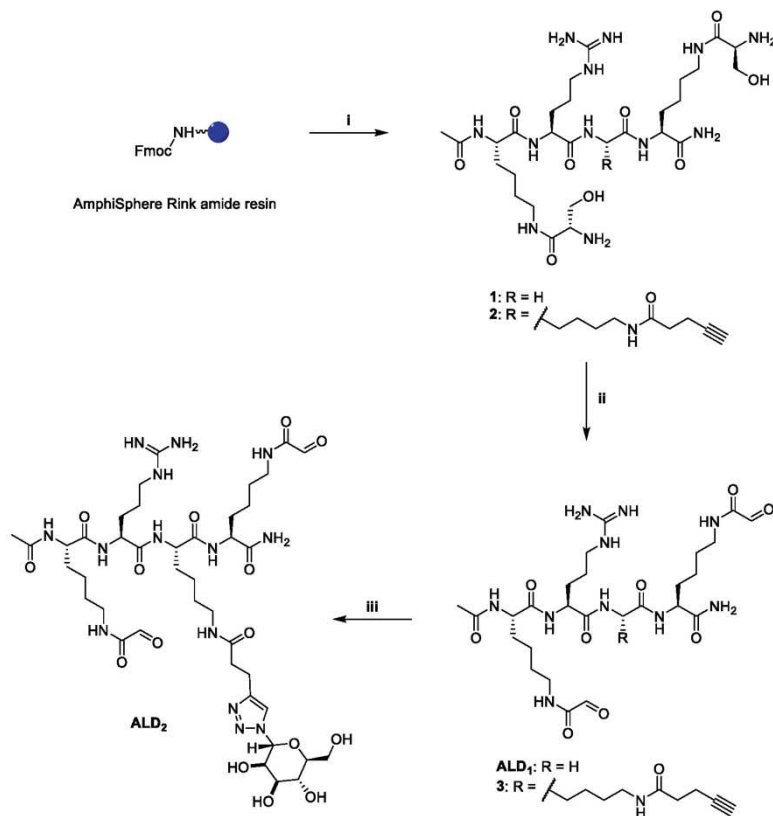
Co-localization study by imaging. The co-localization experiment was performed using confocal fluorescence microscopy on living cells. HCT-116 cells and MCF-7 cells were plated onto Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nalge Nunc International Ref 155382) in 0.3 mL culture medium for 24 h. Then, human cancer cells were treated with 100 nM concentration of siCY5 complexed to DCP3 at N/P = 20 for 4 h. Control cells were treated with vehicle. Two hours before the end of incubation, cells were treated with 1 mM concentration of

LysoTracker® Green DND-26 (Life technologies) at 37 °C. Fifteen minutes before the end of incubation, nuclei were stained with Hoechst 33342 at a final concentration of 10 µg.mL⁻¹. Then cells were washed two times with culture medium. Confocal fluorescence microscopy (Carl Zeiss LSM 780 Microscope, France) was performed on living cells under a 633 nm wavelength excitation for siCY5, 760 nm for nuclei and 488 nm for endolysosomal compartments using a high magnification (63x/1.4 OIL DIC Plan-Apo).

Inhibition of endocytosis with mannose. To study the specificity of **DCP3** to internalize into colorectal cancer cells (HCT-116) through mannose receptors, a qualitative method using confocal microscope was performed. For this HCT-116 cells were plated onto 96-well plate glass bottom half area (Corning, Ref 4580) in 100 µL culture medium for 24 h. Then, human cancer cells were pre-incubated with or without 40 mM concentration mannose (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) for 1 h, followed by incubation with 100 nM concentration of siATTO488 complexed with **DCP3** in medium containing 40 mM Mannose for 4 h. Fifteen minutes before the end of incubation, cells were stained with CellMask™ Orange plasma membrane stain (Invitrogen, Cergy Pontoise, France, C10045) for membrane staining at a final concentration of 5 µg.mL⁻¹. At the same time, nuclei were stained with Hoechst 33342 at a final concentration of 10 µg.mL⁻¹. Then cells were washed twice with culture medium. Confocal fluorescence microscopy (Carl Zeiss LSM 780 Microscope, France) was performed on living cells under a 488 nm wavelength excitation for siATTO488, 750 nm for nuclei and 561 nm for cell membranes using a high magnification (63x/1.4 OIL DIC Plan-Apo).

Statistical analysis. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. The comparison between groups was analyzed with Student's t-test. Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05 (p <0.05). The level of significance was defined at *p <0.05 and **p <0.005.

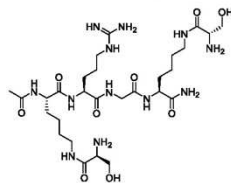
2. Synthesis of Ald1 and Ald2



Scheme S1: General synthetic scheme for the preparation of **Ald1** and **Ald2**. i) SPPS, ii) oxidative cleavage, iii) CuAAC.

a. Synthesis of Ald1

Compound 1. The peptide was synthesized on an AmphiSphere rink amide resin (loading 0.37 mmol/g) according to the general SPPS procedure using Fmoc-L-Lys[Boc-L-Ser(OtBu)]OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH and Fmoc-Gly-OH. The crude product was obtained after precipitation in Et₂O and freeze drying. The compound **3** was isolated by preparative [HPLC 1] purification (gradient: 100 % A, 5 min, then 100 % A to 40 % A/B in 60 min) to provide 187 mg (51 %). LC/MS t_R: 0.526 min. HR-ESI-MS m/z calcd for [C₂₈H₅₄N₁₂O₉+H]⁺ 703.4137, found 703.4225.



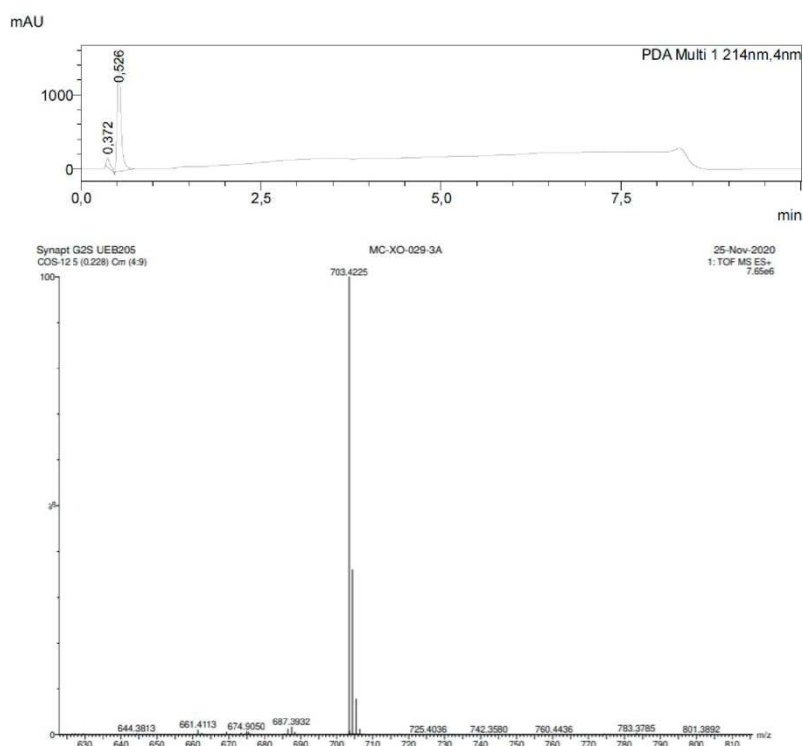
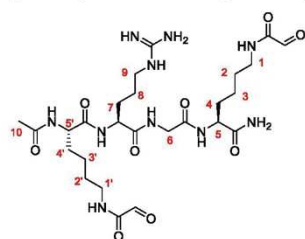


Figure S1: LC/MS analysis: UV chromatogram (top) and HR-ESI-MS spectrum (bottom).

Ald₁. The oxidative cleavage was carried out by dissolving **3** (60 mg, 0.094 mmol, 1 eq.) in H₂O (10 mM) and then adding NaIO₄ (200 mg, 0.94 mmol, 10 eq.). After 3 hours stirring, the desired



product was then purified by preparative [HPLC 1] using the following gradient of ACN/TFA 99.9/0.1 into H₂O: 0 to 25% in 25 min, then 25% to 100% in 10 min to provide 38 mg (63 %). LC/MS: t_R 0.550 min. HR-ESI-MS m/z calcd for [C₂₆H₄₄N₁₀O₉+H]⁺ 641.3293, found 641.3354; [C₂₆H₄₄N₁₀O₉+H+H₂O]⁺ 659.3293, found 659.3460; [C₂₆H₄₄N₁₀O₉+H+2H₂O]⁺ 677.3293, found 677.3578. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.57-3.68 (m, 3H, H₅), 3.32 (s, 2H, H₆), 2.53-2.59 (m, 6H, H₁, H₉), 1.40 (s, 3H, H₁₀), 1.00-1.23 (m, 6H, H₄, H₇), 0.86-0.93 (m, 6H, H₂, H₈), 0.69-0.78 (m, 4H, H₃).

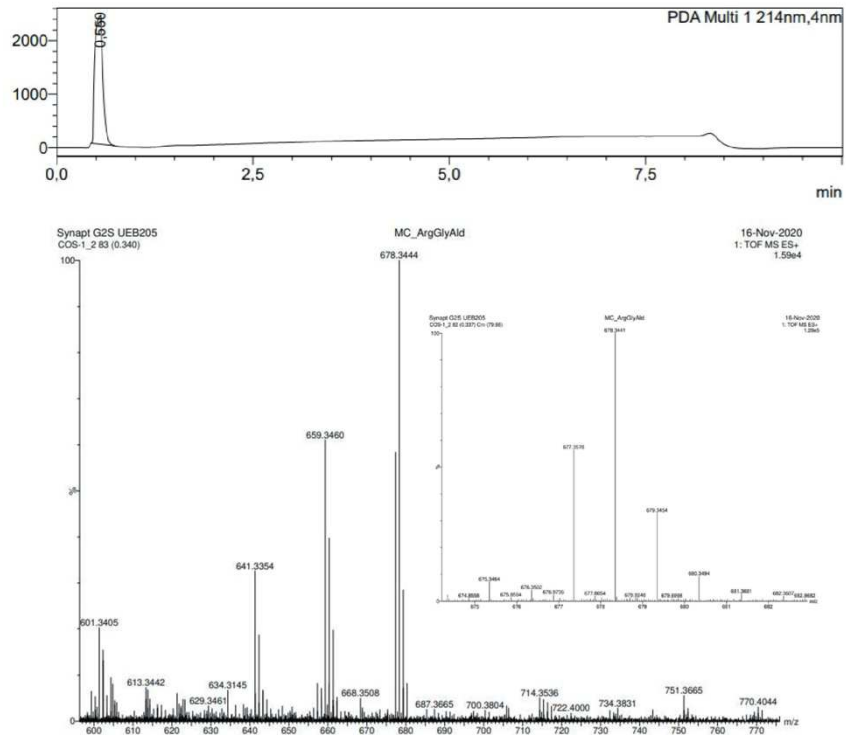


Figure S2: LC/MS analysis: UV chromatogram (top) and HR-ESI-MS MS spectrum (bottom).

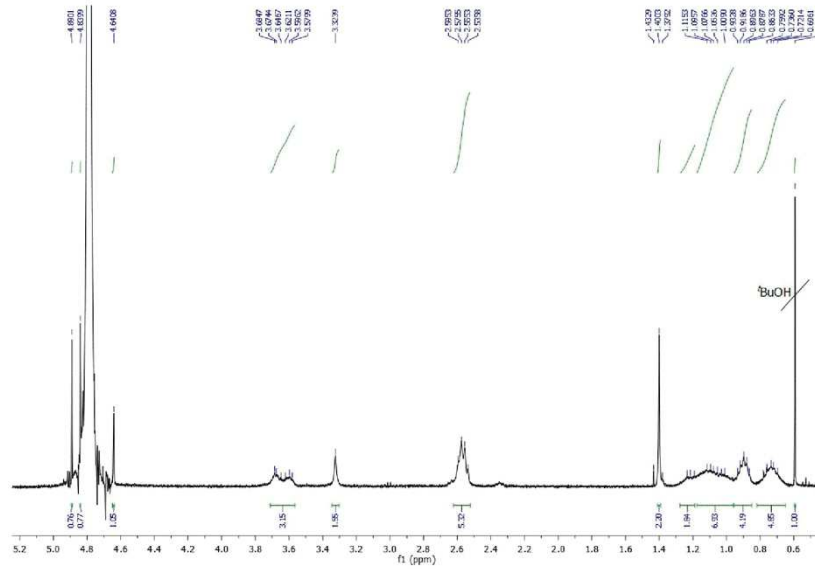


Figure S3: ¹H NMR (400 MHz, D₂O) spectrum of Ald₁.

b. Synthesis of Ald2

Compound 2. The peptide was synthesized on an AmphiSphere rink amide resin (loading 0.37 mmol/g) according to the general procedure using Fmoc-L-Lys[Boc-L-Ser(O^tBu)]OH, Fmoc-L-Lys[N-4-pentynoic acid]-OH and Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH. The crude product was obtained after precipitation in Et₂O and freeze drying. The compound **4** was obtained after purification on preparative [HPLC 1] (gradient: 100 % A, 5 min, then 100 % A to 40 % A/B in 60 min) to provide 138 mg (31 %). LC/MS t_R: 0.662 min. HR-ESI-MS m/z calcd for [C₃₇H₆₇N₁₃O₁₀+H]⁺ 854.5134, found 854.5223; [C₃₇H₆₇N₁₃O₁₀+2H]²⁺ 427.7567, found 427.7649, [C₃₇H₆₇N₁₃O₁₀+3H]³⁺ 285.5044, found 285.5128.

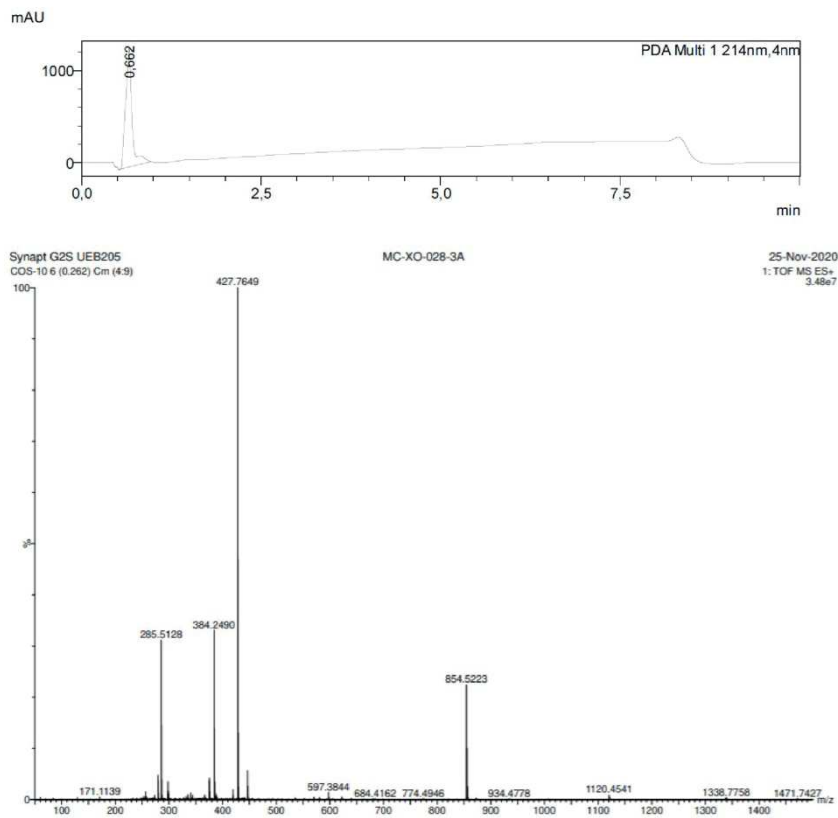
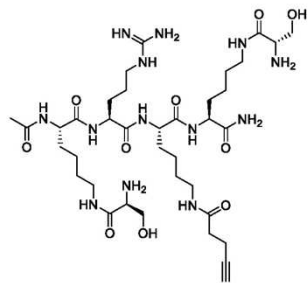


Figure S4: LC/MS analysis: UV chromatogram (top) and HR-ESI-MS MS spectrum (bottom).

Compound 3. The oxidative cleavage was carried out by dissolving **4** (50 mg, 0.063 mmol, 1 eq.) in H₂O (10 mM) and then adding NaIO₄ (135 mg, 0.63 mmol, 10 eq.). After 3 hours stirring, the desired product was then purified by preparative [HPLC 1] using the following gradient of ACN/TFA 99.9/0.1 into H₂O: 0 to 25% in 25 min, then 25% to 100% in 10 min to provide 26.3 mg (57 %). LC/MS: t_R 1.506 min. HR-ESI-MS m/z calcd for [C₃₅H₅₇N₁₁O₁₀+H]⁺ 792.4290, found 792.4373; [C₃₅H₅₇N₁₁O₁₀+H+H₂O]⁺ 810.4290, found 810.4468; [C₃₅H₅₇N₁₁O₁₀+H+2H₂O]⁺ 828.4290, found 828.4579.

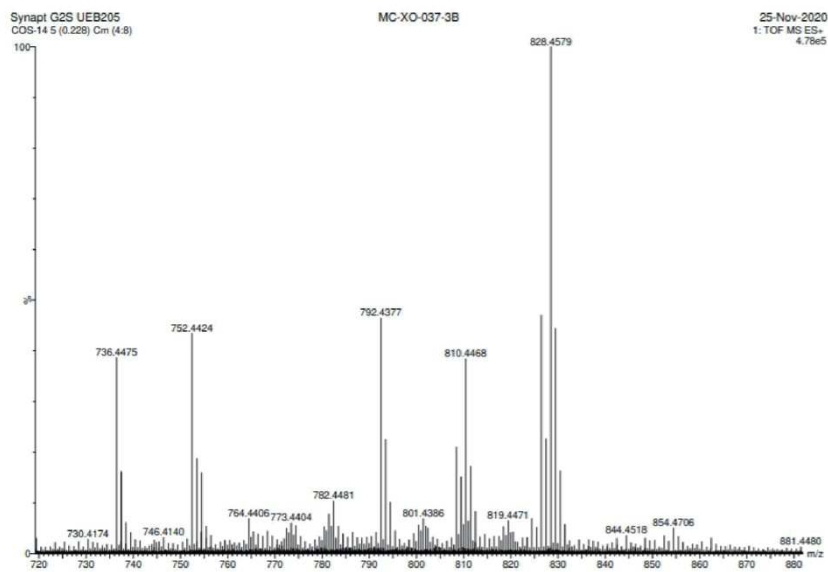
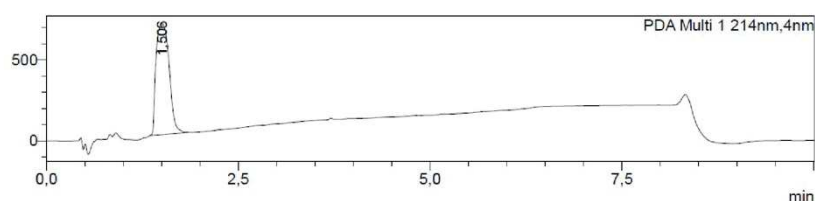
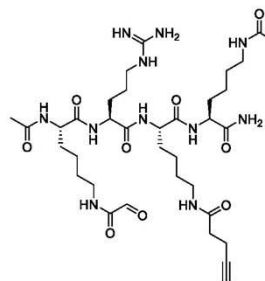
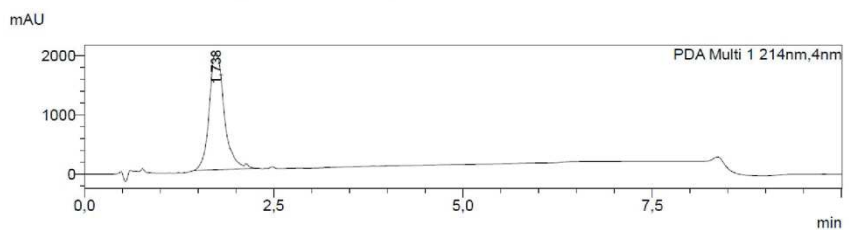
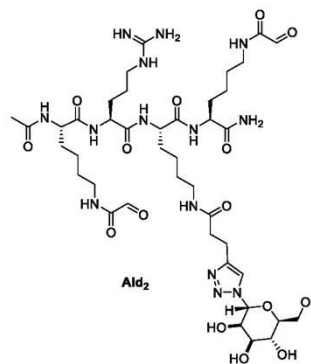


Figure S5: LC/MS analysis: UV chromatogram (top) and HR-ESI-MS spectrum (bottom).

Ald₂. α -D-mannopyranosyl azide **6** (20.443 mg, 0.1 mmol, 3 eq.) and alkyne derivative **4** (26.3 mg, 0.03 mmol, 1 eq.) were dissolved in H₂O/BuOH (1/1) solution. Na ascorbate (0.6 mg, 0.003 mmol, 0.1 eq.), CuSO₄·5H₂O (0.24 mg, 0.0015 mmol, 0.05 eq.) and DIPEA (25 μ L, 0.15 mmol, 5 eq.) were added to the solution. The mixture was stirred for 24 h at 50 °C. The solvent was then removed *in vacuo*. After the reaction, the crude material was then solubilized in H₂O and purified on preparative [HPLC 1] (gradient: 90 % A, 5 min, then 90 % A to 40 % A/B in 50 min) to provide 2.75 mg of **Ald₂** (20%). LC/MS: t_R 1.738 min; m/z calcd for [C₄₁H₆₈N₁₄O₁₅+H]⁺ 997.50, found 997.45; [C₄₁H₆₈N₁₄O₁₅+2H]²⁺ 499.25, found 499.40; [C₄₁H₆₈N₁₄O₁₅-H]⁻ 995.50, found 995.35. HR-ESI-MS m/z calcd for [C₄₁H₆₈N₁₄O₁₅+H]⁺ 997.4989, found 997.5052.



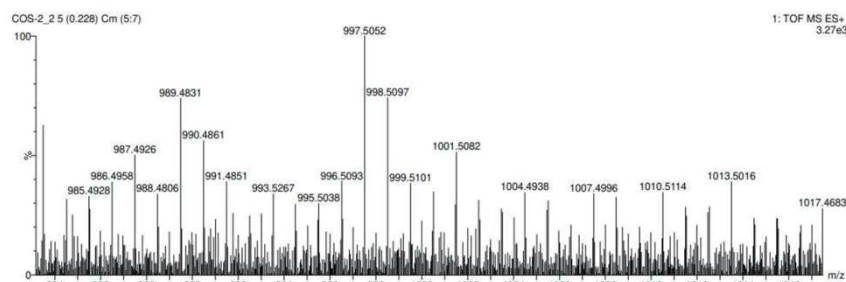
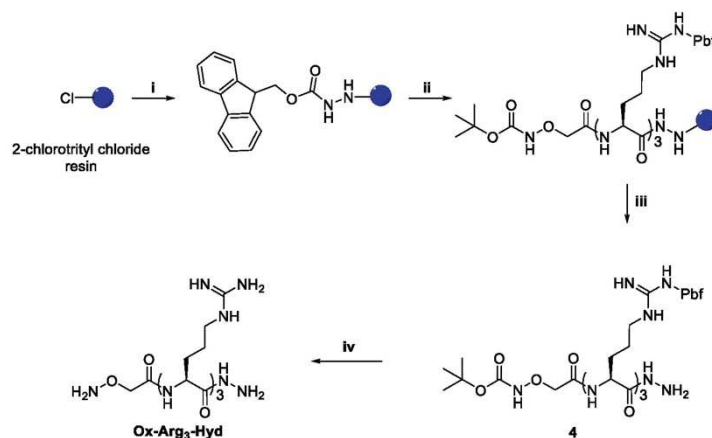


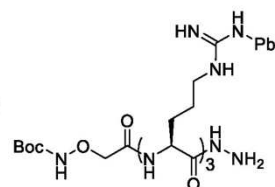
Figure S6: LC/MS analysis (UV chromatogram, top; extracted ESI-MS spectrum, middle), and ESI-HR-MS spectrum (bottom).

3. Synthesis of Ox-Arg₃-Hyd



Scheme S2: General synthetic scheme for the preparation of Ox-Arg₃-Hyd. i) resin modification, ii) SPPS, iii) mild cleavage, iv) deprotection. Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl.

Compound 4. The peptide was synthesized according to the general SPPS procedure using Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH and N'-Boc-aminoxyacetyl N-hydroxysuccinimide ester. The crude product was obtained after freeze drying. The compound **4** was obtained after preparative [HPLC 2] purification (gradient: 0 min, 80% A, 20% B; 5 min, 80% A, 20% B; 45 min, 20% A, 80% B; 50 min, 100% B). 405 mg were obtained (77%). HPLC t_R : 5.12 min. HR-ESI-MS m/z calcd for $[C_{64}H_{99}N_{15}O_{16}S_3+H]^+$ 1430.6635, found 1430.6597; $[C_{64}H_{99}N_{15}O_{16}S_3+2H]^{2+}$ 715.8356, found 715.8364.



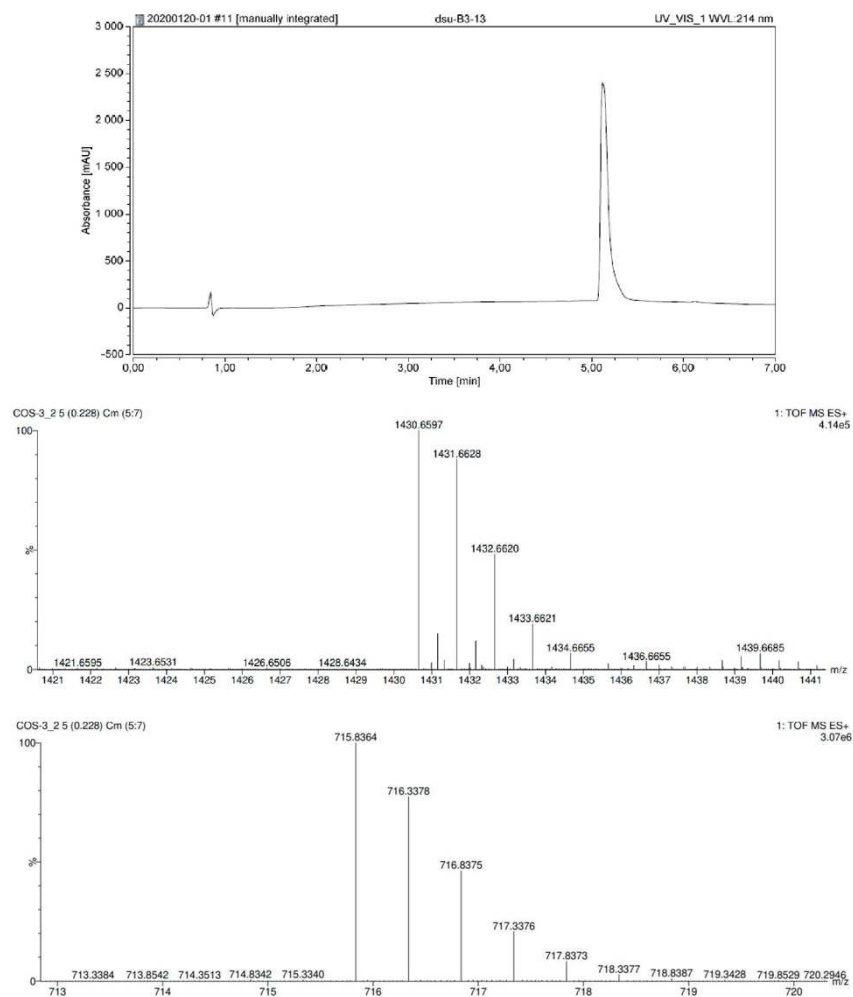
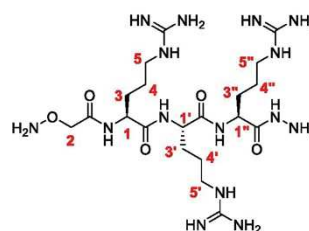


Figure S7: HPLC chromatogram (top) and HR-ESI-MS spectra (bottom).

Ox-Arg₃-Hyd. Compound **4** were deprotected with a TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) solution (30 mL) for 12 hours. The solution was concentrated, precipitated by adding Et₂O, and centrifuged. The supernatant was removed and the crude material was freeze-dried to give 23 mg (11%) of a white solid. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.34 (s, 2H, H₂), 4.07-3.98 (m, 3H, H₁), 3.24-3.21 (m, 6H, H₅), 1.90-1.76 (m, 6H, H₃), 1.71-1.56 (m, 6H, H₄). LC/MS: t_R 0.388 min; HR-ESI-MS m/z calcd for [C₂₀H₄₃N₁₅O₅+H]⁺ 574.3572, found 574.3649.



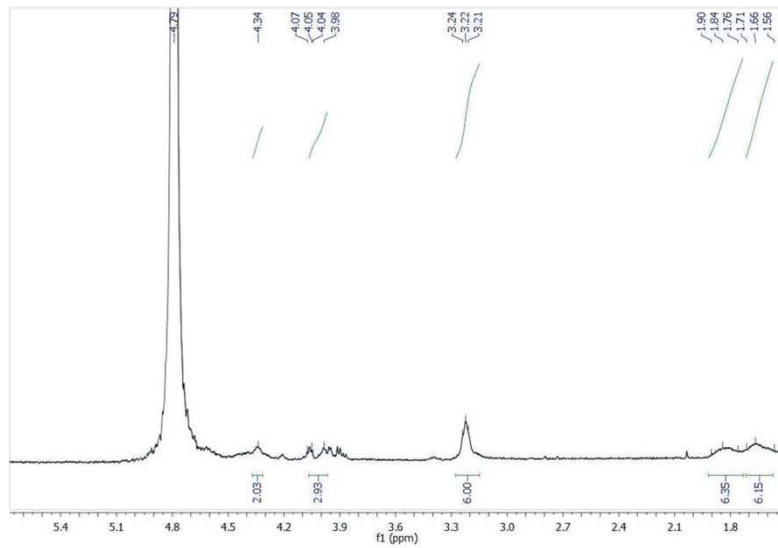


Figure S8: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) spectrum of Ox-Arg₃-Hyd.

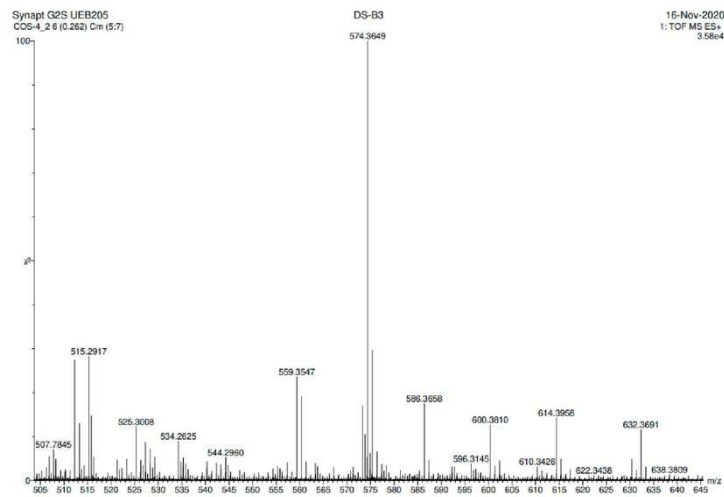
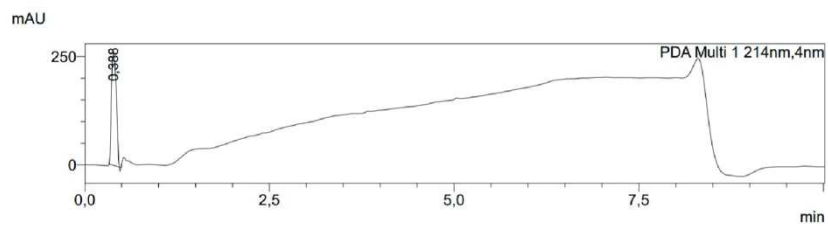


Figure S9: LC/MS analysis: UV chromatogram (top) and HR-ESI-MS spectrum (bottom).

4. Dynamic Light Scattering (DLS)

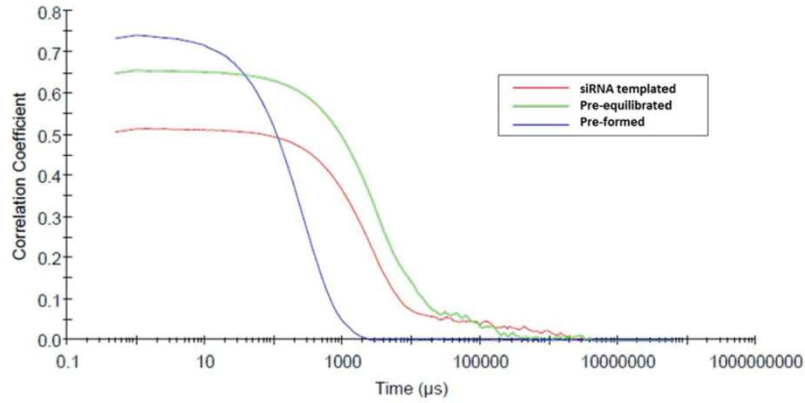


Figure S10: DLS correlograms for the the pre-formed DCP1 (blue), the siRNA-templated DCL1 (red), and the pre-equilibrated DCL1 (green).

5. Knock-down of luciferase activity on MCF-7 breast cancer cells

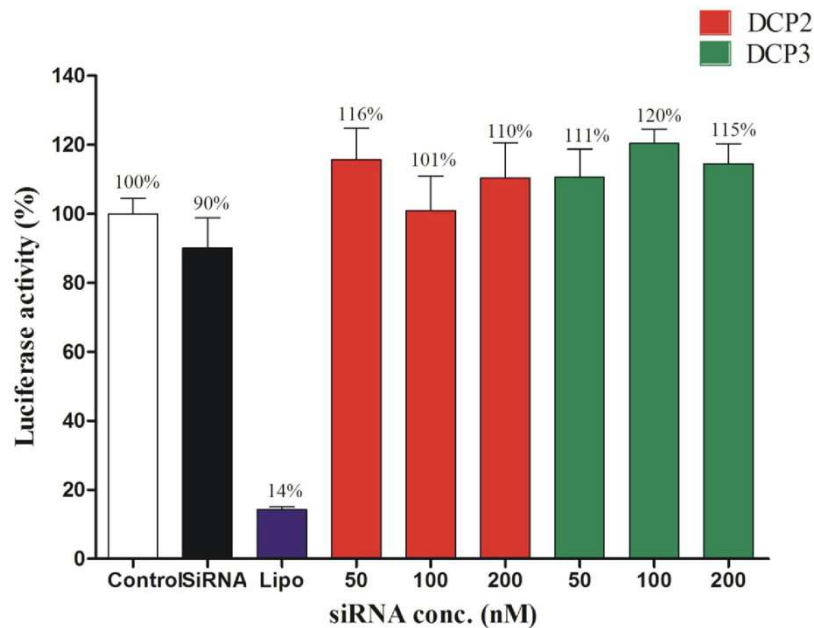


Figure S11: Knock-down of luciferase activity by DCPs/siLuc on MCF-7-Luc cells. The DCPs are made *in situ* from siRNA-templated DCLs. White bar: MCF-7-Luc cells without any treatment; black bar: cells incubated with siLuc alone at 100 nM; colored bars: cells transfected with DCPs/siLuc at N/P = 20 with siLuc concentrations of 50, 100, and 200 nM. The luciferase activity was adjusted depending on cell viability of each condition. The results were the average of three independent experiments (means \pm SEM).

6. Confocal fluorescence microscopy on MCF-7 breast cancer cells

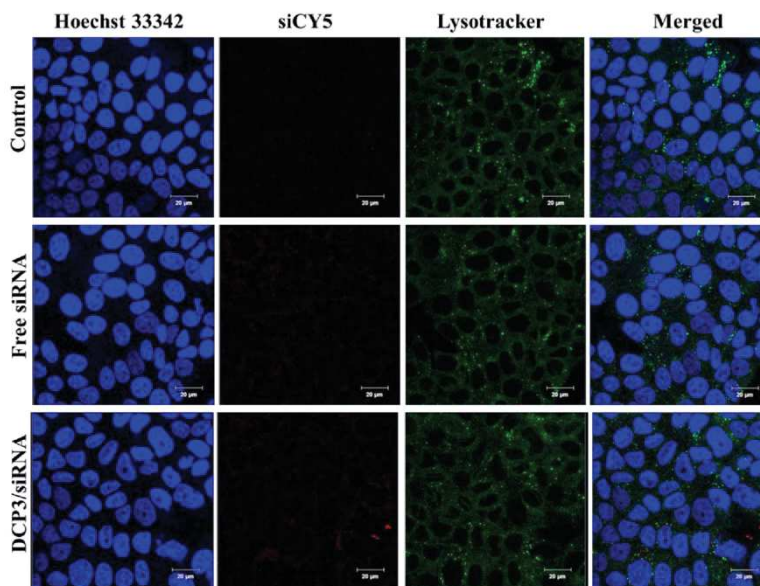


Figure S12: Confocal microscopy imaging of cellular uptake and co-localization (LysoTracker® Green) of red stained siCY5 alone and complexed by DCP3 in MCF-7 breast cancer cells. Scale bars represent 20 µm.

7. References

- [1] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
- [2] a) V. Dulery, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952-11958; b) M. Kurono, A. Shimomura, M. Isobe, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1773-1780.
- [3] E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy, S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9427-9438.
- [4] Y. C. Huang, C. C. Chen, S. J. Li, S. Gao, J. Shi, Y. M. Li, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2951-2955.
- [5] M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576-2579.
- [6] a) T. Machida, K. Lang, L. Xue, J. W. Chin, N. Winssinger, *Bioconj. Chem.* **2015**, *26*, 802-806; b) T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.* **2009**, 3378-3379; c) P. I. Abronina, V. V. Kachala, L. O. Kononov, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 240-244.
- [7] P. Kumar, A. Nagarajan, P. D. Uchil, *Cold Spring Harb Protoc.* **2018**, *6*, doi: 10.1101/pdb.prot095505.

3. Conclusion et perspectives

Dans cette partie de ma thèse, nous avons conçu des PDC composés de peptides modifiés cationiques et fonctionnalisés par du *D*-mannose. Nous avons ainsi démontré que ces nouveaux « building blocks » peuvent s'auto-assembler *in situ*, même à de très faibles concentrations par un effet template de siRNA. Nous avons mis en évidence, par des techniques complémentaires (électrophorèse sur gel, mesures de DLS et de potentiel ζ), des effets de template par lesquels le siRNA guide la formation des PDC actifs. Pour finir, nous avons montré pour la première fois une délivrance ciblée de siRNA à l'aide de PDC auto-assemblés induits par le siRNA et présentant une multivalence du ligand de ciblage.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu suivre et participer à la synthèse chimique et la caractérisation des monomères Ald1, Ald2 et Ox-Arg₃-Hyd pour cette étude. Mon travail a permis de mettre en évidence non seulement l'aspect d'auto-assemblage *in situ* de PDC par effet template du siRNA mais également le potentiel de la vectorisation ciblée du siRNA pour des applications de thérapie génique anti-cancéreuse. En fonctionnalisant le monomère peptidique avec du *D*-mannose, nous avons montré que les PDC correspondants favorisent l'internalisation cellulaire en se liant aux récepteurs du mannose. Ces derniers résultats nous indiquent que la surexpression du récepteur mannose pourrait être un biomarqueur du développement du cancer colorectal et une cible thérapeutique intéressante pour la vectorisation du siRNA.

Ces résultats représentent une première preuve de concept pour l'application des PDC dans la délivrance de siRNA et nous pensons que notre approche simple d'auto-production de PDC multifonctionnels en tant que vecteurs ciblant de siRNA ouvrira de nouvelles perspectives dans la délivrance de gènes *in vivo*.

Chapitre IV : Auto-assemblage supramoléculaire de complexes porphyrine-siRNA pour une thérapie duale.

Pour cette dernière partie, l'étude d'auto-assemblage supramoléculaire de porphyrines pour la délivrance simultanée de siRNA et la PDT est présentée par un article scientifique dont je suis premier auteur [436]. Cette étude a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Geneviève Pratviel du Laboratoire de Chimie de Coordination à Toulouse pour la synthèse et la caractérisation de la porphyrine.

1. Contexte et objectifs

Malgré les deux approbations récentes de thérapie par interférence de gène et des progrès croissants dans ce domaine, la délivrance ciblée de siRNA reste un problème critique et connaît encore des limitations pour les applications anti-cancéreuses. Pour cela, les thérapies combinées sont apparues comme une nouvelle stratégie qui permet à la fois de potentialiser l'effet thérapeutique et de limiter les effets indésirables.

Afin de combiner la thérapie photo-dynamique à la thérapie génique par délivrance de siRNA, des systèmes basés sur un PS hydrophobe incorporé dans des nanoparticules inorganiques ou des micelles cationiques ont été développés [437], [438]. Cependant, ces nano-outils peuvent présenter plusieurs limitations, tels que l'agrégation du PS conduisant à une production réduite de ROS (Reactive Oxygen Species) [439]. Pour ces raisons, le développement de systèmes alternatifs qui complexent efficacement le siRNA et induisent sa libération est nécessaire.

Pour cela, différentes études ont exploité les propriétés supramoléculaires des porphyrines cationiques pour la combinaison de deux thérapies permettant respectivement de générer de la PDT/chimiothérapie, PDT/thérapie photo-thermique (PTT), PDT/thérapie génique et PDT/immunothérapie [440]

Dans cette étude, nous avons mis au point et caractérisé *in vitro* l'utilisation de porphyrines cationiques pour développer une thérapie combinée (thérapie photo-dynamique et délivrance

de siRNA pour la thérapie génique). Nous avons proposé une approche d'auto-assemblage supramoléculaire en utilisant une simple porphyrine cationique à la fois comme photosensibilisateur et vecteur de siRNA afin de combiner la PDT avec la thérapie génique (Figure 36).

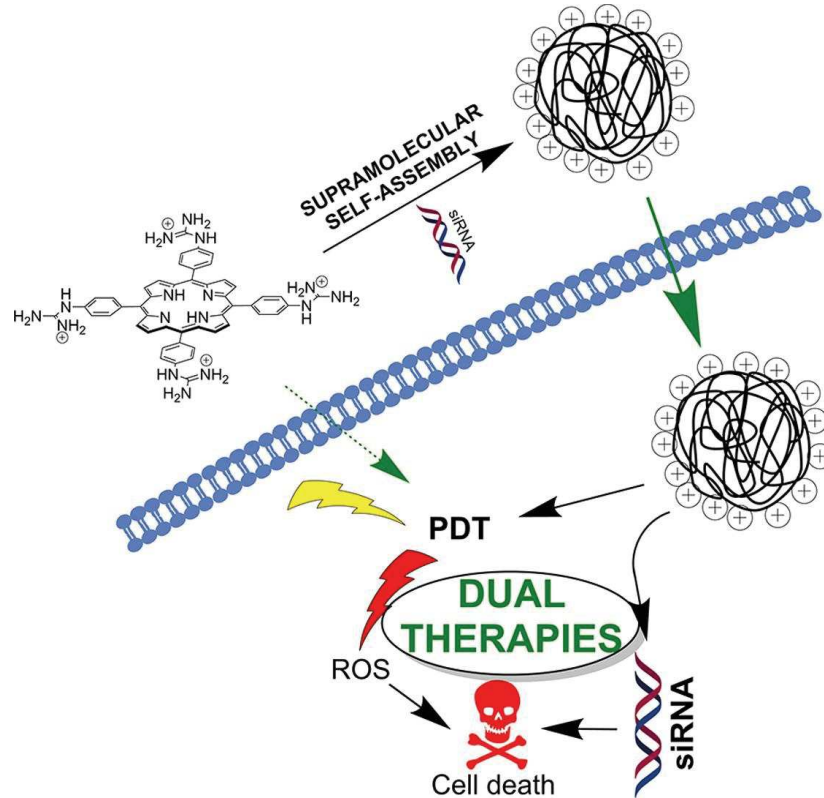


Figure 36 : Représentation schématique de la thérapie combinée : PDT et thérapie d'interférence

2. Aperçu des principaux travaux

Dans ce travail, nous avons sélectionné la tétra-hydrochlorure de méso-5,10,15,20-tétrakis(4-guanidinophényl) porphyrine (H₂-PG). H₂-PG est une petite molécule soluble dans l'eau qui possède une bande Soret centrée à 415 nm.

Il a été montré que plusieurs porphyrines pouvaient s'auto-assembler en polymères supramoléculaires mais pouvaient aussi reconnaître l'ADN et s'y lier comme un ligand synthétique *via* différents types d'interactions en fonction de leur taille ainsi que de leur nature [441]. D'une manière générale, la liaison à l'ADN peut se produire selon trois différents modes :

i) intercalation au niveau des paires de bases, ii) interaction dans le sillon, iii) interaction externe avec le squelette phosphodiester.

Pour cela, il est important d'étudier la nature de ces interactions. Dans ce travail, nous avons exploré le mode spécifique d'interaction de H₂-PG avec les acides nucléiques par spectroscopies UV-Vis, fluorescence et dichroïsme circulaire. Nous avons ainsi démontré que la porphyrine cationique H₂-PG interagissait avec l'ADN simple brin par des liaisons externes en reconnaissant les charges du squelette phosphodiester, donnant ainsi des polymères supramoléculaires avec un auto-empilement (π - π stacking) assisté par l'ADN simple brin (Figure 2 de l'article). Cependant, en utilisant de l'ADN plus long et double brin, nous avons observé une interaction par plusieurs modes de liaison pour la poly-association de H₂-PG, y compris l'intercalation. Des résultats similaires ont été décrits entre les porphyrines cationiques de cuivre (II) et l'ARN double brin [442].

Dans la continuité de ce travail, j'ai étudié le potentiel de la thérapie duale (PDT et thérapie génique) *in vitro* en réalisant tout d'abord des analyses physico-chimiques sur le complexe H₂-PG/siRNA formé et des études biologiques montrant l'internalisation de H₂-PG/siRNA fluorescent (siCtrl-ATTO488) notamment par microscopie confocale et cytométrie en flux. Ces différentes études montrent la formation de complexes H₂-PG/siRNA (N/P=5) ayant une taille de 200 à 500 nm de diamètre et présentant une capacité d'internalisation élevée dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231. En effet, nous avons observé que la porphyrine seule était capable de pénétrer de manière quantitative (~100% de fluorescence de H₂-PG) dans les cellules et que le complexe formé H₂-PG/siRNA est également internalisé, dans lesquelles une partie significative de H₂-PG était associée au siRNA (~ 23% de fluorescence de H₂-PG + siCtrl-ATTO488) (Figure 4 et figure 5 de l'article).

Enfin, afin de montrer l'effet duale thérapeutique PDT + siRNA, j'ai réalisé une étude de photo/gène-toxicité sur les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 en utilisant un siRNA inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique IAP (siIAP). Les résultats montrent un puissant effet entre la thérapie génique et la PDT. En effet, près de 75% de mortalité cellulaire a été observé lorsque les cellules ont été incubées avec le complexe H₂-PG/siIAP suivi d'une irradiation (Figure 6a de l'article). Afin d'explorer davantage cette étude et de décrire l'interaction entre ces deux thérapies, ces résultats ont été soumis à un traitement de données à l'aide du logiciel CompuSyn (ComboSyn, Inc) [443], qui donne des indices de combinaison (IC) qui sont inférieurs à 1 en cas d'interactions synergiques, égaux à 1 en cas d'interactions

additives, et supérieurs à 1 en cas d'interactions antagonistes. Dans notre cas, le score IC était proche de 1, ce qui signifie que la PDT a agi de manière additive avec l'interférence de gène en produisant une cytotoxicité dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 6b de l'article).

La dernière partie était consacrée à l'étude d'expression de la protéine IAP. Pour ce faire, j'ai mesuré la diminution de l'expression de l'IAP après traitement des cellules MDA-MB-231 par la technique In-cell ELISA. L'inhibition de l'expression de l'IAP était plus importante lorsque les cellules étaient traitées avec les complexes H₂-PG-siIAP, entraînant une diminution moyenne de 42% (non irradiée) et de 57% (irradiée) de l'expression de la protéine IAP, par rapport aux complexes formés entre H₂-PG et siScr (Scrambled siRNA) dont la diminution d'expression de la protéine était plus faible (20% d'inhibition pour les cellules non irradiées et 32% pour les cellules irradiées) (Figure 7 de l'article). Par conséquent, cette analyse a montré l'efficacité du complexe H₂-PG/siIAP pour l'inhibition génique des cibles thérapeutiques telles que la protéine IAP.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

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

Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes



Nabila Laroui^a, Maëva Coste^a, Laure Lichon^a, Yannick Bessin^a, Magali Gary-Bobo^a, Geneviève Pratiel^b, Colin Bonduelle^{b,c}, Nadir Bettache^{a,*}, Sébastien Ulrich^{a,*}

^a IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

^b CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination, UPR8241), Université de Toulouse, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

^c Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, Université de Bordeaux/IPB, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Combination therapy
Photodynamic therapy
Gene therapy
Supramolecular self-assembly
Porphyrin
siRNA

ABSTRACT

In this work, we implemented a supramolecular approach in order to combine photodynamic therapy (PDT) with gene therapy. We made use of a simple cationic guanidylated porphyrin (H_2 -PG) with the hypothesis that porphyrin aggregates should be capable of complexing siRNA through multivalent interactions and thus contribute to its intracellular delivery, while remaining active photosensitizers for PDT. The PDT effect of H_2 -PG was shown by incubating human breast cancer cells (MDA-MB-231) with H_2 -PG followed by light-irradiation at 405 nm. On the other hand, while siRNA do not enter cells alone, we showed, by fluorescence confocal microscopy and flow cytometry, that H_2 -PG promotes the internalization of Atto-488 siRNA. Finally, studying the combined PDT and delivery of siRNA directed against inhibitory apoptotic protein (IAP) family, we found an additive effect of the two therapies, thereby demonstrating that H_2 -PG is capable of acting both as a photosensitizer and supramolecular siRNA vector.

1. Introduction

Cancer is an extremely complex disease which remain a major threat to human health (David and Zimmerman, 2010). The current therapeutic arsenal based on chemotherapy and radiotherapy generates many side effects due to off target interactions and in some cases shows limited efficacy. Therefore, combination therapies are attracting growing interest in nanomedicine (Kemp et al., 2016). It is expected that, by attacking several pathways at once, one would enhance the overall effect and limit resistance. Additive effects of the two treatments, or even synergistic effects, whereby one treatment amplifies the effect of the second one, are actively pursued. In this context, the combination of Photo Dynamic Therapy (PDT) with gene therapy can be particularly promising since mechanisms of photochemical internalization (Shieh et al., 2008) and/or photoinduced endosomal release (de Bruin et al., 2008) could lead to such synergistic effects (Fig. 1).

Gene therapy using siRNA to knockdown the expression of a target gene has become an effective way for gene silencing approaches (Schlupe et al., 2017; Wagner et al., 2017; Strumberg et al., 2012). However, several limitations remain in the clinical applications of RNA interference such as poor distribution and high instability of siRNA in the body fluid as it is degraded by ribonucleases. Moreover, the issue of

intracellular delivery remains central in this area.

PDT is the fourth strategy used against cancer in the clinic (after surgery, chemo- and radio-therapy) which is minimally invasive and features high spatio-temporal specificity (Dolmans et al., 2003). PDT requires Photosensitizers (PS), such as porphyrins (Almeida-Marrero et al., 2018; Ethirajan et al., 2011), which are associated with light at an appropriate wavelength to generate Reactive Oxygen Species (ROS), including singlet oxygen (1O_2), to induce cell death and tissue destruction through apoptosis or necrosis pathways (Dolmans et al., 2003; Sun et al., 2018; Oniszczuk et al., 2016). The mechanism of action of PDT is based on the light-activation of PS and subsequent energy transfer to the surrounded molecular oxygen (O_2) which leads to the production of ROS. The current developments of PDT include the design of smart photosensitizers (Luby et al., 2019) among which supramolecular photosensitizers are emerging (Li et al., 2018).

Only a few examples of studies combining PDT and gene delivery have been documented, using covalent siRNA vector-photosensitizer conjugates (Chitgupi et al., 2017), porous organo-silica nanoparticles (Mauriello Jimenez et al., 2018), dendrimers (Nishiyama et al., 2007), polydiacetylenicellar nanocarriers (Ripoll et al., 2018), and polyelectrolytes (Zhao et al., 2017).

In this work, we pursued a supramolecular approach to combine

* Corresponding authors.

E-mail addresses: nadir.bettache@umontpellier.fr (N. Bettache), Sebastien.Ulrich@enscm.fr (S. Ulrich).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118585>

Received 29 March 2019; Received in revised form 29 July 2019; Accepted 30 July 2019

Available online 31 July 2019

0378-5173/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

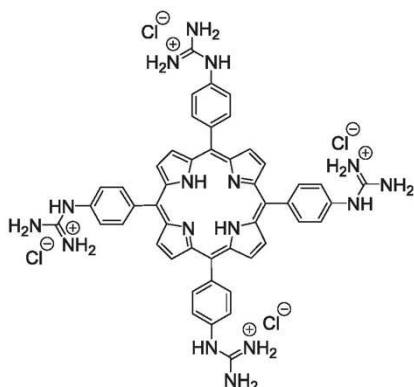


Fig. 1. Chemical structure of H_2 -PG.

PDT with gene therapy using a simple cationic porphyrin as a dual photosensitizer and supramolecular siRNA vector. Our rationale was that porphyrins are well-known PS for PDT, and at the same time they are prominent building blocks for the generation of supramolecular self-assemblies (D'Urso et al., 2012). Therefore, we thought of using cationic porphyrins for their role as PS and for generating multi-cationic porphyrin aggregates that would promote the multivalent complexation and intracellular delivery of siRNA (Bartolami et al., 2016). Based upon our previous works on porphyrin-based G-quadruplex DNA ligand (Sabater et al., 2015) and DNA-templated self-assembly of aromatic guanidiniums (Paolantoni et al., 2015; Paolantoni et al., 2014), we selected meso-5,10,15,20-tetrakis(4-guanidinophenyl)porphyrin tetrahydrochloride (H_2 -PG) for this study. H_2 -PG is water-soluble and has a Soret band centered at 415 nm ($\epsilon = 430000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The aromatic guanidiniums have $pK_a = 9.8$ while the inner core has a $pK_a = 3.8$, therefore H_2 -PG is considered a tetracationic species.

2. Material and methods

2.1. Material

H_2 -PG was synthesized as previously described (Sabater et al., 2015; Perrier et al., 2016). The oligonucleotides dT_{10} and dT_{40} were purchased from Eurogentec as HPLC-RP purified (Ultrapure Gold, > 95% purity) in dried format. Calf thymus DNA (CT-DNA) was purchased from Sigma-Aldrich. The siRNA inhibitor apoptotic protein (siAP) targeting sequence (sense: 5'-CUAGGAGACAGUCCUAUUCdTdT-3' and anti-sense 5'-GAAUAGGACUGUCUCCUAGdTdT-3'), the control siRNA labeled with Atto-488 (Atto-488-siCtrl) (sense: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense 5'-UCGAAUUCGCGUACGdTdT-3'), the siRNA without biological activity, used as control (siCtrl) (sense: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense 5'-UCGAAUUCGCGUACGdTdT-3') and the siRNA scramble (siScr) (Sense: 5'-GAAUUCGCGUACGUAUUCAdTdT 3' and anti-sense: 5'-GGCAUUUACGCGUAAAGAUdTdT 3') were purchased from Eurogentec (Serring, Belgium). Lipofectamine RNAiMAX was purchased from Invitrogen (USA). The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellowtetrazole) assay kit was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2. UV-Vis absorption spectroscopy

UV-Vis absorption experiments were measured on UV-3100pC UVisco spectrophotometer. Experience with dT_{10} : 20 μL of a stock solution of dT_{10} (10 mM in H_2O), placed in a 1 mm Quartz cuvette

(volume completed to 400 μL with H_2O) was titrated by adding aliquots of H_2 -PG from a stock solution (5 mM in H_2O). Experience with CT-DNA: 2 μL of H_2 -PG (from a stock solution of 5 mM in H_2O), placed in a 1 mm Quartz cuvette (volume completed to 400 μL with H_2O), was titrated by adding aliquots of CT-DNA from a stock solution of 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in H_2O .

2.3. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence analyses were carried out on an AF-2500 HITACHI fluorescence spectrophotometer. 0.2 μL of H_2 -PG (from a stock solution of 5 mM in H_2O), placed in a 1 mm Quartz cuvette (volume completed to 400 μL with H_2O), was titrated by adding aliquots of dT_{10} (10 mM stock solution in H_2O). Excitation wavelength: 415 nm.

2.4. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism measurements were recorded using a JASCO J-815 CD Spectrophotometer. The measurements were carried out at 20 $^\circ\text{C}$ using a 1 mm quartz cells (Starna scientific). The spectra were recorded between 220 and 500 nm, with a bandwidth of 1 nm and time per point of 0.5 s. Baseline signals (recorded with water) were subtracted from the CD spectra of the samples. 9.81 μL of dT_{40} (stock solution of 143 μM in H_2O) were placed in the cell, completed with 190 μL of H_2O and then titrated with H_2 -PG (stock solution of 5 mM in H_2O).

2.5. Cell line

MDA-MB 231 human breast cancer cells were purchased from ATCC. Cells were grown in phenol red-free F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% gentamycin 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cells were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere with 5% CO_2 .

2.6. Gel electrophoresis with siRNA

Gel retardation assays with siRNA were performed using 10 μL of a 4 μM siCtrl, which were mixed with the appropriate amounts of porphyrins H_2 -PG (in order to reach the desired N/P ratio (The commonly used N/P ratio refers to the number of positive charges brought by the H_2 -PG vector divided by the number of negative charges brought by the nucleic acid) in RNase free water to obtain a final volume of 20 μL . 4 μL of Blue 6X loading dye (Fisher Scientific) was added. Electrophoresis was carried out on a 2% weight/volume agarose gel in TBE (90 mM Tris-borate/2 mM EDTA, pH 8.2) at 50 V for 1 h. siRNA was visualized with GelRed™ nucleic acid gel stain (Interchim, France). The reference for the gel is a 100 bp DNA ladder from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The GelRed-stained siRNA was visualized on an ultraviolet transilluminator (InfinityGel documentation Imaging, Vilber Lourmat, France).

2.7. Dynamic light scattering

Particle size measurements were carried out on a Zetasizer Nano-ZS (Malvern, United Kingdom) with transparent ZEN0040 disposable micro-cuvette (40 μL) at 25 $^\circ\text{C}$. The H_2 -PG/siRNA complexes were prepared in glucose 5% at a defined N/P ratio using siCtrl at several concentrations. Measurements were performed immediately after the complexes formation and after 15 min incubation.

2.8. Zeta potential

Zeta potential analyses were carried out on a MALVERN Zetasizer Nanoseries Nano-ZS instrument. The H_2 -PG/siRNA complexes were prepared by mixing appropriate amounts of H_2 -PG and siCtrl to achieve the desired N/P ratio and diluted in glucose 5% and NaCl (5 mM,

pH = 7.0) to obtain a final volume of 1 mL. Measurements were performed at 25 °C and were carried out in DTS 1070 zeta potential cells. 3 measurements were made with 12 runs for each.

2.9. Imaging

One day prior the experiment, MDA-MB 231 cells were plated onto bottom 8-well on cover glass II (SARSTEDT, Germany) at a density of 1.10^5 cells.cm⁻². Adherent cells were then washed once and incubated in 350 µL culture medium containing complex H₂-PG (5 µM)/Atto-488-siCtrl (100 nM) at N/P = 5, H₂-PG alone, at a concentration of 5 µM, Lipofectamine/Atto-488-siCtrl (50 nM) and siRNA Atto488 alone (100 nM) for 20 h. Adherent cells were washed and loaded with 350 µL of Hoechst 33342 (Invitrogen, USA) 1/1000 in culture medium. Prior the observation, cells were washed gently with culture medium, then visualized with a Zeiss LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Microscope, France) at 488 nm for siRNA, 405 nm for H₂-PG porphyrins and 360 nm for Hoechst 33342 using bright field at high magnification (63×/1.4 OIL Plan-Apo).

2.10. Internalization quantification by FACS

Cells were treated or not with H₂-PG (5 µM)/Atto-488-siCtrl (100 nM) at N/P = 5, H₂-PG alone, at a concentration of 5 µM, Lipofectamine/Atto-488-siCtrl (50 nM) and siRNA Atto488 alone (100 nM) for 20 h. After treatment, control and treated cells were washed once in cold Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested and centrifuged (1300 rpm, 5 min). Cell pellet were resuspended in PBS enriched with CaCl₂ + MgCl₂ + and stained with propidium iodide (1 µg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), a cell death indicator. Flow cytometric determination of living cells and treated positive cells was done by FACS Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, France) with a minimum of 5000 living cells collected. Data were analyzed with Kaluza software.

2.11. In vitro photo-induced siRNA delivery

The day prior to transfection, 2.10^3 cells were seeded into a 96 well plate in 100 µL complete culture medium and incubated for 24 h. H₂-PG at 5 mM in ultrapure water were vortexed for 5 sec and ultrasonically mixed for 15 min. siAP and siScr at 100 µM in RNase free water were mixed with H₂-PG in order to reach the desired N/P. The mixtures freshly prepared were incubated for 15 min at room temperature for pairing. The lipofectamine RNAiMAX was mixed with siAP (50 nM final concentration) according to the instructions of the manufacturer (0.3 µL of lipofectamine/well for a 96 well plate). Then, cells were incubated overnight with several concentrations of H₂-PG alone (5 µM or 25 µM) or paired with siRNA (100 nM or 500 nM). After incubation, the cells were irradiated (or not) with laser at 405 nm (KAMAX, France) for 10 min. Two days after irradiation, MTT assay was performed to evaluate the cell death. Briefly, cells were incubated for 4 h with 0.5 mg.mL⁻¹ of MTT in media. The MTT/media solution was then removed and the precipitated crystals were dissolved in EtOH/DMSO (1:1). The absorbance was read at 540 nm.

2.12. In-cell ELISA

MDA-MB 231 cells (1.10^4 cells/well; 70% confluence) were seeded in a 96 wells plate and incubated overnight at 37 °C in 5% CO₂. Cells were treated with the several conditions as mentioned above then were fixed with PBS-4% PFA for 15 min, washed and blocked with Blocking Solution "BS" for 30 min. Supernatants were then gently aspirated and the primary antibody (Rabbit polyclonal anti-cIAP, GeneTex) diluted 1:1000 in BS/washing buffer "WB" was added and incubated overnight at 4 °C. The reaction was revealed using an anti-Rabbit-peroxidase conjugate (1:400 in WB; 30 min at RT). After three washes with WB, the

TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate was added and incubated for 15 min at room temperature protected from light. The reaction was stopped with a TMB STOP solution and plate was read at 450 nm. To account for differences in cell seeding, density was normalized to the Janus Green staining dye. Briefly, after the in-cell assay protocol was completed, the plate was washed twice with ultrapure water and Janus Green stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) was added (100 µL/well). The plate was incubated for 5 min at room temperature. Then, the dye was removed and after 5 washes, the plate was incubated with 100 µL elution buffer and read at 615 nm. Once normalized, TMB-optical density (OD) values of each sample were subtracted from the mock-treated wells (corrected OD values) and averaged from triplicate wells. Each assay was repeated at least twice.

3. Results and discussion

3.1. H₂-PG/DNA interactions and mode of binding

Porphyrin can self-associate into supramolecular polymers, (D'Urso et al., 2012) but cationic porphyrins are also known to be excellent DNA ligands. (Pratviel, 2016) Generally speaking, DNA binding can occur according to three different modes (intercalation, (Hafshejani et al., 2015; MoradpourHafshejani et al., 2013) groove binding, (Hannah and Armitage, 2004; Wang et al., 2000) external binding (Paolantoni et al., 2015; Paolantoni et al., 2014) and all of them have been reported with cationic porphyrins of different structures varying the position and size of their substituents, and the nature, number and position of positive charges (Pratviel, 2016; Fiel, 1989; Carvlin and Fiel, 1983; Fiel et al., 1979). Wishing to explore the specific mode of binding of H₂-PG, we studied its interaction with different types of DNA, single- and double-stranded, by UV-Vis, fluorescence, and circular dichroism spectroscopies.

UV-Vis titration using a dT₁₀ single-strand DNA (ssDNA) showed hypochromic and bathochromic shifts of the absorbance of H₂-PG (Fig. 2a). Fluorescence measurements showed a sharp decrease in the fluorescence emission around a ligand/nucleobase ratio of 1–2, with a 10 nm red-shift (Fig. 2b). In the presence of a dT₄₀ ssDNA, CD spectroscopy revealed the formation of a bisignate CD signal centered around the Soret band of H₂-PG with a zero crossing around 410–415 nm (Fig. 2c). Altogether, these results points toward an external binding with DNA-templated self-stacking of H₂-PG (Surin, 2016; Gaier et al., 2014; Janssen et al., 2007), which we previously reported with ssDNA templates and guanidylated ligands (Paolantoni et al., 2015; Paolantoni et al., 2014). Indeed, the bisignate signal observed in CD spectroscopy reveals the presence of excitons which result from the close proximity between adjacent H₂-PG (Garbett et al., 2007). Given the fact that ssDNA templates do not offer the possibility for groove binding, we propose that this ssDNA-templated self-assembly involves salt-bridge interactions between guanidinium groups and DNA phosphodiester, and π -stacking of H₂-PG into 1D supramolecular polymers. Using longer and double-stranded (ds) DNA (Calf-Thymus DNA, CT-DNA), UV-Vis titration experiments showed the splitting of the Soret band of H₂-PG into two separate peaks, one bathochromically- and one hypsochromically-shifted (Fig. 2d). This may reveal a more complex situation with long dsDNA templates, compared to ssDNA, which offer multiple modes of binding for the poly-association of H₂-PG, including the intercalation described between cationic copper(II) porphyrins and dsRNA (Briggs et al., 2012).

3.2. H₂-PG/siRNA complexation

To demonstrate complexation of siRNA, we assessed H₂-PG/siRNA complex formation by agarose shift assay (Fig. 3a). This assay was used to follow the complexation state in a charge ratio-dependent manner because siRNA migration into the agarose gel will be prevented by porphyrin interactions. In this experiment we used siCtrl and tested

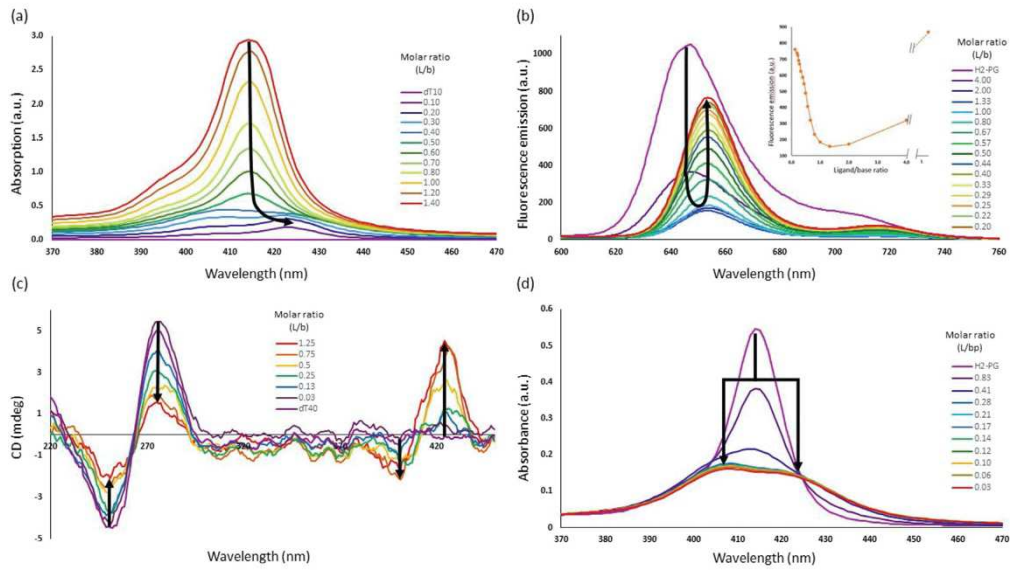


Fig. 2. H₂-PG/DNA interactions studied by optical spectroscopies. (a) UV-Vis titration of a ssdT₁₀ by H₂-PG; (b) Fluorescence titration of H₂-PG by ssdT₁₀ (Inset: fluorescence emission at 655 nm as a function of the H₂-PG/nucleobase molar ratio (L/b)); (c) Circular dichroism titration of a solution of ssdT₄₀ by H₂-PG; (d) UV-Vis titration of H₂-PG by CT-DNA. H₂-PG/nucleobase molar ratio: L/b. H₂-PG/base pair molar ratio (L/bp).

different N/P ratios (2, 5, 10). The results showed clearly no shift of the siRNA at ratio of 2. However, a strong retardation effect was observed with the complete disappearance of the band corresponding to the native siRNA at N/P = 5. In conclusion, agarose gel assay clearly showed that H₂-PG does complex siRNA.

3.3. Size and ζ-potential determination of H₂-PG/siRNA nanoparticles

The size and zeta potential of H₂-PG/siRNA nanoparticles are important for gene delivery in terms of influencing cellular uptake and transfection efficiency. The condensation of siCtrl into nanoparticles, promoted by H₂-PG, was studied by dynamic light scattering (DLS) experiments at N/P = 5. Size and homogeneity were determined for each complex (5% glucose, N/P = 5) (Fig. 3b). DLS investigations

revealed that using a 5 μM concentration of H₂-PG leads to small nanoparticles with diameters of 217.2 nm and with polydispersity index (PDI) of 0.324. We have also tested larger concentrations: 25 and 50 μM and we observed the formation of much larger particles (average diameters of 540.2 nm and 449.5 nm respectively, with PDI of 0.506 and 0.234 respectively), unsuitable for cell entry through typical endocytosis pathways. We next evaluated surface charge of nanoparticles by zeta potential (ZP) measurements which revealed a value of 18.5 mV at a concentration of 5 μM and 32.4 mV and 35.2 mV for concentrations of 25 μM and 100 μM, respectively. The complex formed between H₂-PG and siRNA remained therefore positively charged, which is an advantage for cell entry.

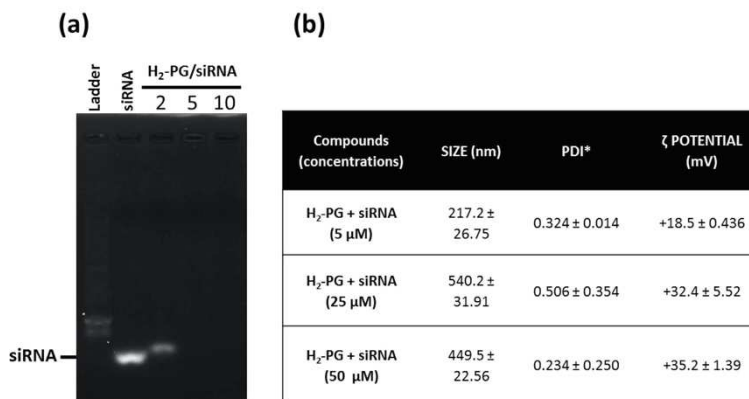


Fig. 3. Physicochemical characterization of H₂-PG/siRNA nanoparticles. (a) Gel electrophoresis analysis at N/P = 2, 5, and 10 showing the full complexation of siRNA by H₂-PG at N/P ≥ 5; (b) Particles size, polydispersity index (PDI*) and ζ-potential measurements for the complexes formed between H₂-PG and siRNA (“compounds”) at N/P = 5 with varying concentrations of H₂-PG (5, 25, and 50 μM). The values represent the average of three replicates.

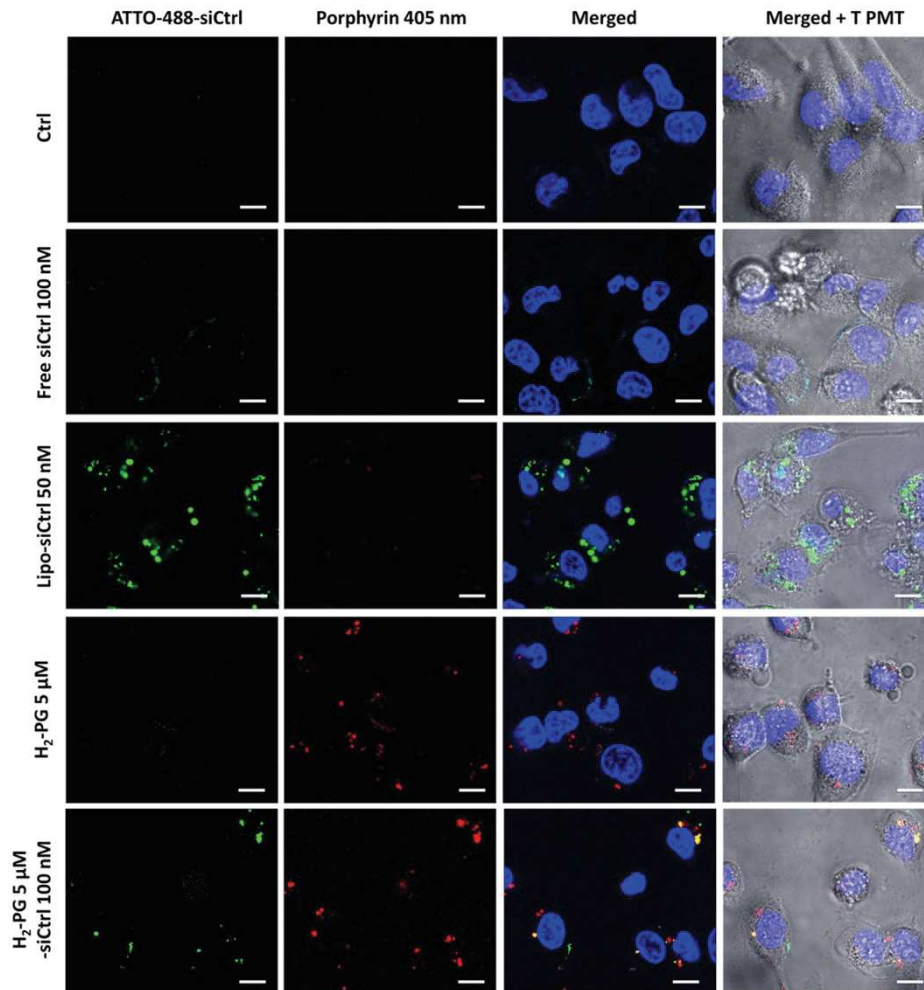


Fig. 4. Cellular uptake of H_2 -PG/siRNA complexes by MDA-MB-231 cells visualized by confocal microscopy. From the top to the bottom respectively: MDA-MB 231 cells alone, incubated with Atto-488-siCtrl at 100 nM, incubated with the complex formed between lipofectamine and siRNA at 50 nM, incubated with H_2 -PG (5 μ M) alone, and finally with the complex formed between H_2 -PG (5 μ M) and siRNA (100 nM) at N/P = 5. The blue fluorescence indicates the nuclei (Hoechst 33342), siCtrl appears in green, porphyrins appear in red. The yellow staining (lower panel) is obtained by the overlapping of H_2 -PG (red) and siRNA (green). Scale bar = 10 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. Cellular uptake

Cellular uptake of the complex was evaluated in MDA-MB-231 cells by using confocal microscopy and flow cytometry. As shown in Fig. 4, H_2 -PG alone was able to get into the cells (red staining) and, more interestingly, it could also deliver the Atto-488-siCtrl into the cytoplasm (the yellow stain in the merged image was generated as a result of red (H_2 -PG) and green (Atto-488-siRNA) fluorescence overlapping) as compared with Lipofectamine RNAiMax transfection. The free Atto-488 siCtrl itself did not enter cells since the Atto-488-siRNA fluorescence is observed around the plasma membrane in only few cells, thus proving that H_2 -PG effectively transfect siRNA inside MDA-MB-231 cells.

In parallel, the cellular uptake of the H_2 -PG/siRNA complex was

quantified by flow cytometry which further proved that H_2 -PG alone is able to quantitatively penetrate cells (Fig. 5, lower left panel). The H_2 -PG-siRNA complex is also able to penetrate cells, in which a significant part of H_2 -PG (~23%) was associated with the siRNA (Fig. 5, lower right panel). In contrast, with the naked siRNA, we observed only a weak fluorescence signal (8%, Fig. 5, upper middle panel) due to its adsorption to the plasma membrane as seen in confocal microscopy (Fig. 4). We observed also an uptake with the lipofectamine siRNA transfection (Fig. 5, upper right panel). However, as lipofectamine presents a cytotoxic effect, the transfected cells became apoptotic as revealed by Propidium Iodide (PI) staining (shown in cyan color in Fig. 5).

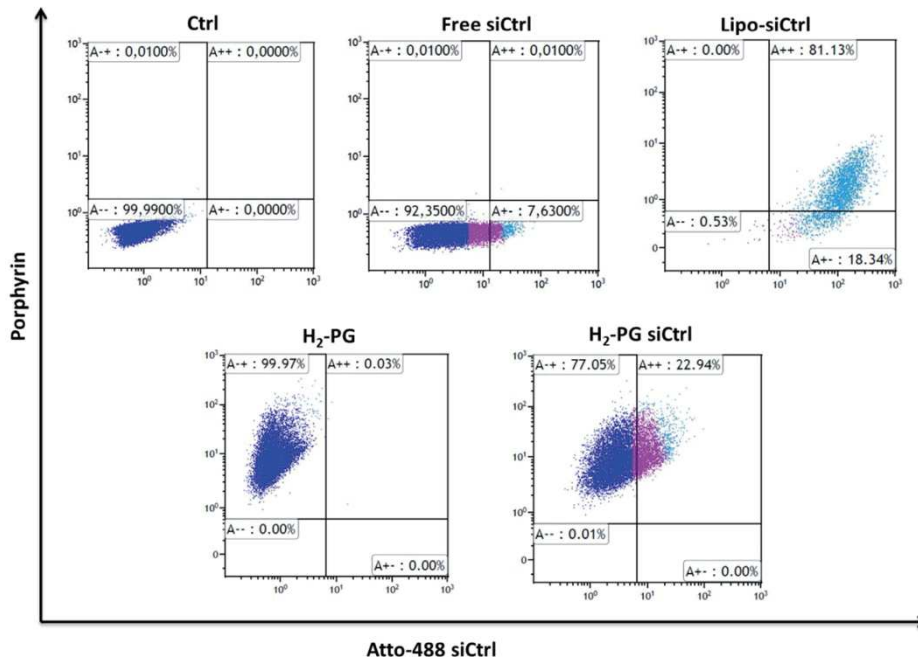


Fig. 5. Cellular uptake quantified by flow cytometric analysis of MDA-MB-231 cells treated with H_2 -PG/siRNA complexes. MDA-MB 231 cells alone (upper left), cells incubated with Atto-488-siCtrl (upper middle), cells incubated with the complex formed between lipofectamine and siRNA (upper right), cells incubated with H_2 -PG alone (lower left) and finally, cells incubated with the complex formed between H_2 -PG and siRNA at N/P = 5 (lower right). The cyan color indicates the apoptotic cells as revealed by propidium iodide staining. Numbers in the profiles indicate the percentage of cells present in this area. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. In vitro combined PDT and siRNA delivery

For assessing the potential therapeutic use of H_2 -PG/siRNA complex in PDT-siRNA combination therapy, we set up experiments using siRNA targeting the expression of proteins inhibitors of apoptosis (IAP). Indeed, Yang et al. reported that survivin, livin and inhibitors of apoptosis (IAP) are overexpressed in cancer cells and inhibit the apoptosis pathway (Yang et al., 2010). For that we explored the mechanism of IAP, considering them as a group of proteins that make cancer cells insensitive to apoptosis (Wei et al., 2008). MDA-MB 231 cells were treated with different concentrations of H_2 -PG alone and H_2 -PG/siIAP complex (N/P = 5), and cell viability was detected using an MTT assay, without or after light irradiation using a continuous laser at 405 nm for 10 min.

Without light irradiation, the cell viability was only slightly affected by the incubation with H_2 -PG alone (Fig. 6a), with still 75% cell viability at 25 μ M concentration of H_2 -PG. Although this “dark-cytotoxicity” (i.e. in the absence of light excitation) is not negligible, it remains acceptable and allowed us to further consider a biological use of H_2 -PG. Still without light irradiation, incubation with H_2 -PG/siIAP was satisfyingly found to knockdown IAP expression in a dose-dependent manner, lowering cell viability to 73% and 54% cell death at 5 μ M and 25 μ M, respectively (Fig. 6a). In contrast, a much weaker effect was observed with a scramble siRNA (cell viability to 94% and 79% cell death at 5 μ M and 25 μ M, respectively (Fig. 6a). Together with the imaging studies discussed above, and since cell viability was not affected when cells were incubated with siIAP alone, this experiment further demonstrates that H_2 -PG acts as a delivery vehicle for siRNA

which otherwise does not readily enter cells.

Following light irradiation (405 nm, 10 min) of the cells incubated with H_2 -PG alone, the cell viability was significantly decreased – to 50% and 35% at, respectively, 5 μ M and 25 μ M (Fig. 6a) – compared to the experiment without light irradiation or those without H_2 -PG, thereby evidencing the PDT effect of H_2 -PG.

Finally, cells incubated with H_2 -PG/siIAP complex followed by light irradiation showed the lowest cell viability – 37% and 26% at, respectively, 5 μ M and 25 μ M (Fig. 6a) – thus demonstrating the advantage of combining the two therapies, PDT and gene silencing, and validating our supramolecular approach to this quest.

To further investigate the combined effect of the two therapies, the results were subjected to data treatment using CompuSyn software (ComboSyn, Inc) (Chou, 2006), which yield combination indexes (CI) lower than 1 in case of synergistic interactions, equal to 1 in case of additive interactions, and greater than 1 in case of antagonist interactions (Chou, 2006). In our case, CI were found to be around a value of 1 (Fig. 6b), meaning that PDT acted additively with gene silencing in producing cytotoxicity in MDA-MB-231 cells.

The fact that synergism does not take place in our case would mean that the two therapies operate in parallel rather than sequentially. Therefore photochemical internalization (Shieh et al., 2008) and photo-induced endosomal release (de Bruin et al., 2008) do not seem to take place in the present case. However, it is noteworthy to mention that achieving an additive effect is already a very positive result. Indeed, one could have feared that if H_2 -PG remains too closely bound to siRNA, light irradiation would lead to the photo-degradation of the latter, thereby leading to an antagonist effect. In addition, aggregates of

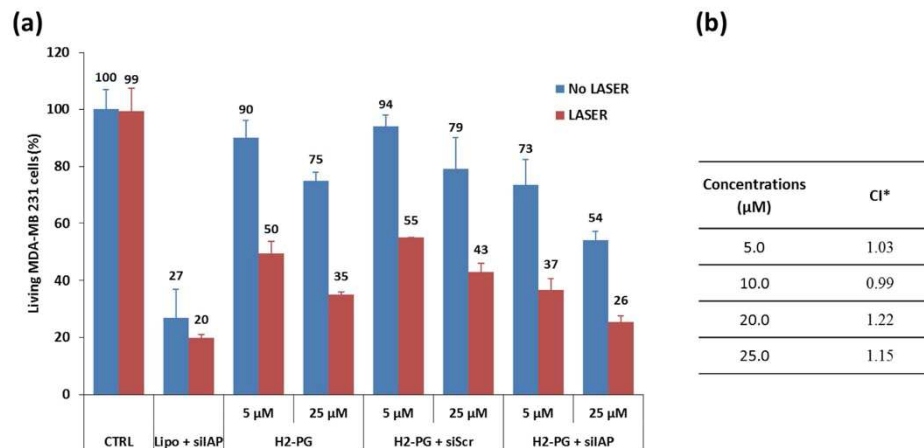


Fig. 6. *In vitro* combination of PDT and siIAP delivery using H₂-PG. (a) Cell counting % of living MDA-MB-231 cells (MTT assay) treated with H₂-PG alone, H₂-PG/siScr complex at N/P = 5, H₂-PG/siIAP complex at N/P = 5, using two different concentrations of H₂-PG (5 and 25 μM) and siRNA (100 nM and 500 nM, respectively), with and without light irradiation (photon excitation laser at 405 nm for 10 min). Data are presented as (mean ± SEM). Experiments were carried out in triplicates; (b) report table of combination indexes obtained by data treatment using CompuSyn software. *Combination index (CI) was calculated from the CI equation algorithms using CompuSyn software. CI = 1, < 1, and > 1 indicates additive effect, synergism, and antagonism, respectively.

porphyrins are usually less active photosensitizers than molecularly-dispersed porphyrins. Thus, we believe that the obtained results indicate that H₂-PG releases from the H₂-PG/siRNA complex following cell internalization and thus enables the two therapies to occur effectively in an additive manner.

3.6. Gene silencing

To further test the specificity and efficiency of the silencing effects of H₂-PG/siRNA complexes on IAP protein expression, MDA-MB-231 cells were incubated with different complexes or with H₂-PG and siRNA separately. MDA-MB-231 cells were also transfected with a complex formed between lipofectamine and siRNA used as a positive control. In-cell ELISA was then used to measure the decrease of IAP expression following treatment of MDA-MB-231 cells with different formulations. Cells treated with media only in the absence of siRNA showed normal IAP expression before (100%) and after (99%) irradiation (Fig. 7, Ctrl). The cells treated with naked siIAP gave the same level of IAP expression (108% for non-irradiated and 92% for irradiated cells) compared to the control (Fig. 7, Free siIAP). The silencing of IAP expression was more pronounced when cells were treated with H₂-PG-siIAP complexes, resulting in an average of 42% (non-irradiated) and 57% (irradiated) decrease in protein expression (Fig. 6, H2-PG + siIAP). In contrast, the complexes formed between H₂-PG and a scrambled siRNA (siScr) had a much weaker effect on protein expression (20% inhibition for non-irradiated and 32% for irradiated cells) (Fig. 7, H2-PG + siScr). In comparison, cells transfected with siIAP using Lipofectamine decreased the protein expression by 50% (non-irradiated) and 43% (irradiated) (Fig. 7, Lipo + siIAP). Altogether, the protein quantification by in-cell ELISA experiment showed the efficiency of the H₂-PG/siRNA complex for gene silencing of therapeutic target such as IAP protein.

4. Conclusions

We described here a supramolecular approach to achieve the combination of photodynamic therapy and gene therapy using a simple cationic porphyrin. Through this work, the guanidylated porphyrin H₂-PG was shown to interact with nucleic acids, yielding DNA-templated

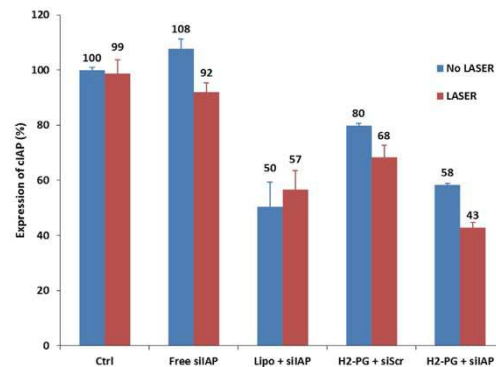


Fig. 7. Silencing of IAP protein expression in MDA-MB-231 cells treated with different siRNA formulations. In-cell ELISA of IAP protein expression in MDA-MB-231 cells alone (Ctrl) using an anti-IAP antibody, in cells treated with naked siIAP (Free siIAP, 500 nM), in cells transfected with lipofectamine and siIAP (Lipo + siIAP, 50 nM), cells treated with a complex formed between H₂-PG and a scrambled siRNA (H₂-PG, 25 μM + siScr, 500 nM) and finally cells treated with H₂-PG/siIAP complex (H₂-PG, 25 μM + siIAP, 500 nM). In-cell ELISA was done with two different cell populations, non-irradiated (blue bars) and irradiated at 405 nm for 10 min (red bars). Experiments were carried out in triplicates. Data are presented as mean ± SEM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

supramolecular polymers with ssDNA, more complicated association complexes with dsDNA, and nanoparticles of 200–500 nm diameter in presence of siRNA. We showed that H₂-PG readily enters human breast cancer cells (MDA-MB-231), and, more importantly, that it is able to act as a delivery vehicle to deliver siRNA inside cells, while retaining its PDT activity as a photosensitizer. Finally, thanks to this dual role of delivery vector and photosensitizer of H₂-PG, we succeeded in demonstrating an additive effect of PDT and siRNA therapy in living cells. Given the tremendous progresses recently made in the design of novel

photosensitizers (with two-photon excitation, absorption in the near infra-red, etc...), we believe this proof-of-concept can open further perspectives in exploiting supramolecular self-assembly processes for therapeutic purposes (Ulrich, 2019). The combined effect of PDT and gene silencing is of great interest for cancer therapy since it was already demonstrated that the PDT acts positively to impede the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) process in cancer cells (Ma et al., 2017). To go further with this study, a challenge that now lies ahead is to insert a targeting motif to the H₂-PG vector for *in vivo* application, so that the targeted vector could become suitable for intravenous injection to deliver the siRNA into tumor for combined PDT and gene therapy.

Author contributions

NL, MC, LL, and YB: experimental research; CB, NB, and SU: designed project; MGB, GP, CB, NB, SU: results analysis and project management; NB, SU: funding acquisition and manuscript writing. All authors reviewed the manuscript.

Funding

This work was supported by the ANR (ANR-17-CE07-0042-01) and the Ligue Nationale contre le Cancer, section Hérault (2019).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

NL thanks the Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique for a PhD fellowship. The authors thank MRI (Montpellier RIO Imaging platform) for confocal microscopy facilities.

References

- Almeida-Marrero, V., van de Winckel, E., Anaya-Plaza, E., Torres, T., de la Escosura, A., 2018. Porphyrinoid biohybrid materials as an emerging toolbox for biomedical light management. *Chem. Soc. Rev.* 47, 10.1039/c7cs00554g.
- Bartolami, E., Bouillon, C., Dumy, P., Ulrich, S., 2016. Bioactive clusters promoting cell penetration and nucleic acid complexation for drug and gene delivery applications: from designed to self-assembled and responsive systems. *Chem. Commun.* 52, 4257. <https://doi.org/10.1039/c5cc09715k>.
- Briggs, B.N., Gaier, A.J., Fanwick, P.E., Dogutan, D.K., McMillin, D.R., 2012. Cationic copper(II) porphyrins intercalate into domains of double-stranded RNA. *Biochemistry* 51, 7496. <https://doi.org/10.1021/bi300828z>.
- Carvin, M.J., Fiel, R.J., 1983. Intercalative and nonintercalative binding of large cationic porphyrin ligands to calf thymus DNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 6121. <https://doi.org/10.1093/nar/11.17.6121>.
- Chitgupi, U., Li, Y., Chen, M.F., Shao, S., Beitelshes, M., Tan, M.J., Neelamegham, S., Pfeifer, B.A., Jones, C., Lovell, J.F., 2017. Bimodal targeting using sulfonated, mannosylated PEI for combined gene delivery and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 93, 600. <https://doi.org/10.1111/php.12688>.
- Chou, T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 58, 621. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
- David, A.R., Zimmerman, M.R., 2010. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat. Rev. Cancer* 10, 728. <https://doi.org/10.1038/nrc2914>.
- de Bruin, K.G., Fella, C., Ogris, M., Wagner, E., Ruthardt, N., Brauchle, C., 2008. Dynamics of photoinduced endosomal release of polyplexes. *J. Control. Release* 130, 175. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.06.001>.
- Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D., Jain, R.K., 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 380. <https://doi.org/10.1038/Nrc1071>.
- D'Urso, A., Fragala, M.E., Purrello, R., 2012. From self-assembly to noncovalent synthesis of programmable porphyrins arrays in aqueous solution. *Chem. Commun.* 48, 8165. <https://doi.org/10.1039/c2cc31856c>.
- Ethirajan, M., Chen, Y.H., Joshi, P., Pandey, R.K., 2011. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* 40, 340. <https://doi.org/10.1039/b915149b>.
- Fiel, R.J., 1989. Porphyrin – nucleic-acid interactions - a review. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 6, 1259. <https://doi.org/10.1080/07391102.1989.10506549>.
- Fiel, R.J., Howard, J.C., Mark, E.H., Dattagupta, N., 1979. Interaction of DNA with a porphyrin ligand – evidence for intercalation. *Nucleic Acids Res.* 6, 3093. <https://doi.org/10.1093/Nar/6.9.3093>.
- Gaier, A.J., Ghimire, S., Fix, S.E., McMillin, D.R., 2014. Internal versus external binding of cationic porphyrins to single-stranded DNA. *Inorg. Chem.* 53, 5467. <https://doi.org/10.1021/ic403105q>.
- Garbett, N.C., Ragazzon, P.A., Chaires, J.B., 2007. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nat. Prot.* 2, 3166. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.475>.
- Hafshejani, S.M., Watson, S.M.D., Tuite, E.M., Pike, A.R., 2015. Click modification of diazido acridine intercalators: a versatile route towards decorated DNA nanostructures. *Chem. Eur. J.* 21, 12611. <https://doi.org/10.1002/chem.201501836>.
- Hannah, K.C., Armitage, B.A., 2004. DNA-templated assembly of helical cyanine dye aggregates: a supramolecular chain polymerization. *Acc. Chem. Res.* 37, 845. <https://doi.org/10.1021/ar030257c>.
- Janssen, P.G.A., Vandenbergh, J., van Dongen, J.L.J., Meijer, E.W., Schenning, A.P.H.J., 2007. ssDNA templated self-assembly of chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6078. <https://doi.org/10.1021/ja0711967>.
- Jimenez, C.M., Aggad, D., Croissant, J.G., Tresfield, K., Laurencin, D., Berthomieu, D., Cubedo, N., Rossel, M., Alsaïari, S., Anjum, D.H., Sougrat, R., Roldan-Gutierrez, M.A., Richeter, S., Oliviero, E., Raehm, L., Charnay, C., Cattoen, X., Clement, S., Man, M.W.C., Maynadier, M., Chaleix, V., Sol, V., Garcia, M., Garry-Bobo, M., Khashab, N.M., Bettache, N., Durand, J.O., 2018. Porous porphyrin-based organosilica nanoparticles for NIR two-photon photodynamic therapy and gene delivery in zebrafish. *Adv. Funct. Mater.* 28, 1800235. <https://doi.org/10.1002/Adfm.201800235>.
- Kemp, J.A., Shin, M.S., Heo, C.Y., Kwon, Y.J., 2016. "Combo" nanomedicine: co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 98, 3. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.019>.
- Li, X., Lee, S., Yoon, J., 2018. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* 47, 1174. <https://doi.org/10.1039/c7cs00594f>.
- Luby, B.M., Walsh, C.D., Zheng, G., 2019. Advanced photosensitizer activation strategies for smarter photodynamic therapy beacons. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 2558. <https://doi.org/10.1002/anie.201805246>.
- Ma, C.A., Shi, L.L., Huang, Y., Shen, L.Y., Peng, H., Zhu, X.Y., Zhou, G.Y., 2017. Nanoparticle delivery of Wnt-1 siRNA enhances photodynamic therapy by inhibiting epithelial-mesenchymal transition for oral cancer. *Biomater. Sci.* 5, 494. <https://doi.org/10.1039/c7bm90004j>.
- MoradpourHafshejani, S., Hedley, J.H., Haigh, A.O., Pike, A.R., Tuite, E.M., 2013. Synthesis and binding of proflavine diazides as functional intercalators for directed assembly on DNA. *RSC Adv.* 3, 18164. <https://doi.org/10.1039/c3ra43090a>.
- Nishiyama, N., Jang, W.D., Kataoka, K., 2007. Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery. *New J. Chem.* 31, 1074. <https://doi.org/10.1039/b616050f>.
- Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, T., Kasprzak, K., 2016. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* 83, 912. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>.
- Paolantoni, D., Rubio-Magnieto, J., Cantel, S., Martinez, J., Dumy, P., Surin, M., Ulrich, S., 2014. Probing the importance of π -stacking interactions in DNA-templated self-assembly of bisfunctionalized guanidinium compounds. *Chem. Commun.* 50, 14257. <https://doi.org/10.1039/c4cc05706f>.
- Paolantoni, D., Cantel, S., Dumy, P., Ulrich, S., 2015. A dynamic combinatorial approach for identifying side groups that stabilize DNA-templated supramolecular self-assemblies. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3609. <https://doi.org/10.3390/ijms16023609>.
- Perrier, A., Mothes, E., Bonduelle, C., Pratiel, G., 2016. Synthesis of asymmetric guanidiniumphenyl-aminophenyl porphyrins. *J. Porphyr. Phthalocya.* 20, 1438. <https://doi.org/10.1142/S1088424616501170>.
- Pratiel, G., 2016. Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions. *Coord. Chem. Rev.* 308, 460. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.07.003>.
- Ripoll, M., Pierdant, M., Neuberger, P., Bagnard, D., Wagner, A., Kichler, A., Remy, J.S., 2018. Co-delivery of anti-PLK-1 siRNA and camptothecin by nanometric polydiacetylenic micelles results in a synergistic cell killing. *RSC Adv.* 8, 20758. <https://doi.org/10.1039/c8ra03375g>.
- Sabater, L., Nicolau-Travers, M.L., De Rache, A., Prado, E., Dejeu, J., Bombarde, O., Lacroix, J., Calsou, P., Defrancq, E., Mergny, J.L., Gomez, D., Pratiel, G., 2015. The nickel(II) complex of guanidinium phenyl porphyrin, a specific G-quadruplex ligand, targets telomeres and leads to POT1 mislocalization in culture cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 729. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1260-8>.
- Schluep, T., Lickliter, J., Hamilton, J., Lewis, D.L., Lai, C.L., Lau, J.Y.N., Locarnini, S.A., Gish, R.G., Given, B.D., 2017. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ARC-520 injection, an RNA interference-based therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 6, 350. <https://doi.org/10.1002/cpdd.318>.
- Shieh, M.J., Peng, C.L., Lou, P.J., Chiu, C.H., Tsai, T.Y., Hsu, C.Y., Yeh, C.Y., Lai, P.S., 2008. Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates. *J. Control. Release* 129, 200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.03.024>.
- Strumberg, D., Schultheis, B., Traugott, U., Vank, C., Santel, A., Keil, O., Giese, K., Kaufmann, J., Dreves, J., 2012. Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 50, 76. <https://doi.org/10.5414/CPP50076>.
- Sun, S.J., Xu, Y.X., Fu, P., Chen, M., Sun, S.H., Zhao, R.R., Wang, J.R., Liang, X.L., Wang, S.M., 2018. Ultrasound-targeted photodynamic and gene dual therapy for effectively inhibiting triple negative breast cancer by cationic porphyrin lipid microbubbles loaded with HIF1 α -siRNA. *Nanoscale* 10, 19945. <https://doi.org/10.1039/c8nr03074j>.
- Surin, M., 2016. From nucleobase to DNA templates for precision supramolecular assemblies and synthetic polymers. *Polym. Chem.* 7, 4137. <https://doi.org/10.1039/c6py01039f>.

N. Laroui, et al.

International Journal of Pharmaceutics 569 (2019) 118585

- c6py00480f.
- Ulrich, S., 2019. Growing prospects of dynamic covalent chemistry in delivery applications. *Acc. Chem. Res.* 52, 510. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00591>.
- Wagner, M.J., Mitra, R., McArthur, M.J., Baze, W., Barnhart, K., Wu, S.Y., Rodriguez-Aguayo, C., Zhang, X.N., Coleman, R.L., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., 2017. Preclinical mammalian safety studies of EPHARNA (DOPC nanoliposomal EphA2-targeted siRNA). *Mol. Cancer Ther.* 16, 1114. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0541>.
- Wang, M.M., Silva, G.L., Armitage, B.A., 2000. DNA-templated formation of a helical cyanine dye J-aggregate. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9977. <https://doi.org/10.1021/Ja002184n>.
- Wei, Y.B., Fan, T.J., Yu, M.M., 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 278. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00407.x>.
- Yang, D.Y., Song, X.S., Zhang, J.N., Ye, L., Wang, S.J., Che, X.Y., Wang, J.B., Zhang, Z.W., Wang, L.N., Shi, W., 2010. Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 137. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp118>.
- Zhao, H., Hu, W.B., Ma, H.H., Jiang, R.C., Tang, Y.F., Ji, Y., Lu, X.M., Hou, B., Deng, W.X., Huang, W., Fan, Q.L., 2017. Photo-induced charge-variable conjugated polyelectrolyte brushes encapsulating upconversion nanoparticles for promoted siRNA release and collaborative photodynamic therapy under NIR light irradiation. *Adv. Funct. Mater.* 27 (44), 1702592. <https://doi.org/10.1002/adfm.201702592>.

3. Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons décrit et montré une approche supramoléculaire pour associer la thérapie photo-dynamique et la thérapie génique en utilisant une simple porphyrine cationique. Mon travail a permis de montrer et de valider le fort potentiel thérapeutique pour la PDT et la thérapie génique comme thérapie duale. En effet, grâce à ce double rôle de vecteur pour le siRNA et de photosensibilisateur de la molécule H₂-PG, nous avons réussi à démontrer un effet additif entre ces deux approches thérapeutiques dans les cellules cancéreuses. Le fait que l'effet synergique n'ait pas lieu dans notre cas signifierait que les deux thérapies opèrent en parallèle et de manière séparée. Par conséquent, l'internalisation photo induite ne semblent pas avoir lieu dans ce cas. Cependant, il est à noter que cette association reste positive du côté où la porphyrine n'interfère pas dans l'activité du siRNA, conduisant ainsi à un effet antagoniste. Ainsi, nous pensons que les résultats obtenus indiquent que H₂-PG se libère du complexe suite à l'internalisation cellulaire et permet ainsi aux deux thérapies de se produire efficacement de manière additive.

Compte tenu des énormes progrès récemment réalisés dans la conception de nouveaux photosensibilisateurs (absorption dans le proche infrarouge, PDT bi-photonique, etc.), nous pensons que cette preuve de concept peut ouvrir de nouvelles perspectives dans l'exploitation des processus d'auto-assemblage supramoléculaire à des fins thérapeutiques. Pour aller plus loin dans cette étude, nos perspectives s'orientent vers une thérapie plus ciblée en insérant un motif de ciblage sur le vecteur H₂-PG pour une application *in vivo*, afin que le nouveau vecteur puisse devenir approprié pour une injection intraveineuse et délivrer le siRNA dans la tumeur afin d'accomplir une thérapie combinée : PDT et thérapie génique.

Partie III : Discussion générale et perspectives

Dans ce travail de thèse nous avons abordé des problématiques ainsi que des limites des traitements actuels pour le cancer. Pour cela, le développement de nouvelles thérapies ciblées est un grand challenge en cancérologie. En effet, les thérapies actuelles notamment la chimiothérapie et la radiothérapie génèrent de nombreux effets indésirables. Ainsi, la spécificité élevée de la cible, l'efficacité de l'inhibition de gène malade et la conception simple des siRNA donnent lieu à de bons potentiels thérapeutiques qui ont fourni un grand espoir pour le ciblage de gènes spécifiques responsables de troubles pathologiques. Pour cela, le développement de nano-vecteurs pour la délivrance ciblée de siRNA devrait permettre de répondre à ces besoins cliniques. A l'heure actuelle, seulement deux médicaments basés sur la délivrance du siRNA ont été autorisés par les autorités de santé pour le traitement des polyneuropathies rares (c'est le cas de : ONPATTRO® pour traiter l'Amylose à transthyréline) et des maladies hépatiques (le cas de : GIVLAARI® pour traiter les porphyries hépatiques aiguës). Cependant pour d'autres pathologies touchant d'autres organes que le foie, un ciblage spécifique est nécessaire. Ainsi, c'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse ayant pour objectif de développer de nouveaux nano-vecteurs pour une délivrance ciblée du siRNA afin de traiter des pathologies cancéreuses (Figure 37). Ce projet se situe donc à la frontière de plusieurs domaines scientifiques qui m'a permis de réaliser ces travaux aboutissant à la publication de plusieurs articles scientifiques.

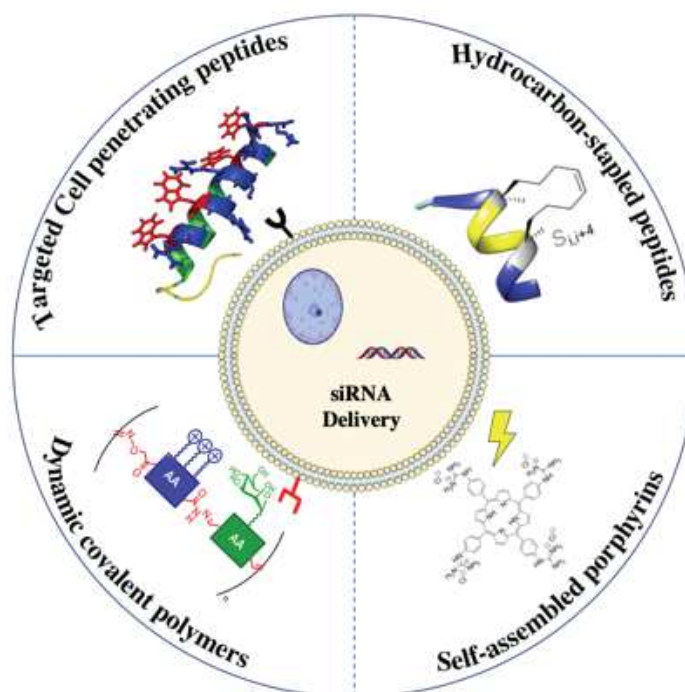


Figure 37 : Les différents nano-vecteurs pour la délivrance de siRNA utilisé dans cette étude.

Le premier axe de recherche concerne l'étude de peptides modifiés pour la délivrance de siRNA dans les sites tumoraux. Dans ce contexte nous avons démontré le potentiel thérapeutique d'un CPP fonctionnalisé avec un motif de ciblage pour la vectorisation de siRNA thérapeutique. Comme nous l'avons discuté précédemment, le ciblage actif est une approche primordiale pour un traitement spécifique et efficace du cancer. Plusieurs cibles tumorales ont été identifiées dont le récepteur laminine qui est impliqué dans la progression tumorale [444]. Ainsi, plusieurs approches thérapeutiques ciblant ce récepteur pour la prévention et le traitement du cancer ont vu le jour. A ce jour, seulement l'étude apportée par le groupe de Liu décrit l'approche de ciblage du récepteur laminine pour la transfection efficace de gène pour le traitement des mélanomes [408]. Notre travail a pu démontrer pour la première fois que le ciblage thérapeutique de ce récepteur, permet d'augmenter l'efficacité de la thérapie par siRNA pour le traitement du cancer. Ainsi, ma participation dans ce projet a permis d'élaborer des CPP fonctionnalisés intéressants pour le ciblage thérapeutique du cancer du sein par la thérapie génique. En même temps, cette étude nous indique que plusieurs paramètres devraient encore être optimisés pour les applications cliniques. Il serait donc indispensable d'étudier la stabilité et l'innocuité de ce peptide et du complexe formé chez l'animal autre que le modèle poisson-zèbre. D'autres paramètres tels que les constantes d'association/dissociation entre les peptides et les siRNA doivent aussi être prises en compte.

Dans ce sens, les mécanismes d'internalisation et les interactions avec les membranes cellulaires sont des éléments essentiels dans la délivrance de siRNA. La technique de « peptide stapling » a émergé très rapidement comme l'une des stratégies les plus largement adoptées pour la stabilisation des peptides en hélice α . Cette technique a trouvé une application dans de nombreux domaines scientifiques. Dans un contexte de thérapie génique anti-cancéreuse, les stapled peptides sont considérés comme des candidats prometteurs pour promouvoir l'inhibition de gène malade. Leur biocompatibilité ainsi que leur grand potentiel d'encapsulation et d'internalisation de siRNA en font un système intéressant pour une utilisation dans le domaine biomédical de délivrance de gène thérapeutique. Les travaux du groupe de Yu étaient les seuls jusqu'à présent à démontrer l'utilité des stapled peptides hydrocarbonés comme étant des vecteurs de siRNA [322]. Dans mon travail de thèse, nous avons montré l'efficacité de très courts stapled peptides hydrocarbonés dans l'encapsulation et la vectorisation du siRNA dans les cellules cancéreuses. Nos résultats obtenus *in vitro* ouvrent la voie à leur utilisation chez l'animal pour étudier leur potentiel de vectorisation ainsi que leur stabilité et résistance aux protéases. Dans

ce contexte, il devient nécessaire de fonctionnaliser les stapled peptides afin de cibler spécifiquement un ou des cancers particuliers. En ce sens, le peptide RGD s'est montré comme un excellent ligand aux récepteurs intégrines surexprimées dans certains cancers [397]. En effet, en plus de son rôle de ligand ciblage des cellules cancéreuses, sa présence multivalente peut servir comme un agent anti-angiogénique afin de bloquer la croissance tumorale [445]. Cette stratégie pourrait ainsi augmenter l'efficacité thérapeutique grâce à l'effet anti-angiogénique apporté par le ligand de ciblage. Dans ce sens, des stapled peptides hydrocarbonés permettant d'activer l'apoptose par inhibition des interactions des protéines Bcl2 dans des cellules cancéreuses [446] peuvent être exploités. Ainsi, il serait possible de coupler du siRNA apoptotique (tel que siIAP) à ce stapled peptide « apoptotique » qui pourrait agir à la fois comme vecteur pour le siRNA et comme agent thérapeutique pour le traitement du cancer. En effet, cette stratégie pourrait servir de prototypes pour le développement de thérapies contre le cancer et peut-être contre d'autres maladies.

Nous avons décrit dans le premier axe de recherche le développement de vecteurs peptidiques pour délivrer efficacement du siRNA dans certains cancers. Les résultats obtenus étaient très prometteurs. Ainsi, pour aller plus loin, nous nous sommes orientés vers des conceptions de molécules plus intelligentes qui permettent d'avoir un système d'auto-assemblage/dissociation ainsi qu'une libération contrôlée du siRNA grâce aux caractéristiques intrinsèques du vecteur (sensibilité au pH...). C'est à partir de ce concept que se construit mon deuxième axe de recherche basé sur l'élaboration d'une nouvelle génération de nano-systèmes obtenus par auto-assemblage adaptatif, conduisant potentiellement à l'auto-sélection du vecteur le mieux ajusté pour sa cible. Pour aborder ce nouvel axe, nous avons exploré deux stratégies :

La première stratégie repose sur une approche d'assemblage dynamique covalent pour la complexation et la délivrance ciblée de siRNA. Actuellement, le potentiel des matériaux dynamiques pour la délivrance de siRNA suscite le plus grand intérêt. Différents travaux se sont focalisés sur l'approche dynamique covalente en exploitant l'aspect de la réversibilité dans l'univers de la vectorisation de siRNA [447]. Actuellement, le groupe de Aida a fourni le seul exemple d'un système covalent dynamique qui subit une polymérisation par un effet de template du siRNA, favorisé par un catalyseur, en exploitant des liaisons disulfures réversibles et afin de délivrer du siRNA dans des cellules d'adénocarcinome hépatique [362]. Leur système auto-assemblé a été couplé à la transferrine pour assurer une pénétration dans les tissus les plus profonds, mais aucune stratégie de ciblage n'a été présentée. Dans notre travail, nous avons

montré de manière unique que l'auto-assemblage des PDC basé sur un effet de template de siRNA se traduit par la présentation multivalente de ligands glucidiques qui favorise par la suite l'internalisation cellulaire, et même la délivrance ciblée du siRNA dans les cellules cancéreuses sur-exprimant le récepteur correspondant [381]. Ainsi, la stratégie d'auto-production de PDC multifonctionnels en tant que vecteurs ciblant le siRNA constitue donc un premier pas vers une nano-médecine plus développée en ouvrant de nouvelles perspectives dans la délivrance de gènes *in vivo* (sur les modèles de *zebrafish* et de souris) dans l'optique d'étude clinique et applications thérapeutiques.

La deuxième stratégie de notre étude repose sur une approche d'assemblage supramoléculaire de porphyrines cationiques induit par le siRNA. Actuellement, nous avons constaté que cette approche a été étudiée et appliquée dans plusieurs domaines scientifiques notamment dans le développement d'auto-vecteurs fonctionnels pour les applications biomédicales. A l'heure actuelle, seuls quelques exemples montrent l'effet du template de l'ADN ou du siRNA pour l'auto-assemblage supramoléculaire dans le contexte de thérapie génique [356], [448].

Cependant, les thérapies combinées par approche supramoléculaire constituent des stratégies très prometteuses pour potentialiser l'effet thérapeutique du gène anti-cancéreux. Dans ce contexte, les porphyrines supramoléculaires peuvent favoriser l'évasion endolysosomale d'agents thérapeutiques. De la même manière, ils peuvent également permettre une internalisation photochimique (PCI) d'oligonucléotides pour réaliser une PDT/thérapie génique synergique plus efficace [440]. Ce potentiel synergique a été démontré par Wang *et al.* *in vitro* avec des cellules cancéreuses [449]. Malgré ces résultats initialement prometteurs, la PDT/thérapie génique par approche supramoléculaire n'a pas encore été étudiée *in vivo*. Durant notre travail, nous avons mis au point et réalisé la preuve de concept d'une thérapie combinée des cancers *in vitro* en associant la thérapie photo-dynamique et la thérapie génique par approche supramoléculaire. Cependant, un de nos objectifs pour la suite sera d'obtenir un effet synergique en associant les deux thérapies. Pour cela, des améliorations restent à faire afin de contrôler la reconnaissance, l'interaction avec les séquences d'acides nucléiques et l'assemblage global notamment dans le suivi et le contrôle de relargage d'agents thérapeutiques. Cela nécessitera la conception des voies coopératives pour l'auto-assemblage de plusieurs ligands avec des acides nucléiques en s'appuyant sur des approches dynamiques pour éventuellement libérer le siRNA thérapeutique avec d'autres composés bioactifs dans les cellules cibles.

Dans ce contexte de ciblage, il serait nécessaire maintenant de s'orienter vers un ciblage actif essentiel pour le développement clinique. De plus, une « multivalence induite » du ligand de ciblage peut être générée lors du processus de l'auto-assemblage, ce qui permet une meilleure internalisation et un ciblage thérapeutique réussi. De plus, étant donné les limites de pénétration en profondeur de la PDT mono-photonique dans les tissus, il serait indispensable d'améliorer les propriétés du photosensibilisateur (longueurs d'onde d'excitation proche de l'infrarouge...) afin de mettre en place des procédés de PDT bi-photoniques plus efficaces et spécifiques à des modèles de tumeurs orthotopiques cliniquement pertinents.

En conclusion, le domaine de la thérapie génique du cancer connaît un essor considérable et fera sans aucun doute partie de l'avenir des thérapies contre le cancer. En effet, ce vaste domaine promet un certain nombre de stratégies thérapeutiques innovantes, susceptibles de devenir importantes pour le traitement du cancer. Plusieurs traitements contre le cancer sont en phase d'essais cliniques tardifs, grâce à l'avènement du génie génétique. On pourrait citer dans ce cas les travaux pionniers révolutionnaires de Charpentier et Doudna qui ont découvert les ciseaux génétiques CRISPR/Cas9 en 2012 et qui leur a permis d'obtenir le prix Nobel de la chimie en 2020.

Ainsi, le développement de vecteurs de gène thérapeutique reste un domaine critique pour les recherches futures qui a pour objectifs : i) le remplacement des vecteurs viraux toxiques et immunogènes par des vecteurs synthétiques et biocompatibles, ii) l'amélioration du ciblage et de la spécificité des vecteurs, iii) la régulation de l'expression des gènes défaillants et iv) l'identification des synergies entre les acides nucléiques thérapeutiques et d'autres molécules anticancéreuses. Tout cela indique qu'il est nécessaire d'utiliser des approches multidisciplinaires et personnalisées afin d'optimiser et accroître l'efficacité des schémas thérapeutiques actuels.

Références bibliographiques

- [1] « Biomédicaments en France état des lieux 2014 ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.leem.org/sites/default/files/Biomédicaments-etat-des-lieux-2014.pdf>.
- [2] Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, « Liste des types de cancers. », juin 20, 2019. <https://www.fondation-arc.org/cancer/liste>.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, et A. Jemal, « Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries », *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, n° 6, p. 394-424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [4] « Les cancers en France : l'essentiel – édition 2019 – ONCORIF ». <https://www.oncorif.fr/2019/02/les-cancers-en-france-lessentiel-de-2019/> (consulté le mars 21, 2020).
- [5] « Données globales d'épidémiologie des cancers - Epidémiologie des cancers ». <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales> (consulté le mars 21, 2020).
- [6] I. of M. (US) C. on C. C. in L. M.-I. Countries, F. A. Sloan, et H. Gelband, *Cancer Causes and Risk Factors and the Elements of Cancer Control*. National Academies Press (US), 2007.
- [7] « Risk Factors for Cancer », *National Cancer Institute*, avr. 29, 2015. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk> (consulté le mars 22, 2020).
- [8] Uma Devi P, « Basics of carcinogenesis. », *Health Adm*, vol. XVII, n° 1, p. 16-24, 2004.
- [9] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [10] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [11] N. Roy, « The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases », *The EMBO Journal*, vol. 16, n° 23, p. 6914-6925, déc. 1997, doi: 10.1093/emboj/16.23.6914.
- [12] Y. Dai, T. S. Lawrence, et L. Xu, « Overcoming cancer therapy resistance by targeting

inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B », *Am J Transl Res*, vol. 1, n° 1, p. 1-15, janv. 2009.

[13] M. De Palma, D. Biziato, et T. V. Petrova, « Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis », *Nat Rev Cancer*, vol. 17, n° 8, p. 457-474, août 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.51.

[14] J. Folkman, « Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease », *Nat Med*, vol. 1, n° 1, p. 27-30, janv. 1995, doi: 10.1038/nm0195-27.

[15] F. van Zijl, G. Krupitza, et W. Mikulits, « Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration », *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 728, n° 1-2, p. 23-34, juill. 2011, doi: 10.1016/j.mrrev.2011.05.002.

[16] O. H. Warburg, F. Dickens, et Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, *The metabolism of tumours; investigations from the Kaiser Wilhelm institute for biology, Berlin-Dahlem*,. London: Constable & Co. Ltd., 1930.

[17] M. Wang *et al.*, « Role of tumor microenvironment in tumorigenesis », *J Cancer*, vol. 8, n° 5, p. 761-773, févr. 2017, doi: 10.7150/jca.17648.

[18] T. L. Whiteside, « The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth », *Oncogene*, vol. 27, n° 45, p. 5904-5912, oct. 2008, doi: 10.1038/onc.2008.271.

[19] « New direction urged to improve cancer nanotechnology ». <https://medicalxpress.com/news/2016-03-urged-cancer-nanotechnology.html> (consulté le mars 21, 2020).

[20] S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, J. Decock, et E. Elkord, « Immune checkpoints in the tumor microenvironment », *Seminars in Cancer Biology*, vol. 65, p. 1-12, oct. 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.06.021.

[21] K. Nurgali, R. T. Jagoe, et R. Abalo, « Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? », *Front. Pharmacol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00245.

[22] L. Yan, N. Rosen, et C. Arteaga, « Targeted cancer therapies », *Chin J Cancer*, vol. 30, n° 1, p. 1-4, janv. 2011, doi: 10.5732/cjc.010.10553.

[23] E. Penuel, R. W. Akita, et M. X. Sliwkowski, « Identification of a region within the

ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 32, p. 28468-28473, août 2002, doi: 10.1074/jbc.M202510200.

[24] G. J. Recondo, E. Díaz Canton, M. de la Vega, M. Greco, G. S. Recondo, et M. E. Valsecchi, « Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions », *World J Clin Oncol*, vol. 5, n° 3, p. 440-454, août 2014, doi: 10.5306/wjco.v5.i3.440.

[25] H. M. Shepard, P. Jin, D. J. Slamon, Z. Pirot, et D. C. Maneval, « Herceptin », *Handb Exp Pharmacol*, n° 181, p. 183-219, 2008, doi: 10.1007/978-3-540-73259-4_9.

[26] T. B. Fitzpatrick et M. A. Pathak, « Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 32, n° 2, Part 2, p. 229-231, févr. 1959.

[27] N. Hodgkinson, C. A. Kruger, et H. Abrahamse, « Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells », *Tumour Biol.*, vol. 39, n° 10, p. 1010428317734691, oct. 2017, doi: 10.1177/1010428317734691.

[28] H. Abrahamse, C. A. Kruger, S. Kadanyo, et A. Mishra, « Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer », *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 35, n° 11, p. 581-588, nov. 2017, doi: 10.1089/pho.2017.4308.

[29] T. Dai *et al.*, « Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform », *Front. Microbio.*, vol. 3, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00120.

[30] C. Conte, S. Maiolino, D. S. Pellosi, A. Miro, F. Ungaro, et F. Quaglia, « Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy », in *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine*, vol. 370, S. Sortino, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 61-112.

[31] M. B. Vrouenraets, G. W. M. Visser, G. B. Snow, et G. A. M. S. van Dongen, « Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy », *Anticancer Res.*, vol. 23, n° 1B, p. 505-522, févr. 2003.

[32] N. L. Oleinick et H. H. Evans, « The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms », *Radiat. Res.*, vol. 150, n° 5 Suppl, p. S146-156, nov. 1998.

- [33] A. P. Castano, T. N. Demidova, et M. R. Hamblin, « Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization », *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, n° 4, p. 279-293, déc. 2004, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- [34] « La lumière contre le cancer ». http://www.reflexions.uliege.be/cms/c_41432/fr/la-lumiere-contre-le-cancer?part=2 (consulté le sept. 25, 2020).
- [35] P. Agostinis *et al.*, « Photodynamic therapy of cancer: An update », *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, n° 4, p. 250-281, juill. 2011, doi: 10.3322/caac.20114.
- [36] A. F. Dos Santos, D. R. Q. De Almeida, L. F. Terra, M. S. Baptista, et L. Labriola, « Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review », *JCMT*, vol. 2019, mars 2019, doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
- [37] A. Naik, R. Rubbiani, G. Gasser, et B. Spingler, « Visible-Light-Induced Annihilation of Tumor Cells with Platinum-Porphyrin Conjugates », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, n° 27, p. 6938-6941, juill. 2014, doi: 10.1002/anie.201400533.
- [38] R. Zhao *et al.*, « Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer », *Biomaterials*, vol. 173, p. 58-70, août 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.054.
- [39] J. R. Starkey *et al.*, « New Two-Photon Activated Photodynamic Therapy Sensitizers Induce Xenograft Tumor Regressions after Near-IR Laser Treatment through the Body of the Host Mouse », *Clinical Cancer Research*, vol. 14, n° 20, p. 6564-6573, oct. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4162.
- [40] K. Strebhardt et A. Ullrich, « Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, n° 6, p. 473-480, 2008, doi: 10.1038/nrc2394.
- [41] F. D. Ledley, « Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products », *Hum. Gene Ther.*, vol. 6, n° 9, p. 1129-1144, sept. 1995, doi: 10.1089/hum.1995.6.9-1129.
- [42] A. Fischer, « Repair and replace », *Nature*, vol. 510, n° 7504, Art. n° 7504, juin 2014, doi: 10.1038/nature13344.

- [43] « Thérapie génique », *Inserm - La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique> (consulté le mars 26, 2020).
- [44] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, et M. R. Abedi, « Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update », *J Gene Med*, vol. 20, n° 5, p. e3015, 2018, doi: 10.1002/jgm.3015.
- [45] S. A. Rosenberg *et al.*, « Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction », *N. Engl. J. Med.*, vol. 323, n° 9, p. 570-578, août 1990, doi: 10.1056/NEJM199008303230904.
- [46] P. D. Williams et P. A. Kingston, « Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease », *Cardiovasc Res*, vol. 91, n° 4, p. 565-576, sept. 2011, doi: 10.1093/cvr/cvr197.
- [47] B. Sharma, W. Ma, I. M. Adjei, J. Panyam, S. Dimitrijevic, et V. Labhasetwar, « Nanoparticle-mediated p53 gene therapy for tumor inhibition », *Drug Deliv Transl Res*, vol. 1, n° 1, p. 43-52, févr. 2011, doi: 10.1007/s13346-010-0008-9.
- [48] C.-K. Kim, E.-J. Choi, S.-H. Choi, J.-S. Park, K. H. Haider, et W. S. Ahn, « Enhanced p53 gene transfer to human ovarian cancer cells using the cationic nonviral vector, DDC », *Gynecol. Oncol.*, vol. 90, n° 2, p. 265-272, août 2003, doi: 10.1016/s0090-8258(03)00248-8.
- [49] J. Wang, X.-X. Lu, D.-Z. Chen, S.-F. Li, et L.-S. Zhang, « Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer », *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, n° 3, p. 400-403, févr. 2004, doi: 10.3748/wjg.v10.i3.400.
- [50] T. Shirakawa *et al.*, « Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer », *Hum. Gene Ther.*, vol. 18, n° 12, p. 1225-1232, déc. 2007, doi: 10.1089/hum.2007.074.
- [51] D. H. Palmer, L. S. Young, et V. Mautner, « Cancer gene-therapy: clinical trials », *Trends Biotechnol.*, vol. 24, n° 2, p. 76-82, févr. 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2005.12.002.
- [52] J. Voges *et al.*, « Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma », *Ann. Neurol.*, vol. 54, n° 4, p. 479-487, oct. 2003, doi: 10.1002/ana.10688.
- [53] M.-A. Nishitani, T. Sakai, H.-O. Kanayama, K. Himeno, et S. Kagawa, « Cytokine Gene

Therapy for Cancer with Naked DNA », *Molecular Urology*, vol. 4, n° 2, p. 47-50, juin 2000, doi: 10.1089/10915360050138576.

[54] R. Kircheis *et al.*, « Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- α induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity », *Cancer Gene Ther*, vol. 9, n° 8, p. 673-680, août 2002, doi: 10.1038/sj.cgt.7700487.

[55] O. T. Avery, C. M. MacLeod, et M. McCarty, « STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES », *J Exp Med*, vol. 79, n° 2, p. 137-158, févr. 1944.

[56] S. Sharad, « Antisense Therapy: An Overview », *Antisense Therapy*, nov. 2019, doi: 10.5772/intechopen.86867.

[57] Y. Fichou et C. Férec, « The potential of oligonucleotides for therapeutic applications », *Trends Biotechnol.*, vol. 24, n° 12, p. 563-570, déc. 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.10.003.

[58] S. T. Crooke, « Progress in Antisense Technology », *Annual Review of Medicine*, vol. 55, n° 1, p. 61-95, févr. 2004, doi: 10.1146/annurev.med.55.091902.104408.

[59] A. De Mesmaeker, R. Haener, P. Martin, et H. E. Moser, « Antisense Oligonucleotides », *Accounts of Chemical Research*, vol. 28, n° 9, p. 366-374, sept. 1995, doi: 10.1021/ar00057a002.

[60] F. Eckstein, « Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? », *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 10, n° 2, p. 117-121, avr. 2000, doi: 10.1089/oli.1.2000.10.117.

[61] M. A. Guvakova, L. A. Yakubov, I. Vlodaysky, J. L. Tonkinson, et C. A. Stein, « Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to Basic Fibroblast Growth Factor, Inhibit Its Binding to Cell Surface Receptors, and Remove It from Low Affinity Binding Sites on Extracellular Matrix », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 6, p. 2620-2627, oct. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.6.2620.

[62] M. Manoharan, « 2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1489, n° 1, p. 117-130, déc. 1999, doi: 10.1016/s0167-4781(99)00138-4.

[63] B. F. Baker *et al.*, « 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.*, vol. 272, n° 18, p. 11994-12000, mai 1997, doi: 10.1074/jbc.272.18.11994.

[64] J. Kurreck, « Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications », *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, n° 8, p. 1628-1644, avr. 2003, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x.

[65] V. K. Sharma, P. Rungta, et A. K. Prasad, « Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments », *RSC Adv.*, vol. 4, n° 32, p. 16618, 2014, doi: 10.1039/c3ra47841f.

[66] C. Marwick, « First “antisense” drug will treat CMV retinitis », *JAMA*, vol. 280, n° 10, p. 871, sept. 1998.

[67] R. Zielinski et K. N. Chi, « Custirsén (OGX-011): a second-generation antisense inhibitor of clusterin in development for the treatment of prostate cancer », *Future Oncol*, vol. 8, n° 10, p. 1239-1251, oct. 2012, doi: 10.2217/fon.12.129.

[68] J. A. Bauman, S.-D. Li, A. Yang, L. Huang, et R. Kole, « Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides », *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, n° 22, p. 8348-8356, déc. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq731.

[69] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, et C. Hélène, « Sequence-specific recognition of the major groove of DNA by oligodeoxynucleotides via triple helix formation. Footprinting studies. », *Nucleic Acids Res*, vol. 16, n° 24, p. 11431-11440, déc. 1988.

[70] H. E. Moser et P. B. Dervan, « Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation », *Science*, vol. 238, n° 4827, p. 645-650, oct. 1987, doi: 10.1126/science.3118463.

[71] M. D. Frank-Kamenetskii et S. M. Mirkin, « Triplex DNA structures », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 64, p. 65-95, 1995, doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000433.

[72] G. Singhal *et al.*, « DNA triplex-mediated inhibition of MET leads to cell death and tumor regression in hepatoma », *Cancer Gene Ther*, vol. 18, n° 7, p. 520-530, juill. 2011, doi: 10.1038/cgt.2011.21.

[73] E. Wickstrom, *Clinical Trials of Genetic Therapy with Antisense DNA and DNA*

Vectors. 1998.

- [74] K. Sridharan et N. J. Gogtay, « Therapeutic nucleic acids: current clinical status », *Br J Clin Pharmacol*, vol. 82, n° 3, p. 659-672, sept. 2016, doi: 10.1111/bcp.12987.
- [75] M. Blind et M. Blank, « Aptamer Selection Technology and Recent Advances », *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 4, p. e223, 2015, doi: 10.1038/mtna.2014.74.
- [76] Andrew Kinghorn, L. Fraser, S. Liang, S. Shiu, et J. Tanner, « Aptamer Bioinformatics », *IJMS*, vol. 18, n° 12, p. 2516, nov. 2017, doi: 10.3390/ijms18122516.
- [77] B. Santosh et P. K. Yadava, « Nucleic acid aptamers: research tools in disease diagnostics and therapeutics », *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 540451, 2014, doi: 10.1155/2014/540451.
- [78] H. Kaur, J. G. Bruno, A. Kumar, et T. K. Sharma, « Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines », *Theranostics*, vol. 8, n° 15, p. 4016-4032, juill. 2018, doi: 10.7150/thno.25958.
- [79] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck, et D. J. Fernandes, « The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 7, p. 2358-2365, avr. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5723.
- [80] F. Mongelard et P. Bouvet, « AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia », *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 12, n° 1, p. 107-114, févr. 2010.
- [81] J. E. Rosenberg *et al.*, « A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma », *Invest New Drugs*, vol. 32, n° 1, p. 178-187, févr. 2014, doi: 10.1007/s10637-013-0045-6.
- [82] M. Hecker et A. H. Wagner, « Transcription factor decoy technology: A therapeutic update », *Biochemical Pharmacology*, vol. 144, p. 29-34, nov. 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.06.122.
- [83] G. Miklossy, T. S. Hilliard, et J. Turkson, « Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 12, n° 8, p. 611-629, août 2013, doi: 10.1038/nrd4088.

- [84] A. G. Orlandini von Niessen *et al.*, « Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening », *Mol Ther*, vol. 27, n° 4, p. 824-836, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.12.011.
- [85] Z. Trepotec, E. Lichtenegger, C. Plank, M. K. Aneja, et C. Rudolph, « Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases », *Molecular Therapy*, vol. 27, n° 4, p. 794-802, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.12.012.
- [86] J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, et R. E. Rhoads, « Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG », *RNA*, vol. 7, n° 10, p. 1486-1495, oct. 2001.
- [87] C. Leonhardt *et al.*, « Single-cell mRNA transfection studies: delivery, kinetics and statistics by numbers », *Nanomedicine*, vol. 10, n° 4, p. 679-688, mai 2014, doi: 10.1016/j.nano.2013.11.008.
- [88] R. M. Conry *et al.*, « Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector », *Cancer Res.*, vol. 55, n° 7, p. 1397-1400, avr. 1995.
- [89] L. M. Kranz *et al.*, « Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy », *Nature*, vol. 534, n° 7607, p. 396-401, 16 2016, doi: 10.1038/nature18300.
- [90] T. Tokunaga *et al.*, « Ribozyme-mediated inactivation of mutant K-ras oncogene in a colon cancer cell line », *British Journal of Cancer*, vol. 83, n° 6, Art. n° 6, sept. 2000, doi: 10.1054/bjoc.2000.1363.
- [91] D. Kumar, « Chapter 30 - Gene, genome, and molecular therapeutics », in *Clinical Molecular Medicine*, D. Kumar, Éd. Academic Press, 2020, p. 505-520.
- [92] Y. Li *et al.*, « In vitro evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy », *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, mai 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43422-0.
- [93] G. Zimmer, « RNA Replicons - A New Approach for Influenza Virus Immunoprophylaxis », *Viruses*, vol. 2, n° 2, p. 413-434, janv. 2010, doi: 10.3390/v2020413.
- [94] K. Lundstrom, « Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines », *Vaccines (Basel)*, vol. 4, n° 4, nov. 2016, doi: 10.3390/vaccines4040039.

- [95] L.-Y. Zhou, Z.-Y. He, T. Xu, et Y.-Q. Wei, « Current Advances in Small Activating RNAs for Gene Therapy: Principles, Applications and Challenges », *Curr Gene Ther*, vol. 18, n° 3, p. 134-142, 2018, doi: 10.2174/1566523218666180619155018.
- [96] B. A. Janowski, S. T. Younger, D. B. Hardy, R. Ram, K. E. Huffman, et D. R. Corey, « Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs », *Nat Chem Biol*, vol. 3, n° 3, p. 166-173, mars 2007, doi: 10.1038/nchembio860.
- [97] L. Zheng, L. Wang, J. Gan, et H. Zhang, « RNA activation: Promise as a new weapon against cancer », *Cancer Letters*, vol. 355, n° 1, p. 18-24, déc. 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.004.
- [98] R. L. Setten, H. L. Lightfoot, N. A. Habib, et J. J. Rossi, « Development of MTL-CEBPA: Small Activating RNA Drug for Hepatocellular Carcinoma », *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 19, n° 8, p. 611-621, juill. 2018, doi: 10.2174/1389201019666180611093428.
- [99] A. Kwok, N. Raulf, et N. Habib, « Developing small activating RNA as a therapeutic: current challenges and promises », *Ther Deliv*, vol. 10, n° 3, p. 151-164, 2019, doi: 10.4155/tde-2018-0061.
- [100] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, et T. Tuschl, « Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells », *Nature*, vol. 411, n° 6836, p. 494-498, mai 2001, doi: 10.1038/35078107.
- [101] C. Napoli, C. Lemieux, et R. Jorgensen, « Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans », *Plant Cell*, vol. 2, n° 4, p. 279-289, avr. 1990, doi: 10.1105/tpc.2.4.279.
- [102] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, et C. C. Mello, « Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* », *Nature*, vol. 391, n° 6669, p. 806-811, févr. 1998, doi: 10.1038/35888.
- [103] P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, et D. P. Bartel, « RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals », *Cell*, vol. 101, n° 1, p. 25-33, mars 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80620-0.
- [104] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, et G. J. Hannon, « Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference », *Nature*, vol. 409, n° 6818, p. 363-366,

janv. 2001, doi: 10.1038/35053110.

[105] C. C. Mello et D. Conte, « Revealing the world of RNA interference », *Nature*, vol. 431, n° 7006, p. 338-342, sept. 2004, doi: 10.1038/nature02872.

[106] S. Bajan et G. Hutvagner, « RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs », *Cells*, vol. 9, n° 1, p. 137, janv. 2020, doi: 10.3390/cells9010137.

[107] P. E. Saw et E.-W. Song, « siRNA therapeutics: a clinical reality », *Sci. China Life Sci.*, avr. 2019, doi: 10.1007/s11427-018-9438-y.

[108] R. R. Nikam et K. R. Gore, « Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery », *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 28, n° 4, p. 209-224, août 2018, doi: 10.1089/nat.2017.0715.

[109] M. A. Subhan et V. P. Torchilin, « Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment », *Translational Research*, vol. 214, p. 62-91, déc. 2019, doi: 10.1016/j.trsl.2019.07.006.

[110] « RNA interference overview | Abcam ». <https://www.abcam.com/pathways/rna-interference---a-comprehensive-overview> (consulté le avr. 11, 2020).

[111] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, et T. Tuschl, « Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells », *Nature*, vol. 411, n° 6836, p. 494-498, mai 2001, doi: 10.1038/35078107.

[112] I. V. Chernikov, V. V. Vlassov, et E. L. Chernolovskaya, « Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic », *Front. Pharmacol.*, vol. 10, p. 444, avr. 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00444.

[113] G. Meister et T. Tuschl, « Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA », *Nature*, vol. 431, n° 7006, p. 343-349, sept. 2004, doi: 10.1038/nature02873.

[114] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, et P. D. Zamore, « Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes », *Cell*, vol. 123, n° 4, p. 607-620, nov. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.044.

[115] G. J. Hannon, « RNA interference », *Nature*, vol. 418, n° 6894, p. 244-251, juill. 2002,

doi: 10.1038/418244a.

[116] B. Hu, Y. Weng, X. Xia, X. Liang, et Y. Huang, « Clinical advances of siRNA therapeutics », *J Gene Med*, vol. 21, n° 7, juill. 2019, doi: 10.1002/jgm.3097.

[117] A. Pickford et G. Macino, « 4 - Gene Silencing as a Tool for the Identification of Gene Function in Fungi », in *Applied Mycology and Biotechnology*, vol. 5, D. K. Arora et R. M. Berka, Éd. Elsevier, 2005, p. 93-116.

[118] M. Tijsterman et R. H. A. Plasterk, « Dicers at RISC; the mechanism of RNAi », *Cell*, vol. 117, n° 1, p. 1-3, avr. 2004, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00293-4.

[119] M. Fareh, K.-H. Yeom, A. C. Haagsma, S. Chauhan, I. Heo, et C. Joo, « TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments », *Nat Commun*, vol. 7, n° 1, p. 13694, déc. 2016, doi: 10.1038/ncomms13694.

[120] S. M. Daniels et A. Gatignol, « The Multiple Functions of TRBP, at the Hub of Cell Responses to Viruses, Stress, and Cancer », *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 76, n° 3, p. 652-666, sept. 2012, doi: 10.1128/MMBR.00012-12.

[121] B. A. Janowski *et al.*, « Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing », *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, n° 9, p. 787-792, sept. 2006, doi: 10.1038/nsmb1140.

[122] A. Lingel, B. Simon, E. Izaurralde, et M. Sattler, « Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain », *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, n° 6, p. 576-577, juin 2004, doi: 10.1038/nsmb777.

[123] Z. Ye, H. Jin, et Q. Qian, « Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research », *J Cancer*, vol. 6, n° 9, p. 877-882, juill. 2015, doi: 10.7150/jca.11735.

[124] L.-Y. Zhou, Z. Qin, Y.-H. Zhu, Z.-Y. He, et T. Xu, « Current RNA-based Therapeutics in Clinical Trials », *CGT*, vol. 19, n° 3, p. 172-196, sept. 2019, doi: 10.2174/1566523219666190719100526.

[125] S. D. Chandradoss, N. T. Schirle, M. Szczepaniak, I. J. MacRae, et C. Joo, « A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting », *Cell*, vol. 162, n° 1, p. 96-107, juill. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.06.032.

- [126] N. T. Schirle, J. Sheu-Gruttadauria, et I. J. MacRae, « Structural basis for microRNA targeting », *Science*, vol. 346, n° 6209, p. 608-613, oct. 2014, doi: 10.1126/science.1258040.
- [127] X. Chi, P. Gatti, et T. Papoian, « Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics », *Drug Discovery Today*, vol. 22, n° 5, p. 823-833, mai 2017, doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.013.
- [128] A. Singh, P. Trivedi, et N. K. Jain, « Advances in siRNA delivery in cancer therapy », *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 46, n° 2, p. 274-283, févr. 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1307210.
- [129] M. Jinek et J. A. Doudna, « A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference », *Nature*, vol. 457, n° 7228, p. 405-412, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07755.
- [130] Y. Luo, Z. Na, et S. A. Slavoff, « P-Bodies: Composition, Properties, and Functions », *Biochemistry*, vol. 57, n° 17, p. 2424-2431, mai 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01162.
- [131] M. Dominska et D. M. Dykxhoorn, « Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape », *J Cell Sci*, vol. 123, n° 8, p. 1183-1189, avr. 2010, doi: 10.1242/jcs.066399.
- [132] M. Manoharan, « RNA interference and chemically modified small interfering RNAs », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 8, n° 6, p. 570-579, déc. 2004, doi: 10.1016/j.cbpa.2004.10.007.
- [133] M. A. Behlke, « Chemical Modification of siRNAs for *In Vivo* Use », *Oligonucleotides*, vol. 18, n° 4, p. 305-320, déc. 2008, doi: 10.1089/oli.2008.0164.
- [134] C. Chen, Z. Yang, et X. Tang, « Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy », *Med Res Rev*, vol. 38, n° 3, p. 829-869, mai 2018, doi: 10.1002/med.21479.
- [135] R. Breslow et W. H. Chapman, « On the mechanism of action of ribonuclease A: relevance of enzymatic studies with a p-nitrophenylphosphate ester and a thiophosphate ester. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, n° 19, p. 10018-10021, sept. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.19.10018.
- [136] I. V. Chernikov *et al.*, « Cholesterol-Containing Nuclease-Resistant siRNA Accumulates in Tumors in a Carrier-free Mode and Silences MDR1 Gene », *Molecular Therapy*

- *Nucleic Acids*, vol. 6, p. 209-220, mars 2017, doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.011.

[137] F. Czauderna, « Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells », *Nucleic Acids Research*, vol. 31, n° 11, p. 2705-2716, juin 2003, doi: 10.1093/nar/gkg393.

[138] T. A. Zanardi *et al.*, « Chronic Toxicity Assessment of 2'- O -Methoxyethyl Antisense Oligonucleotides in Mice », *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 28, n° 4, p. 233-241, août 2018, doi: 10.1089/nat.2017.0706.

[139] D. M. Kenski *et al.*, « siRNA-optimized Modifications for Enhanced In Vivo Activity », *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 1, p. e5, 2012, doi: 10.1038/mtna.2011.4.

[140] F. Eckstein, « Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides », *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 24, n° 6, p. 374-387, déc. 2014, doi: 10.1089/nat.2014.0506.

[141] A. H. S. Hall, J. Wan, A. Spesock, Z. Sergueeva, B. R. Shaw, et K. A. Alexander, « High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA », *Nucleic Acids Research*, vol. 34, n° 9, p. 2773-2781, mai 2006, doi: 10.1093/nar/gkl339.

[142] J. Soutschek *et al.*, « Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs », *Nature*, vol. 432, n° 7014, p. 173-178, nov. 2004, doi: 10.1038/nature03121.

[143] S. Wang *et al.*, « Cellular uptake mediated by epidermal growth factor receptor facilitates the intracellular activity of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides », *Nucleic Acids Research*, vol. 46, n° 7, p. 3579-3594, avr. 2018, doi: 10.1093/nar/gky145.

[144] T. Iannitti, J. Morales-Medina, et B. Palmieri, « Phosphorothioate Oligonucleotides: Effectiveness and Toxicity », *CDT*, vol. 15, n° 7, p. 663-673, juin 2014, doi: 10.2174/1389450115666140321100304.

[145] K. Sipa *et al.*, « Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA », *RNA*, vol. 13, n° 8, p. 1301-1316, juin 2007, doi: 10.1261/rna.538907.

[146] H. Peacock, A. Kannan, P. A. Beal, et C. J. Burrows, « Chemical Modification of siRNA Bases To Probe and Enhance RNA Interference », *J. Org. Chem.*, vol. 76, n° 18, p. 7295-7300,

sept. 2011, doi: 10.1021/jo2012225.

[147] Z. Ni et P. Hui, « Emerging Pharmacologic Therapies for Wet Age-Related Macular Degeneration », *Ophthalmologica*, vol. 223, n° 6, p. 401-410, 2009, doi: 10.1159/000228926.

[148] C. Chakraborty, A. R. Sharma, G. Sharma, C. G. P. Doss, et S.-S. Lee, « Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine », *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 8, p. 132-143, sept. 2017, doi: 10.1016/j.omtn.2017.06.005.

[149] G. Mahmoodi Chalbatani *et al.*, « Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach », *IJN*, vol. Volume 14, p. 3111-3128, mai 2019, doi: 10.2147/IJN.S200253.

[150] Y. Xin, M. Huang, W. W. Guo, Q. Huang, L. zhen Zhang, et G. Jiang, « Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy », *Mol Cancer*, vol. 16, n° 1, p. 134, déc. 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0683-y.

[151] N. S. Dejneka, S. Wan, O. S. Bond, D. J. Kornbrust, et S. J. Reich, « Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes », *Mol. Vis.*, vol. 14, p. 997-1005, mai 2008.

[152] J. DeVincenzo *et al.*, « Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV) », *Antiviral Res.*, vol. 77, n° 3, p. 225-231, mars 2008, doi: 10.1016/j.antiviral.2007.11.009.

[153] M. R. Zamora *et al.*, « RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, n° 4, p. 531-538, févr. 2011, doi: 10.1164/rccm.201003-0422OC.

[154] T. L. Astor, « RNA interference, RSV, and lung transplantation: a promising future for siRNA therapeutics », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, n° 4, p. 427-428, févr. 2011, doi: 10.1164/rccm.201009-1488ED.

[155] T. Golan *et al.*, « RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients », *Oncotarget*, vol. 6, n° 27, p. 24560-24570, sept. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4183.

[156] J. C. Burnett et J. J. Rossi, « RNA-based therapeutics: current progress and future

prospects », *Chem. Biol.*, vol. 19, n° 1, p. 60-71, janv. 2012, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.12.008.

[157] J. D. Thompson *et al.*, « Toxicological and Pharmacokinetic Properties of Chemically Modified siRNAs Targeting p53 RNA Following Intravenous Administration », *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 22, n° 4, p. 255-264, août 2012, doi: 10.1089/nat.2012.0371.

[158] M. Tandon, S. V. Vemula, et S. K. Mittal, « Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics », *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 15, n° 1, p. 31-51, janv. 2011, doi: 10.1517/14728222.2011.538682.

[159] D. Adams *et al.*, « Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis », *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, n° 1, p. 11-21, 05 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1716153.

[160] O. B. Suhr *et al.*, « Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study », *Orphanet J Rare Dis*, vol. 10, p. 109, sept. 2015, doi: 10.1186/s13023-015-0326-6.

[161] R. L. Setten, J. J. Rossi, et S. Han, « The current state and future directions of RNAi-based therapeutics », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 18, n° 6, p. 421-446, juin 2019, doi: 10.1038/s41573-019-0017-4.

[162] L. J. Scott, « Givosiran: First Approval », *Drugs*, vol. 80, n° 3, p. 335-339, févr. 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01269-0.

[163] D. M. Bissell, K. E. Anderson, et H. L. Bonkovsky, « Porphyrria », *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, n° 9, p. 862-872, août 2017, doi: 10.1056/NEJMra1608634.

[164] E. Sardh *et al.*, « Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyrria », *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, n° 6, p. 549-558, 07 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1807838.

[165] K. A. Worringer *et al.*, « The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes », *Cell Stem Cell*, vol. 14, n° 1, p. 40-52, janv. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.001.

[166] B. J. Reinhart *et al.*, « The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* », *Nature*, vol. 403, n° 6772, p. 901-906, févr. 2000, doi:

10.1038/35002607.

[167] Y. Lee *et al.*, « MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II », *EMBO J.*, vol. 23, n° 20, p. 4051-4060, oct. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.

[168] Y. Lee *et al.*, « The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing », *Nature*, vol. 425, n° 6956, p. 415-419, sept. 2003, doi: 10.1038/nature01957.

[169] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, et U. Kutay, « Nuclear export of microRNA precursors », *Science*, vol. 303, n° 5654, p. 95-98, janv. 2004, doi: 10.1126/science.1090599.

[170] H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, et W. Filipowicz, « Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III », *Cell*, vol. 118, n° 1, p. 57-68, juill. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.017.

[171] Y. Peng et C. M. Croce, « The role of MicroRNAs in human cancer », *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, janv. 2016, doi: 10.1038/sigtrans.2015.4.

[172] P. B. Kwak, S. Iwasaki, et Y. Tomari, « The microRNA pathway and cancer », *Cancer Sci.*, vol. 101, n° 11, p. 2309-2315, nov. 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01683.x.

[173] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, et C. Peng, « Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation », *Front. Endocrinol.*, vol. 9, p. 402, août 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00402.

[174] Y. Tomari et P. D. Zamore, « Perspective: machines for RNAi », *Genes Dev.*, vol. 19, n° 5, p. 517-529, mars 2005, doi: 10.1101/gad.1284105.

[175] P. Xu, S. Y. Vernooy, M. Guo, et B. A. Hay, « The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism », *Curr. Biol.*, vol. 13, n° 9, p. 790-795, avr. 2003, doi: 10.1016/s0960-9822(03)00250-1.

[176] G. A. Calin *et al.*, « Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, n° 24, p. 15524-15529, nov. 2002, doi: 10.1073/pnas.242606799.

[177] D. Jin et H. Lee, « A computational approach to identifying gene-microRNA modules

- in cancer », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 11, n° 1, p. e1004042, janv. 2015, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004042.
- [178] A. G. Seto *et al.*, « Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma », *Br. J. Haematol.*, vol. 183, n° 3, p. 428-444, 2018, doi: 10.1111/bjh.15547.
- [179] A. G. Bader, D. Brown, et M. Winkler, « The Promise of MicroRNA Replacement Therapy », *Cancer Res*, vol. 70, n° 18, p. 7027-7030, sept. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2010.
- [180] A. Bouchie, « First microRNA mimic enters clinic », *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, n° 7, p. 577, juill. 2013, doi: 10.1038/nbt0713-577.
- [181] G. Misso *et al.*, « Mir-34: a new weapon against cancer? », *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 3, p. e194, sept. 2014, doi: 10.1038/mtna.2014.47.
- [182] M. S. Beg *et al.*, « Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors », *Invest New Drugs*, vol. 35, n° 2, p. 180-188, 2017, doi: 10.1007/s10637-016-0407-y.
- [183] Y. W. Iwasaki, M. C. Siomi, et H. Siomi, « PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 84, n° 1, p. 405-433, 2015, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034258.
- [184] M. C. Siomi, K. Sato, D. Pezic, et A. A. Aravin, « PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, n° 4, p. 246-258, avr. 2011, doi: 10.1038/nrm3089.
- [185] D. M. Ozata, I. Gainetdinov, A. Zoch, D. O'Carroll, et P. D. Zamore, « PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions », *Nat Rev Genet*, vol. 20, n° 2, p. 89-108, févr. 2019, doi: 10.1038/s41576-018-0073-3.
- [186] S. Houwing *et al.*, « A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish », *Cell*, vol. 129, n° 1, p. 69-82, avr. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.026.
- [187] D. Moazed, « Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence », *Nature*, vol. 457, n° 7228, p. 413-420, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07756.

- [188] D. Carroll, « Genome Editing: Past, Present, and Future », *Yale J Biol Med*, vol. 90, n° 4, p. 653-659, 2017.
- [189] Z. Chen, B. Krishnamachary, J. Pachecho-Torres, M. Penet, et Z. M. Bhujwala, « Theranostic small interfering RNA nanoparticles in cancer precision nanomedicine », *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 12, n° 2, mars 2020, doi: 10.1002/wnan.1595.
- [190] J. E. Zuckerman et M. E. Davis, « Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 14, n° 12, p. 843-856, déc. 2015, doi: 10.1038/nrd4685.
- [191] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, et H. J. Haisma, « Endosomal escape pathways for delivery of biologicals », *Journal of Controlled Release*, vol. 151, n° 3, p. 220-228, mai 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.004.
- [192] R. S. Shukla, A. Jain, Z. Zhao, et K. Cheng, « Intracellular trafficking and exocytosis of a multi-component siRNA nanocomplex », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 12, n° 5, p. 1323-1334, juill. 2016, doi: 10.1016/j.nano.2016.02.003.
- [193] S. Ohkuma et B. Poole, « Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 75, n° 7, p. 3327-3331, juill. 1978, doi: 10.1073/pnas.75.7.3327.
- [194] C. Xu et J. Wang, « Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy », *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, n° 1, p. 1-12, févr. 2015, doi: 10.1016/j.ajps.2014.08.011.
- [195] R. L. Juliano, « The delivery of therapeutic oligonucleotides », *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n° 14, p. 6518-6548, août 2016, doi: 10.1093/nar/gkw236.
- [196] J. B. Bramsen *et al.*, « A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity », *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, n° 9, p. 2867-2881, mai 2009, doi: 10.1093/nar/gkp106.
- [197] K. A. Whitehead, R. Langer, et D. G. Anderson, « Knocking down barriers: advances in siRNA delivery », *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 8, n° 2, p. 129-138, févr. 2009, doi: 10.1038/nrd2742.
- [198] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, et P. H. Hofschneider, « Gene transfer into

mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields », *EMBO J.*, vol. 1, n° 7, p. 841-845, 1982.

[199] M. Okino et H. Mohri, « EFFECTS OF A HIGH-VOLTAGE ELECTRICAL IMPULSE AND AN ANTICANCER DRUG ON *IN VIVO* GROWING TUMORS », *Japanese Journal of Cancer Research GANN*, vol. 78, n° 12, p. 1319-1321, 1987, doi: 10.20772/cancersci1985.78.12_1319.

[200] L. C. Heller et R. Heller, « In Vivo Electroporation for Gene Therapy », *Human Gene Therapy*, vol. 17, n° 9, p. 890-897, sept. 2006, doi: 10.1089/hum.2006.17.890.

[201] D. A. Melton, « Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, n° 1, p. 144-148, janv. 1985.

[202] Q. Li *et al.*, « DDX3X regulates cell survival and cell cycle during mouse early embryonic development », *J Biomed Res*, vol. 28, n° 4, p. 282-291, juill. 2014, doi: 10.7555/JBR.27.20130047.

[203] P. Tiefenboeck, J. A. Kim, et J.-C. Leroux, « Intracellular delivery of colloids: Past and future contributions from microinjection », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 132, p. 3-15, juill. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.06.013.

[204] T. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu, et J. C. Sanford, « High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells », *Nature*, vol. 327, n° 6117, Art. n° 6117, mai 1987, doi: 10.1038/327070a0.

[205] N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, et D. McCabe, « In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, n° 24, p. 9568-9572, déc. 1990.

[206] W. H. Sun *et al.*, « In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. », *PNAS*, vol. 92, n° 7, p. 2889-2893, mars 1995, doi: 10.1073/pnas.92.7.2889.

[207] D. H. Fuller, P. Loudon, et C. Schmaljohn, « Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases », *Methods*, vol. 40, n° 1, p. 86-97, sept. 2006, doi: 10.1016/j.jymeth.2006.05.022.

[208] M. T. Lin, L. Pulkkinen, J. Uitto, et K. Yoon, « The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy », *Int. J. Dermatol.*, vol. 39, n° 3, p. 161-170, mars 2000, doi:

10.1046/j.1365-4362.2000.00925.x.

[209] M. Alsaggar et D. Liu, « Chapter One - Physical Methods for Gene Transfer », in *Advances in Genetics*, vol. 89, L. Huang, D. Liu, et E. Wagner, Éd. Academic Press, 2015, p. 1-24.

[210] M. A. Kotterman, T. W. Chalberg, et D. V. Schaffer, « Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook », *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 17, p. 63-89, 2015, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104938.

[211] « Gene Therapy Clinical Trials Worldwide ». <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> (consulté le mai 13, 2020).

[212] R. Waehler, S. J. Russell, et D. T. Curiel, « Engineering targeted viral vectors for gene therapy », *Nat Rev Genet*, vol. 8, n° 8, p. 573-587, août 2007, doi: 10.1038/nrg2141.

[213] D. S. Bangari et S. K. Mittal, « Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity », *Curr Gene Ther*, vol. 6, n° 2, p. 215-226, avr. 2006, doi: 10.2174/156652306776359478.

[214] A. Józkwicz et J. Dulak, « Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy », *Acta Biochim Pol*, vol. 52, n° 3, p. 589-599, 2005.

[215] S. Lehrman, « Virus treatment questioned after gene therapy death », *Nature*, vol. 401, n° 6753, p. 517-518, oct. 1999, doi: 10.1038/43977.

[216] S. E. Raper *et al.*, « Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer », *Mol. Genet. Metab.*, vol. 80, n° 1-2, p. 148-158, oct. 2003, doi: 10.1016/j.ymgme.2003.08.016.

[217] O.-W. Merten, C. Gény-Fiamma, et A. M. Douar, « Current issues in adeno-associated viral vector production », *Gene Ther.*, vol. 12 Suppl 1, p. S51-61, oct. 2005, doi: 10.1038/sj.gt.3302615.

[218] H. Büning, M. Braun-Falco, et M. Hallek, « Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy », *Cells Tissues Organs (Print)*, vol. 177, n° 3, p. 139-150, 2004, doi: 10.1159/000079988.

[219] M. Thanou, S. Waddington, et A. D. Miller, « 1.06 - Gene Therapy », in *Comprehensive*

- Medicinal Chemistry II*, J. B. Taylor et D. J. Triggle, Éd. Oxford: Elsevier, 2007, p. 297-319.
- [220] K. A. High, « Clinical Gene Transfer Studies for Hemophilia B », *Semin Thromb Hemost*, vol. 30, n° 2, p. 257-267, avr. 2004, doi: 10.1055/s-2004-825639.
- [221] B. C. Guild, R. C. Mulligan, P. Gros, et D. E. Housman, « Retroviral transfer of a murine cDNA for multidrug resistance confers pleiotropic drug resistance to cells without prior drug selection », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 85, n° 5, p. 1595-1599, mars 1988, doi: 10.1073/pnas.85.5.1595.
- [222] K. M. Kurian, C. J. Watson, et A. H. Wyllie, « Retroviral vectors », *Mol Pathol*, vol. 53, n° 4, p. 173-176, août 2000.
- [223] E. Check, « Gene therapy put on hold as third child develops cancer », *Nature*, vol. 433, n° 7026, p. 561, févr. 2005, doi: 10.1038/433561a.
- [224] D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, et S. Yu, « Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery », *Bioconjug. Chem.*, vol. 21, n° 4, p. 563-577, avr. 2010, doi: 10.1021/bc900393r.
- [225] Y. Gao, X.-L. Liu, et X.-R. Li, « Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers », *Int J Nanomedicine*, vol. 6, p. 1017-1025, 2011, doi: 10.2147/IJN.S17040.
- [226] B. Hu *et al.*, « Therapeutic siRNA: state of the art », *Sig Transduct Target Ther*, vol. 5, n° 1, p. 101, déc. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0207-x.
- [227] D. Zhi, Y. Zhao, S. Cui, H. Chen, et S. Zhang, « Conjugates of small targeting molecules to non-viral vectors for the mediation of siRNA », *Acta Biomaterialia*, vol. 36, p. 21-41, mai 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.048.
- [228] J. J. Turner, « Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells », *Nucleic Acids Research*, vol. 33, n° 21, p. 6837-6849, nov. 2005, doi: 10.1093/nar/gki991.
- [229] B. R. Meade *et al.*, « Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications », *Nat Biotechnol*, vol. 32, n° 12, p. 1256-1261, déc. 2014, doi: 10.1038/nbt.3078.
- [230] I. Dovydenko, I. Tarassov, A. Venyaminova, et N. Entelis, « Method of carrier-free

delivery of therapeutic RNA importable into human mitochondria: Lipophilic conjugates with cleavable bonds », *Biomaterials*, vol. 76, p. 408-417, janv. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.075.

[231] C. Bouillon *et al.*, « Biomolecular dynamic covalent polymers for DNA complexation and siRNA delivery », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 6, n° 44, p. 7239-7246, 2018, doi: 10.1039/C8TB01278D.

[232] J. Yang, C. Chen, et X. Tang, « Cholesterol-Modified Caged siRNAs for Photoregulating Exogenous and Endogenous Gene Expression », *Bioconjugate Chem.*, vol. 29, n° 4, p. 1010-1015, avr. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00080.

[233] J. Soutschek *et al.*, « Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs », *Nature*, vol. 432, n° 7014, p. 173-178, nov. 2004, doi: 10.1038/nature03121.

[234] E. Neumann *et al.*, « Native albumin for targeted drug delivery », *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 7, n° 8, p. 915-925, août 2010, doi: 10.1517/17425247.2010.498474.

[235] C. Wolfrum *et al.*, « Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs », *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, n° 10, p. 1149-1157, oct. 2007, doi: 10.1038/nbt1339.

[236] W. Tai, « Current Aspects of siRNA Bioconjugate for In Vitro and In Vivo Delivery », *Molecules*, vol. 24, n° 12, p. 2211, juin 2019, doi: 10.3390/molecules24122211.

[237] C. I. Wooddell *et al.*, « Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection », *Mol. Ther.*, vol. 21, n° 5, p. 973-985, mai 2013, doi: 10.1038/mt.2013.31.

[238] D. B. Rozema, K. Ekena, D. L. Lewis, A. G. Loomis, et J. A. Wolff, « Endosomolysis by masking of a membrane-active agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules », *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, n° 1, p. 51-57, févr. 2003, doi: 10.1021/bc0255945.

[239] K. Nishina *et al.*, « Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol », *Mol. Ther.*, vol. 16, n° 4, p. 734-740, avr. 2008, doi: 10.1038/mt.2008.14.

[240] J. Hoyer et I. Neundorff, « Peptide Vectors for the Nonviral Delivery of Nucleic Acids », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 7, p. 1048-1056, juill. 2012, doi: 10.1021/ar2002304.

- [241] M. Green, M. Ishino, et P. M. Loewenstein, « Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression », *Cell*, vol. 58, n° 1, p. 215-223, juill. 1989, doi: 10.1016/0092-8674(89)90417-0.
- [242] S. Abes, J. P. Richard, A. Thierry, P. Clair, et B. Lebleu, « Tat-derived cell-penetrating peptides: Discovery, mechanism of cell uptake, and applications to the delivery of oligonucleotides », *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, p. 29-42, janv. 2007.
- [243] J. H. Jeong, H. Mok, Y.-K. Oh, et T. G. Park, « siRNA Conjugate Delivery Systems », *Bioconjugate Chem.*, vol. 20, n° 1, p. 5-14, janv. 2009, doi: 10.1021/bc800278e.
- [244] S. Benizri, A. Gissot, A. Martin, B. Vialet, M. W. Grinstaff, et P. Barthélémy, « Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications », *Bioconjugate Chem.*, vol. 30, n° 2, p. 366-383, févr. 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00761.
- [245] L. M. Steirer, E. I. Park, R. R. Townsend, et J. U. Baenziger, « The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid alpha2,6-galactose », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 6, p. 3777-3783, févr. 2009, doi: 10.1074/jbc.M808689200.
- [246] D. Girelli, F. Busti, G. Marchi, N. Martinelli, et O. Olivieri, « Therapeutic oligonucleotides in cardiovascular and metabolic diseases: insights for the internist », *Intern Emerg Med*, vol. 13, n° 3, p. 313-318, avr. 2018, doi: 10.1007/s11739-018-1810-5.
- [247] J. O. McNamara *et al.*, « Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras », *Nat Biotechnol*, vol. 24, n° 8, p. 1005-1015, août 2006, doi: 10.1038/nbt1223.
- [248] C. L. Esposito *et al.*, « A combined microRNA-based targeted therapeutic approach to eradicate glioblastoma stem-like cells », *Journal of Controlled Release*, vol. 238, p. 43-57, sept. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.032.
- [249] C. L. Esposito, S. Nuzzo, S. Catuogno, S. Romano, F. de Nigris, et V. de Franciscis, « STAT3 Gene Silencing by Aptamer-siRNA Chimera as Selective Therapeutic for Glioblastoma », *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 10, p. 398-411, mars 2018, doi: 10.1016/j.omtn.2017.12.021.
- [250] E. Song *et al.*, « Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-

- surface receptors », *Nat Biotechnol*, vol. 23, n° 6, p. 709-717, juin 2005, doi: 10.1038/nbt1101.
- [251] N. Satake *et al.*, « Novel Targeted Therapy for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate », *Mol Med*, vol. 22, n° 1, p. 632-642, janv. 2016, doi: 10.2119/molmed.2015.00210.
- [252] S. P. Mathupala, « Delivery of small-interfering RNA (siRNA) to the brain », *Expert Opin Ther Pat*, vol. 19, n° 2, p. 137-140, févr. 2009, doi: 10.1517/13543770802680195.
- [253] Y. Dong, D. J. Siegwart, et D. G. Anderson, « Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 144, p. 133-147, avr. 2019, doi: 10.1016/j.addr.2019.05.004.
- [254] G. M. Bonora, « Polymer-Conjugated Bioactive Oligonucleotides », *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 17, n° 5, p. 375-389, sept. 2002, doi: 10.1177/0883911502017005555.
- [255] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, et K. Kataoka, « Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 6, p. 1624-1625, févr. 2005, doi: 10.1021/ja044941d.
- [256] S. H. Kim, J. H. Jeong, S. H. Lee, S. W. Kim, et T. G. Park, « Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer », *J Control Release*, vol. 129, n° 2, p. 107-116, juill. 2008, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.03.008.
- [257] F. Iversen, C. Yang, F. Dagnæs-Hansen, D. H. Schaffert, J. Kjems, et S. Gao, « Optimized siRNA-PEG conjugates for extended blood circulation and reduced urine excretion in mice », *Theranostics*, vol. 3, n° 3, p. 201-209, 2013, doi: 10.7150/thno.5743.
- [258] S. H. Lee, H. Mok, Y. Lee, et T. G. Park, « Self-assembled siRNA-PLGA conjugate micelles for gene silencing », *J Control Release*, vol. 152, n° 1, p. 152-158, mai 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.12.007.
- [259] D. B. Rozema *et al.*, « Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, n° 32, p. 12982-12987, août 2007, doi:

10.1073/pnas.0703778104.

[260] M. Meyer *et al.*, « Synthesis and biological evaluation of a bioresponsive and endosomolytic siRNA-polymer conjugate », *Mol. Pharm.*, vol. 6, n° 3, p. 752-762, juin 2009, doi: 10.1021/mp9000124.

[261] M. S. Draz *et al.*, « Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections », *Theranostics*, vol. 4, n° 9, p. 872-892, 2014, doi: 10.7150/thno.9404.

[262] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, et S. Nie, « In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots », *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, n° 8, p. 969-976, août 2004, doi: 10.1038/nbt994.

[263] A. M. Derfus, A. A. Chen, D.-H. Min, E. Ruoslahti, et S. N. Bhatia, « Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery », *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, n° 5, p. 1391-1396, oct. 2007, doi: 10.1021/bc060367e.

[264] A. Al-Ahmadi, *Quantum Dots: A Variety of New Applications*. BoD – Books on Demand, 2012.

[265] J. Conde *et al.*, « RNAi-based glyconanoparticles trigger apoptotic pathways for in vitro and in vivo enhanced cancer-cell killing », *Nanoscale*, vol. 7, n° 19, p. 9083-9091, mai 2015, doi: 10.1039/c4nr05742b.

[266] J. Lee, D. K. Chatterjee, M. H. Lee, et S. Krishnan, « Gold nanoparticles in breast cancer treatment: promise and potential pitfalls », *Cancer Lett.*, vol. 347, n° 1, p. 46-53, mai 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2014.02.006.

[267] M. Oishi, J. Nakaogami, T. Ishii, et Y. Nagasaki, « Smart PEGylated Gold Nanoparticles for the Cytoplasmic Delivery of siRNA to Induce Enhanced Gene Silencing », *Chem. Lett.*, vol. 35, n° 9, p. 1046-1047, sept. 2006, doi: 10.1246/cl.2006.1046.

[268] X. Huang *et al.*, « Light-activated RNA interference in human embryonic stem cells », *Biomaterials*, vol. 63, p. 70-79, sept. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.006.

[269] J. Conde *et al.*, « Dual targeted immunotherapy via in vivo delivery of biohybrid RNAi-peptide nanoparticles to tumour-associated macrophages and cancer cells », *Adv Funct Mater*, vol. 25, n° 27, p. 4183-4194, juill. 2015, doi: 10.1002/adfm.201501283.

- [270] A. K. Gupta et M. Gupta, « Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications », *Biomaterials*, vol. 26, n° 18, p. 3995-4021, juin 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
- [271] Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova, et A. Moore, « In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors », *Nat. Med.*, vol. 13, n° 3, p. 372-377, mars 2007, doi: 10.1038/nm1486.
- [272] Q. Lu *et al.*, « RNA Polymer Translocation with Single-Walled Carbon Nanotubes », *Nano Lett.*, vol. 4, n° 12, p. 2473-2477, déc. 2004, doi: 10.1021/nl048326j.
- [273] A. M. Carvalho, R. A. Cordeiro, et H. Faneca, « Silica-Based Gene Delivery Systems: From Design to Therapeutic Applications », *Pharmaceutics*, vol. 12, n° 7, p. 649, juill. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070649.
- [274] J. L. Paris et M. Vallet-Regí, « Mesoporous Silica Nanoparticles for Co-Delivery of Drugs and Nucleic Acids in Oncology: A Review », *Pharmaceutics*, vol. 12, n° 6, p. 526, juin 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12060526.
- [275] A. M. Chen *et al.*, « Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells », *Small*, vol. 5, n° 23, p. 2673-2677, déc. 2009, doi: 10.1002/smll.200900621.
- [276] A. Babu, R. Muralidharan, N. Amreddy, M. Mehta, A. Munshi, et R. Ramesh, « Nanoparticles for siRNA-Based Gene Silencing in Tumor Therapy », *IEEE Trans.on Nanobioscience*, vol. 15, n° 8, p. 849-863, déc. 2016, doi: 10.1109/TNB.2016.2621730.
- [277] Y.-K. Oh et T. G. Park, « siRNA delivery systems for cancer treatment », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, n° 10, p. 850-862, août 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.04.018.
- [278] J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, et J. L.-S. Au, « Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers », *AAPS J*, vol. 12, n° 4, p. 492-503, déc. 2010, doi: 10.1208/s12248-010-9210-4.
- [279] P. L. Felgner *et al.*, « Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 84, n° 21, p. 7413-7417, nov. 1987, doi: 10.1073/pnas.84.21.7413.
- [280] J. Felgner, M. Martin, Y. Tsai, et P. L. Felgner, « Cationic lipid-mediated transfection

in mammalian cells: “Lipofection” », *Journal of Tissue Culture Methods*, vol. 15, n° 2, p. 63-68, juin 1993, doi: 10.1007/BF01667363.

[281] A. Santel *et al.*, « A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium », *Gene Ther.*, vol. 13, n° 16, p. 1222-1234, août 2006, doi: 10.1038/sj.gt.3302777.

[282] M. Khoury *et al.*, « Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 6, p. 1867-1877, juin 2006, doi: 10.1002/art.21876.

[283] D. S. Friend, D. Papahadjopoulos, et R. J. Debs, « Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1278, n° 1, p. 41-50, janv. 1996, doi: 10.1016/0005-2736(95)00219-7.

[284] I. M. Hafez, N. Maurer, et P. R. Cullis, « On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids », *Gene Ther.*, vol. 8, n° 15, p. 1188-1196, août 2001, doi: 10.1038/sj.gt.3301506.

[285] V. V. Kumar, C. Pichon, M. Refregiers, B. Guerin, P. Midoux, et A. Chaudhuri, « Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH », *Gene Ther.*, vol. 10, n° 15, p. 1206-1215, août 2003, doi: 10.1038/sj.gt.3301979.

[286] E. A. Ho *et al.*, « Characterization of long-circulating cationic nanoparticle formulations consisting of a two-stage PEGylation step for the delivery of siRNA in a breast cancer tumor model », *J Pharm Sci*, vol. 102, n° 1, p. 227-236, janv. 2013, doi: 10.1002/jps.23351.

[287] D. Landesman-Milo, S. Ramishetti, et D. Peer, « Nanomedicine as an emerging platform for metastatic lung cancer therapy », *Cancer Metastasis Rev*, vol. 34, n° 2, p. 291-301, juin 2015, doi: 10.1007/s10555-015-9554-4.

[288] C. N. Landen *et al.*, « Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 15, p. 6910-6918, août 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0530.

[289] M. Aleku *et al.*, « Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 23, p. 9788-9798, déc.

2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2428.

[290] D. Strumberg *et al.*, « Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors », *Int J Clin Pharmacol Ther*, vol. 50, n° 1, p. 76-78, janv. 2012, doi: 10.5414/cpp50076.

[291] D. V. Morrissey *et al.*, « Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs », *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, n° 8, p. 1002-1007, août 2005, doi: 10.1038/nbt1122.

[292] T. S. Zimmermann *et al.*, « RNAi-mediated gene silencing in non-human primates », *Nature*, vol. 441, n° 7089, p. 111-114, mai 2006, doi: 10.1038/nature04688.

[293] A. D. Judge *et al.*, « Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 3, p. 661-673, mars 2009, doi: 10.1172/JCI37515.

[294] H. Shen, T. Sun, et M. Ferrari, « Nanovector delivery of siRNA for cancer therapy », *Cancer Gene Ther.*, vol. 19, n° 6, p. 367-373, juin 2012, doi: 10.1038/cgt.2012.22.

[295] A. Erazo-Oliveras, N. Muthukrishnan, R. Baker, T.-Y. Wang, et J.-P. Pellois, « Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges », *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 5, n° 11, p. 1177-1209, nov. 2012, doi: 10.3390/ph5111177.

[296] B. R. Meade et S. F. Dowdy, « Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, n° 2-3, p. 134-140, mars 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.03.004.

[297] C. Bechara et S. Sagan, « Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? », *FEBS Letters*, vol. 587, n° 12, p. 1693-1702, juin 2013, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.031.

[298] P. Järver et U. Langel, « The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation », *Drug Discov. Today*, vol. 9, n° 9, p. 395-402, mai 2004, doi: 10.1016/S1359-6446(04)03042-9.

[299] R. Abes *et al.*, « Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview », *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, n° 4, p. 775-779, août 2007, doi:

10.1042/BST0350775.

[300] A. T. Jones et E. J. Sayers, « Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs », *J Control Release*, vol. 161, n° 2, p. 582-591, juill. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.003.

[301] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, et J. B. Rothbard, « The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n° 24, p. 13003-13008, nov. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.24.13003.

[302] Y.-H. Wang, Y.-W. Hou, et H.-J. Lee, « An intracellular delivery method for siRNA by an arginine-rich peptide », *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, n° 4, p. 579-586, juin 2007, doi: 10.1016/j.jbbm.2007.01.010.

[303] A. H. van Asbeck *et al.*, « Molecular parameters of siRNA--cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery », *ACS Nano*, vol. 7, n° 5, p. 3797-3807, mai 2013, doi: 10.1021/nn305754c.

[304] L. Tönges, P. Lingor, R. Egle, G. P. H. Dietz, A. Fahr, et M. Bähr, « Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons », *RNA*, vol. 12, n° 7, p. 1431-1438, juill. 2006, doi: 10.1261/rna.2252206.

[305] W. J. Kim *et al.*, « Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma », *Mol. Ther.*, vol. 14, n° 3, p. 343-350, sept. 2006, doi: 10.1016/j.ymthe.2006.03.022.

[306] M. C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, et G. Divita, « A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. », *Nucleic Acids Res*, vol. 25, n° 14, p. 2730-2736, juill. 1997.

[307] S. Deshayes, K. Konate, G. Aldrian, L. Crombez, F. Heitz, et G. Divita, « Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: highway to cellular uptake », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1798, n° 12, p. 2304-2314, déc. 2010, doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.005.

[308] F. Simeoni, M. C. Morris, F. Heitz, et G. Divita, « Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian

- cells », *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, n° 11, p. 2717-2724, juin 2003, doi: 10.1093/nar/gkg385.
- [309] L. Crombez *et al.*, « Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth », *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, n° 14, p. 4559-4569, août 2009, doi: 10.1093/nar/gkp451.
- [310] L. Crombez *et al.*, « A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells », *Mol. Ther.*, vol. 17, n° 1, p. 95-103, janv. 2009, doi: 10.1038/mt.2008.215.
- [311] K. Konate, A. Rydstrom, G. Divita, et S. Deshayes, « Everything You Always Wanted to Know About CADY-Mediated siRNA Delivery* (* But Afraid to Ask) », *CPD*, vol. 19, n° 16, p. 2869-2877, mars 2013, doi: 10.2174/1381612811319160004.
- [312] Y. Zhang, M. Köllmer, J. S. Buhrman, M. Y. Tang, et R. A. Gemeinhart, « Arginine-rich, cell penetrating peptide-anti-microRNA complexes decrease glioblastoma migration potential », *Peptides*, vol. 58, p. 83-90, août 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2014.06.008.
- [313] M. Mäe *et al.*, « A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy », *J Control Release*, vol. 134, n° 3, p. 221-227, mars 2009, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.11.025.
- [314] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, et G. Divita, « A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells », *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, n° 12, p. 1173-1176, déc. 2001, doi: 10.1038/nbt1201-1173.
- [315] Y. H. Lau, P. de Andrade, Y. Wu, et D. R. Spring, « Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, n° 1, p. 91-102, 2015, doi: 10.1039/C4CS00246F.
- [316] Q. Chu *et al.*, « Towards understanding cell penetration by stapled peptides », *Med. Chem. Commun.*, vol. 6, n° 1, p. 111-119, janv. 2015, doi: 10.1039/C4MD00131A.
- [317] M. Moiola, M. G. Memeo, et P. Quadrelli, « Stapled Peptides—A Useful Improvement for Peptide-Based Drugs », *Molecules*, vol. 24, n° 20, p. 3654, oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203654.
- [318] H. Tang, L. Yin, K. H. Kim, et J. Cheng, « Helical poly(arginine) mimics with superior cell-penetrating and molecular transporting properties », *Chem. Sci.*, vol. 4, n° 10, p. 3839,

2013, doi: 10.1039/c3sc51328a.

[319] B. A. Smith, D. S. Daniels, A. E. Coplin, G. E. Jordan, L. M. McGregor, et A. Schepartz, « Minimally Cationic Cell-Permeable Miniature Proteins via α -Helical Arginine Display », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 10, p. 2948-2949, mars 2008, doi: 10.1021/ja800074v.

[320] C. E. Schafmeister, J. Po, et G. L. Verdine, « An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, n° 24, p. 5891-5892, juin 2000, doi: 10.1021/ja000563a.

[321] Y. S. Tan, D. P. Lane, et C. S. Verma, « Stapled peptide design: principles and roles of computation », *Drug Discovery Today*, vol. 21, n° 10, p. 1642-1653, oct. 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.012.

[322] S. Hyun *et al.*, « Construction of histidine-containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for *in vitro* and *in vivo* delivery of siRNAs », *Chem. Sci.*, vol. 9, n° 15, p. 3820-3827, 2018, doi: 10.1039/C8SC00074C.

[323] S. K. Sahoo et V. Labhasetwar, « Nanotech approaches to drug delivery and imaging », *Drug Discov. Today*, vol. 8, n° 24, p. 1112-1120, déc. 2003, doi: 10.1016/s1359-6446(03)02903-9.

[324] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, et P. S. Stayton, « Design and development of polymers for gene delivery », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 4, n° 7, p. 581-593, juill. 2005, doi: 10.1038/nrd1775.

[325] M. A. Islam *et al.*, « Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA », *J Control Release*, vol. 193, p. 74-89, nov. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.055.

[326] O. Boussif *et al.*, « A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. », *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 92, n° 16, p. 7297-7301, août 1995.

[327] B. Urban-Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko, et A. Aigner, « RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo », *Gene Ther.*, vol. 12, n° 5, p. 461-466, mars 2005, doi: 10.1038/sj.gt.3302425.

[328] M. Wagner, A. C. Rinkenauer, A. Schallon, et U. S. Schubert, « Opposites attract: influence of the molar mass of branched poly(ethylene imine) on biophysical characteristics of

siRNA-based polyplexese », *RSC Adv.*, vol. 3, n° 31, p. 12774-12785, juill. 2013, doi: 10.1039/C3RA42069H.

[329] M. Thomas, J. J. Lu, Q. Ge, C. Zhang, J. Chen, et A. M. Klibanov, « Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, n° 16, p. 5679-5684, avr. 2005, doi: 10.1073/pnas.0502067102.

[330] P.-H. Tan, L.-C. Yang, H.-C. Shih, K.-C. Lan, et J.-T. Cheng, « Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat », *Gene Ther.*, vol. 12, n° 1, p. 59-66, janv. 2005, doi: 10.1038/sj.gt.3302376.

[331] M. Grzelinski *et al.*, « RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts », *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, n° 7, p. 751-766, juill. 2006, doi: 10.1089/hum.2006.17.751.

[332] S. Di Gioia et M. Conese, « Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications », *Drug Des Devel Ther*, vol. 2, p. 163-188, févr. 2009.

[333] D. G. S *et al.*, « Role of biophysical parameters on ex vivo and in vivo gene transfer to the airway epithelium by polyethylenimine/albumin complexes. », *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 3, p. 859-866, févr. 2008, doi: 10.1021/bm701190p.

[334] L. Li, Z.-Y. He, X.-W. Wei, G.-P. Gao, et Y.-Q. Wei, « Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors », *Human Gene Therapy*, vol. 26, n° 7, p. 452-462, juill. 2015, doi: 10.1089/hum.2015.069.

[335] R. S. Shukla, B. Qin, et K. Cheng, « Peptides Used in the Delivery of Small Noncoding RNA », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 11, n° 10, p. 3395-3408, oct. 2014, doi: 10.1021/mp500426r.

[336] S. A *et al.*, « Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life. », *J Control Release*, vol. 122, n° 3, p. 209-216, mai 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.04.018.

[337] I. Fajac *et al.*, « Histidylated polylysine as a synthetic vector for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway surface and airway gland serous cells », *J Gene Med*, vol. 2, n° 5, p. 368-378, oct. 2000, doi: 10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<368::AID-

JGM118>3.0.CO;2-F.

[338] V. Dzmitruk, E. Apartsin, A. Ihnatsyey-Kachan, V. Abashkin, D. Shcharbin, et M. Bryszewska, « Dendrimers Show Promise for siRNA and microRNA Therapeutics », *Pharmaceutics*, vol. 10, n° 3, p. 126, août 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030126.

[339] E. Bielski *et al.*, « TPP-dendrimer nanocarriers for siRNA delivery to the pulmonary epithelium and their dry powder and metered-dose inhaler formulations », *Int J Pharm*, vol. 527, n° 1-2, p. 171-183, juill. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.046.

[340] Y. Bae *et al.*, « Dipeptide-functionalized polyamidoamine dendrimer-mediated apoptin gene delivery facilitates apoptosis of human primary glioma cells », *Int J Pharm*, vol. 515, n° 1-2, p. 186-200, déc. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.083.

[341] X. Liu *et al.*, « Targeted delivery of Dicer-substrate siRNAs using a dual targeting peptide decorated dendrimer delivery system », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 10, n° 8, p. 1627-1636, nov. 2014, doi: 10.1016/j.nano.2014.05.008.

[342] S. E. Pérez et A. M. Carlucci, « Lipid-based siRNA Nanodelivery Systems: A Learning Process for Improving Transfer from Concepts to Clinical Applications », *CCP*, vol. 13, n° 3, p. 142-163, déc. 2018, doi: 10.2174/1574884713666180829143054.

[343] S. Hu-Lieskovan, J. D. Heidel, D. W. Bartlett, M. E. Davis, et T. J. Triche, « Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 19, p. 8984-8992, oct. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0565.

[344] G. K. Alderton, « A big step for targeting RNAs », *Nat Rev Cancer*, vol. 10, n° 5, p. 313-313, mai 2010, doi: 10.1038/nrc2848.

[345] M. Garcia-Fuentes et M. J. Alonso, « Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? », *J Control Release*, vol. 161, n° 2, p. 496-504, juill. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.017.

[346] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, et Z. Zhang, « Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, n° 15, p. 1650-1662, déc. 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.09.001.

[347] Y. Yang *et al.*, « Chitosan/VEGF-siRNA nanoparticle for gene silencing », *J Control*

- Release*, vol. 152 Suppl 1, p. e160-161, nov. 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.062.
- [348] B. Lu, X.-D. Xu, X.-Z. Zhang, S.-X. Cheng, et R.-X. Zhuo, « Low Molecular Weight Polyethylenimine Grafted N-Maleated Chitosan for Gene Delivery: Properties and In Vitro Transfection Studies », *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 10, p. 2594-2600, oct. 2008, doi: 10.1021/bm8004676.
- [349] J. H. Lee *et al.*, « Rolling circle transcription-based polymeric siRNA nanoparticles for tumor-targeted delivery », *J Control Release*, vol. 263, p. 29-38, oct. 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.390.
- [350] J. Kim, A. Narayana, S. Patel, et G. Sahay, « Advances in intracellular delivery through supramolecular self-assembly of oligonucleotides and peptides », *Theranostics*, vol. 9, n° 11, p. 3191-3212, mai 2019, doi: 10.7150/thno.33921.
- [351] D. Paolantoni, S. Cantel, P. Dumy, et S. Ulrich, « A Dynamic Combinatorial Approach for Identifying Side Groups that Stabilize DNA-Templated Supramolecular Self-Assemblies », *Int J Mol Sci*, vol. 16, n° 2, p. 3609-3625, févr. 2015, doi: 10.3390/ijms16023609.
- [352] D. Paolantoni *et al.*, « Probing the importance of π -stacking interactions in DNA-templated self-assembly of bisfunctionalized guanidinium compounds », *Chem. Commun.*, vol. 50, n° 91, p. 14257-14260, oct. 2014, doi: 10.1039/C4CC05706F.
- [353] S. P. Patil *et al.*, « Supramolecular Self-Assembly of Histidine-Capped-Dialkoxy-Anthracene: A Visible-Light-Triggered Platform for Facile siRNA Delivery », *Chem. Eur. J.*, vol. 22, n° 39, p. 13789-13793, sept. 2016, doi: 10.1002/chem.201601442.
- [354] E. Busseron, Y. Ruff, E. Moulin, et N. Giuseppone, « Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials », *Nanoscale*, vol. 5, n° 16, p. 7098, 2013, doi: 10.1039/c3nr02176a.
- [355] P. Posocco, S. Pricl, S. Jones, A. Barnard, et D. K. Smith, « Less is more – multiscale modelling of self-assembling multivalency and its impact on DNA binding and gene delivery », *Chem. Sci.*, vol. 1, n° 3, p. 393, 2010, doi: 10.1039/c0sc00291g.
- [356] X. Liu *et al.*, « Adaptive Amphiphilic Dendrimer-Based Nanoassemblies as Robust and Versatile siRNA Delivery Systems », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, n° 44, p. 11822-11827, oct. 2014, doi: 10.1002/anie.201406764.

- [357] E. Bartolami, C. Bouillon, P. Dumy, et S. Ulrich, « Bioactive clusters promoting cell penetration and nucleic acid complexation for drug and gene delivery applications: from designed to self-assembled and responsive systems », *Chem. Commun.*, vol. 52, n° 23, p. 4257-4273, 2016, doi: 10.1039/C5CC09715K.
- [358] S. Ulrich, « Growing Prospects of Dynamic Covalent Chemistry in Delivery Applications », *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, n° 2, p. 510-519, févr. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.8b00591.
- [359] S. Son, R. Namgung, J. Kim, K. Singha, et W. J. Kim, « Bioreducible Polymers for Gene Silencing and Delivery », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 7, p. 1100-1112, juill. 2012, doi: 10.1021/ar200248u.
- [360] S. Binauld et M. H. Stenzel, « Acid-degradable polymers for drug delivery: a decade of innovation », *Chem. Commun.*, vol. 49, n° 21, p. 2082-2102, févr. 2013, doi: 10.1039/C2CC36589H.
- [361] P. Morelli, E. Bartolami, N. Sakai, et S. Matile, « Glycosylated Cell-Penetrating Poly(disulfide)s: Multifunctional Cellular Uptake at High Solubility », *Helvetica Chimica Acta*, vol. 101, n° 1, p. e1700266, 2018, doi: 10.1002/hlca.201700266.
- [362] A. Kohata, P. K. Hashim, K. Okuro, et T. Aida, « Transferrin-Appended Nanocaplet for Transcellular siRNA Delivery into Deep Tissues », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 141, n° 7, p. 2862-2866, 20 2019, doi: 10.1021/jacs.8b12501.
- [363] C. Alvarez-Lorenzo et A. Concheiro, « Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic », *Chem. Commun.*, vol. 50, n° 58, p. 7743-7765, juin 2014, doi: 10.1039/C4CC01429D.
- [364] A. Aissaoui *et al.*, « Novel Cationic Lipids Incorporating an Acid-Sensitive Acylhydrazone Linker: Synthesis and Transfection Properties », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, n° 21, p. 5210-5223, oct. 2004, doi: 10.1021/jm0408159.
- [365] X. Mp *et al.*, « pH-responsive Multi-PEGylated dual cationic nanoparticles enable charge modulations for safe gene delivery. », *ChemMedChem*, vol. 2, n° 9, p. 1321-1327, sept. 2007, doi: 10.1002/cmdc.200700093.
- [366] C. Bouillon *et al.*, « Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone

Dynamic Covalent Polymers Promote DNA Complexation through Multivalent Interactions », *Chemistry - A European Journal*, vol. 20, n° 45, p. 14705-14714, nov. 2014, doi: 10.1002/chem.201403695.

[367] M. Alavi et M. Hamidi, « Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles », *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, vol. 34, n° 1, févr. 2019, doi: 10.1515/dmpt-2018-0032.

[368] F. Yuan *et al.*, « Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size », *Cancer Research*, vol. 55, n° 17, p. 3752-3756, 1995.

[369] H. Maeda, « The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting », *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 41, p. 189-207, 2001, doi: 10.1016/s0065-2571(00)00013-3.

[370] Y. Matsumura et H. Maeda, « A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs », *Cancer Res.*, vol. 46, n° 12 Pt 1, p. 6387-6392, déc. 1986.

[371] X.-Y. Yang, Y.-X. Li, M. Li, L. Zhang, L.-X. Feng, et N. Zhang, « Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer », *Cancer Lett.*, vol. 334, n° 2, p. 338-345, juill. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2012.07.002.

[372] S. M. Moghimi et D. Simberg, « Nanoparticle transport pathways into tumors », *J Nanopart Res*, vol. 20, n° 6, p. 169, juin 2018, doi: 10.1007/s11051-018-4273-8.

[373] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, et T. Sen, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, n° 1-2, p. 24-46, janv. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006.

[374] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, et O. C. Farokhzad, « Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology », *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 66, p. 2-25, févr. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.

[375] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, et G. Storm, « Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress », *Journal of Controlled Release*, vol. 161, n° 2, p. 175-187, juill. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.063.

- [376] F. Marcucci et A. Corti, « How to improve exposure of tumor cells to drugs — Promoter drugs increase tumor uptake and penetration of effector drugs », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, n° 1, p. 53-68, janv. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2011.09.007.
- [377] E. Gregory Gregoriadis et D. Neerunjun, « Homing of liposomes to target cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 65, n° 2, p. 537-544, juill. 1975, doi: 10.1016/S0006-291X(75)80180-X.
- [378] M. R. Mauk, R. C. Gamble, et J. D. Baldeschwieler, « Targeting of lipid vesicles: specificity of carbohydrate receptor analogues for leukocytes in mice. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 77, n° 8, p. 4430-4434, août 1980.
- [379] S. Chu, C. Tang, et C. Yin, « Effects of mannose density on in vitro and in vivo cellular uptake and RNAi efficiency of polymeric nanoparticles », *Biomaterials*, vol. 52, p. 229-239, juin 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.044.
- [380] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, et A. Lanzavecchia, « Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 182, n° 2, p. 389-400, août 1995, doi: 10.1084/jem.182.2.389.
- [381] M. Gary-Bobo *et al.*, « Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, n° 48, p. 11425-11429, nov. 2011, doi: 10.1002/anie.201104765.
- [382] B. Bahrami *et al.*, « Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy », *Immunology Letters*, vol. 190, p. 64-83, oct. 2017, doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.015.
- [383] J. Hu, P. Wei, P. H. Seeberger, et J. Yin, « Mannose-Functionalized Nanoscaffolds for Targeted Delivery in Biomedical Applications », *Chem. Asian J.*, vol. 13, n° 22, p. 3448-3459, nov. 2018, doi: 10.1002/asia.201801088.
- [384] L. Engelholm H., « The collagen receptor uPARAP/Endo180 », *Front Biosci*, vol. Volume, n° 14, p. 2103, 2009, doi: 10.2741/3365.
- [385] D. van Dinther, D. A. Stolk, R. van de Ven, Y. van Kooyk, T. D. de Gruij, et J. M. M. den Haan, « Targeting C-type lectin receptors: a high-carbohydrate diet for dendritic cells to

improve cancer vaccines », *J Leukoc Biol*, vol. 102, n° 4, p. 1017-1034, oct. 2017, doi: 10.1189/jlb.5MR0217-059RR.

[386] N. Kim *et al.*, « Synthesis and characterization of mannosylated pegylated polyethylenimine as a carrier for siRNA », *Int J Pharm*, vol. 427, n° 1, p. 123-133, mai 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.014.

[387] T. Ganbold et H. Baigude, « Design of Mannose-Functionalized Curdlan Nanoparticles for Macrophage-Targeted siRNA Delivery », *ACS Applied Materials & Interfaces*, avr. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b02073.

[388] L. Li, R. Zhang, W. Gu, et Z. P. Xu, « Mannose-conjugated layered double hydroxide nanocomposite for targeted siRNA delivery to enhance cancer therapy », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 14, n° 7, p. 2355-2364, oct. 2018, doi: 10.1016/j.nano.2017.06.006.

[389] I. Serrano-Sevilla, Á. Artiga, S. G. Mitchell, L. De Matteis, et J. M. de la Fuente, « Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives », *Molecules*, vol. 24, n° 14, juill. 2019, doi: 10.3390/molecules24142570.

[390] H. Lee, H. Mok, S. Lee, Y.-K. Oh, et T. G. Park, « Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels », *Journal of Controlled Release*, vol. 119, n° 2, p. 245-252, juin 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.02.011.

[391] L. T. Senbanjo et M. A. Chellaiah, « CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells », *Front Cell Dev Biol*, vol. 5, mars 2017, doi: 10.3389/fcell.2017.00018.

[392] R. Edelman, Y. G. Assaraf, I. Levitzky, T. Shahar, et Y. D. Livney, « Hyaluronic acid-serum albumin conjugate-based nanoparticles for targeted cancer therapy », *Oncotarget*, vol. 8, n° 15, p. 24337-24353, févr. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15363.

[393] T. Yin *et al.*, « Smart nanoparticles with a detachable outer shell for maximized synergistic antitumor efficacy of therapeutics with varying physicochemical properties », *Journal of Controlled Release*, vol. 243, p. 54-68, déc. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.036.

- [394] S. A. Shahin *et al.*, « Hyaluronic acid conjugated nanoparticle delivery of siRNA against TWIST reduces tumor burden and enhances sensitivity to cisplatin in ovarian cancer », *Nanomedicine*, vol. 14, n° 4, p. 1381-1394, juin 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.04.008.
- [395] K. Muhammad, J. Zhao, I. Ullah, J. Guo, X. Ren, et Y. Feng, « Ligand targeting and peptide functionalized polymers as non-viral carriers for gene therapy », *Biomater. Sci.*, vol. 8, n° 1, p. 64-83, 2020, doi: 10.1039/C9BM01112A.
- [396] L. Sancey *et al.*, « In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha\beta 3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD », *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 34, n° 12, p. 2037-2047, déc. 2007, doi: 10.1007/s00259-007-0497-z.
- [397] A. David, « Peptide ligand-modified nanomedicines for targeting cells at the tumor microenvironment », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 119, p. 120-142, 15 2017, doi: 10.1016/j.addr.2017.05.006.
- [398] N. Zhao, Y. Qin, H. Liu, et Z. Cheng, « Tumor-Targeting Peptides: Ligands for Molecular Imaging and Therapy », *ACAMC*, vol. 18, n° 1, p. 74-86, mars 2018, doi: 10.2174/1871520617666170419143459.
- [399] M. Oba *et al.*, « Polyplex Micelles with Cyclic RGD Peptide Ligands and Disulfide Cross-Links Directing to the Enhanced Transfection via Controlled Intracellular Trafficking », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 5, n° 6, p. 1080-1092, déc. 2008, doi: 10.1021/mp800070s.
- [400] X. Liu *et al.*, « Tumor-targeted in vivo gene silencing via systemic delivery of cRGD-conjugated siRNA », *Nucleic Acids Res*, vol. 42, n° 18, p. 11805-11817, oct. 2014, doi: 10.1093/nar/gku831.
- [401] F. A. van den Brûle *et al.*, « Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas », *Eur. J. Cancer*, vol. 30A, n° 8, p. 1096-1099, 1994, doi: 10.1016/0959-8049(94)90464-2.
- [402] A. Pesapane, P. Ragno, C. Selleri, et N. Montuori, « Recent Advances in the Function of the 67 kDa Laminin Receptor and its Targeting for Personalized Therapy in Cancer », *CPD*, vol. 23, n° 32, p. 4745-4757, déc. 2017, doi: 10.2174/1381612823666170710125332.
- [403] K. Jovanovic *et al.*, « Novel patented therapeutic approaches targeting the 37/67 kDa laminin receptor for treatment of cancer and Alzheimer's disease », *Expert Opinion on*

Therapeutic Patents, vol. 25, n° 5, p. 567-582, mai 2015, doi: 10.1517/13543776.2015.1014802.

[404] B. D. C. Dias, « Interactions between PrPc and other ligands with the 37-kDa/67-kDa laminin receptor », *Front Biosci*, vol. 15, n° 1, p. 1150, 2010, doi: 10.2741/3667.

[405] K. V. Jamieson, S. R. Hubbard, et D. Meruelo, « STRUCTURE-GUIDED IDENTIFICATION OF A LAMININ BINDING SITE ON THE LAMININ RECEPTOR PRECURSOR », *J Mol Biol*, vol. 405, n° 1, p. 24-32, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.028.

[406] J. Graf *et al.*, « A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor », *Biochemistry*, vol. 26, n° 22, p. 6896-6900, nov. 1987, doi: 10.1021/bi00396a004.

[407] K. Yamamura, M. C. Kibbey, S. H. Jun, et H. K. Kleinman, « Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 4, n° 4, p. 259-265, août 1993.

[408] Z. Meng *et al.*, « Enhanced gene transfection efficiency by use of peptide vectors containing laminin receptor-targeting sequence YIGSR », *Nanoscale*, vol. 10, n° 3, p. 1215-1227, 2018, doi: 10.1039/C7NR05843H.

[409] W. Xia et P. S. Low, « Folate-Targeted Therapies for Cancer », *J. Med. Chem.*, vol. 53, n° 19, p. 6811-6824, oct. 2010, doi: 10.1021/jm100509v.

[410] M. Li *et al.*, « Folate-targeting redox hyperbranched poly(amido amine)s delivering MMP-9 siRNA for cancer therapy », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 3, p. 547-556, 2016, doi: 10.1039/C5TB01964H.

[411] Y. Hattori, S. Shimizu, K. Ozaki, et H. Onishi, « Effect of Cationic Lipid Type in Folate-PEG-Modified Cationic Liposomes on Folate Receptor-Mediated siRNA Transfection in Tumor Cells », *Pharmaceutics*, vol. 11, n° 4, Art. n° 4, avr. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11040181.

[412] M.-P. Gosselin, C. Gonçalves, V. Malard, P. Baril, C. Pichon, et P. Midoux, « 593. Targeted Histidinylated Lipopolyplexes for siRNA Delivery in 4T1 Mammary Carcinoma Cells », *Molecular Therapy*, vol. 23, p. S236, mai 2015, doi: 10.1016/S1525-0016(16)34202-

2.

[413] N. Cao, D. Cheng, S. Zou, H. Ai, J. Gao, et X. Shuai, « The synergistic effect of hierarchical assemblies of siRNA and chemotherapeutic drugs co-delivered into hepatic cancer cells », *Biomaterials*, vol. 32, n° 8, p. 2222-2232, mars 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.061.

[414] C. Tros de Ilarduya et N. Düzgüneş, « Delivery of therapeutic nucleic acids via transferrin and transferrin receptors: lipoplexes and other carriers », *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 10, n° 11, p. 1583-1591, nov. 2013, doi: 10.1517/17425247.2013.837447.

[415] M. Hagimori, Y. Fuchigami, et S. Kawakami, « Peptide-Based Cancer-Targeted DDS and Molecular Imaging », *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 65, n° 7, p. 618-624, 2017, doi: 10.1248/cpb.c17-00098.

[416] I. Vhora, S. Patil, P. Bhatt, et A. Misra, « Protein– and Peptide–Drug Conjugates », in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, vol. 98, Elsevier, 2015, p. 1-55.

[417] L. S. Mendonça, F. Firmino, J. N. Moreira, M. C. Pedroso de Lima, et S. Simões, « Transferrin Receptor-Targeted Liposomes Encapsulating anti- *BCR-ABL* siRNA or asODN for Chronic Myeloid Leukemia Treatment », *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, n° 1, p. 157-168, janv. 2010, doi: 10.1021/bc9004365.

[418] Y. Dong *et al.*, « A Dual Targeting Dendrimer-Mediated siRNA Delivery System for Effective Gene Silencing in Cancer Therapy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, n° 47, p. 16264-16274, nov. 2018, doi: 10.1021/jacs.8b10021.

[419] M. Oishi *et al.*, « Enhanced growth inhibition of hepatic multicellular tumor spheroids by lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate formulated in PEGylated polyplexes », *ChemMedChem*, vol. 2, n° 9, p. 1290-1297, sept. 2007, doi: 10.1002/cmdc.200700076.

[420] K.-W. Huang *et al.*, « Galactose Derivative-Modified Nanoparticles for Efficient siRNA Delivery to Hepatocellular Carcinoma », *Biomacromolecules*, vol. 19, n° 6, p. 2330-2339, juin 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.8b00358.

[421] J. Gao *et al.*, « EGFR-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA delivery in hepatocellular carcinoma », *Biomaterials*, vol. 33, n° 1, p. 270-282, janv. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.035.

- [422] Y. Nishimura, H. Mieda, J. Ishii, C. Ogino, T. Fujiwara, et A. Kondo, « Targeting cancer cell-specific RNA interference by siRNA delivery using a complex carrier of affibody-displaying bio-nanocapsules and liposomes », *J Nanobiotechnology*, vol. 11, p. 19, juin 2013, doi: 10.1186/1477-3155-11-19.
- [423] N. Laroui, N. Cubedo, M. Rossel, et N. Bettache, « Improvement of Cell Penetrating Peptide for Efficient siRNA Targeting of Tumor Xenografts in Zebrafish Embryos », *Adv. Therap.*, vol. 3, n° 2, p. 1900204, févr. 2020, doi: 10.1002/adtp.201900204.
- [424] S. Deshayes *et al.*, « Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Primary Cell Lines », *Small*, vol. 8, n° 14, p. 2184-2188, juill. 2012, doi: 10.1002/smll.201102413.
- [425] M. Nomizu, K. Yamamura, H. K. Kleinman, et Y. Yamada, « Multimeric forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) peptide enhance the inhibition of tumor growth and metastasis », *Cancer Res.*, vol. 53, n° 15, p. 3459-3461, août 1993.
- [426] M. Simon *et al.*, « Hydrocarbon-Stapled Peptide Based-Nanoparticles for siRNA Delivery », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 12, Art. n° 12, déc. 2020, doi: 10.3390/nano10122334.
- [427] L. L. Vezenkov *et al.*, « Ribbon-like Foldamers for Cellular Uptake and Drug Delivery », *ChemBioChem*, vol. 18, n° 21, p. 2110-2114, nov. 2017, doi: 10.1002/cbic.201700455.
- [428] H. Yamashita *et al.*, « Development of helix-stabilized cell-penetrating peptides containing cationic α,α -disubstituted amino acids as helical promoters », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 25, n° 6, p. 1846-1851, mars 2017, doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.044.
- [429] H. L. Åmand, B. Nordén, et K. Fant, « Functionalization with C-terminal cysteine enhances transfection efficiency of cell-penetrating peptides through dimer formation », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 418, n° 3, p. 469-474, févr. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.041.
- [430] G. L. Verdine et G. J. Hilinski, « All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins », *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 9, n° 1, p. e41-e47, mars 2012, doi: 10.1016/j.ddtec.2012.01.004.
- [431] N. Laroui *et al.*, « Cell-selective siRNA delivery using glycosylated dynamic covalent

polymers self-assembled in situ by RNA-templating », *Angew. Chem. Int. Ed.*, p. anie.202014066, déc. 2020, doi: 10.1002/anie.202014066.

[432] C. Bouillon *et al.*, « Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone Dynamic Covalent Polymers Promote DNA Complexation through Multivalent Interactions », *Chem. Eur. J.*, vol. 20, n° 45, p. 14705-14714, nov. 2014, doi: 10.1002/chem.201403695.

[433] P. K. Hashim, K. Okuro, S. Sasaki, Y. Hoashi, et T. Aida, « Reductively Cleavable Nanocaplets for siRNA Delivery by Template-Assisted Oxidative Polymerization », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, n° 50, p. 15608-15611, déc. 2015, doi: 10.1021/jacs.5b08948.

[434] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, et P. Dumy, « Oxime ligation: a chemoselective click-type reaction for accessing multifunctional biomolecular constructs », *Chemistry*, vol. 20, n° 1, p. 34-41, janv. 2014, doi: 10.1002/chem.201302426.

[435] O. Hocine *et al.*, « Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 402, n° 1-2, p. 221-230, déc. 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.004.

[436] N. Laroui *et al.*, « Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 569, p. 118585, oct. 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118585.

[437] C. Mauriello Jimenez *et al.*, « Porous Porphyrin-Based Organosilica Nanoparticles for NIR Two-Photon Photodynamic Therapy and Gene Delivery in Zebrafish », *Advanced Functional Materials*, vol. 28, n° 21, p. 1800235, mai 2018, doi: 10.1002/adfm.201800235.

[438] D. Wang *et al.*, « Acid-Activatable Versatile Micelleplexes for PD-L1 Blockade-Enhanced Cancer Photodynamic Immunotherapy », *Nano Lett.*, vol. 16, n° 9, p. 5503-5513, sept. 2016, doi: 10.1021/acs.nanolett.6b01994.

[439] L. Lichon *et al.*, « Polythiophenes with Cationic Phosphonium Groups as Vectors for Imaging, siRNA Delivery, and Photodynamic Therapy », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 8, p. 1432, juill. 2020, doi: 10.3390/nano10081432.

[440] M. A. Rajora, J. W. H. Lou, et G. Zheng, « Advancing porphyrin's biomedical utility via supramolecular chemistry », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, n° 21, p. 6433-6469, 2017, doi: 10.1039/C7CS00525C.

- [441] G. Pratviel, « Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions », *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 308, p. 460-477, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ccr.2015.07.003.
- [442] B. N. Briggs, A. J. Gaier, P. E. Fanwick, D. K. Dogutan, et D. R. McMillin, « Cationic Copper(II) Porphyrins Intercalate into Domains of Double-Stranded RNA », *Biochemistry*, vol. 51, n° 38, p. 7496-7505, sept. 2012, doi: 10.1021/bi300828z.
- [443] T.-C. Chou, « Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies », *Pharmacological Reviews*, vol. 58, n° 3, p. 621-681, sept. 2006, doi: 10.1124/pr.58.3.10.
- [444] L. Vania *et al.*, « Patented therapeutic approaches targeting LRP/LR for cancer treatment », *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol. 29, n° 12, p. 987-1009, déc. 2019, doi: 10.1080/13543776.2019.1693543.
- [445] X. Montet, M. Funovics, K. Montet-Abou, R. Weissleder, et L. Josephson, « Multivalent Effects of RGD Peptides Obtained by Nanoparticle Display », *J. Med. Chem.*, vol. 49, n° 20, p. 6087-6093, oct. 2006, doi: 10.1021/jm060515m.
- [446] L. D. Walensky, « Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix », *Science*, vol. 305, n° 5689, p. 1466-1470, sept. 2004, doi: 10.1126/science.1099191.
- [447] D. Su, M. Coste, A. Diaconu, M. D. Barboiu, et S. Ulrich, « Cationic Dynamic Covalent Polymers for Gene Transfection », *J. Mater. Chem. B*, p. 10.1039.D0TB01836H, 2020, doi: 10.1039/D0TB01836H.
- [448] P. Evenou *et al.*, « Bridging β -Cyclodextrin Prevents Self-Inclusion, Promotes Supramolecular Polymerization, and Promotes Cooperative Interaction with Nucleic Acids », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 57, n° 26, p. 7753-7758, juin 2018, doi: 10.1002/anie.201802550.
- [449] X. Wang *et al.*, « Near-infrared light triggered photodynamic therapy in combination with gene therapy using upconversion nanoparticles for effective cancer cell killing », *Nanoscale*, vol. 6, n° 15, p. 9198, juin 2014, doi: 10.1039/C4NR02495H.

Annexes

Annexe 1 : Delorme, V.; Lichon, L.; Mahindad, H.; Hunger, S.; Laroui, N.; Daurat, M.; Godefroy, A.; Coudane, J.; Gary-Bobo, M.; Van Den Berghe, H. Reverse Poly(ϵ -Caprolactone)-g-Dextran Graft Copolymers. Nano-Carriers for Intracellular Uptake of Anticancer Drugs. *Carbohydr. Polym.* 2020, 232, 115764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115764>.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

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

Reverse poly(ϵ -caprolactone)-g-dextran graft copolymers. Nano-carriers for intracellular uptake of anticancer drugs



Victor Delorme^{a,1}, Laure Lichon^{a,1}, Hana Mahindad^a, Sylvie Hunger^a, Nabila Laroui^a, Morgane Daurat^{a,b}, Anastasia Godefroy^{a,b}, Jean Coudane^a, Magali Gary-Bobo^a, H el ene Van Den Berghe^{a,*}

^a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Faculté de Pharmacie, B timent I, 15 Avenue Charles Flahault, BP14491, 34093, Montpellier Cedex 5, France

^b NanoMedSyn, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, Cedex 5, 34093, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Dextran
Poly(ϵ -caprolactone)
Graft copolymers
Biodegradable micelles
Drug delivery
Anti-cancer therapy

ABSTRACT

A new fully biodegradable “reverse” oligosaccharide-based amphiphilic graft copolymer structure with a hydrophobic backbone and hydrophilic side chains, poly(ϵ -caprolactone)-g-dextran (PCL-g-Dex) was synthesized. For this purpose, “clickable” propargylated PCL (PCL-yne) and azido-dextran (Dex-N3) were prepared to further synthesize PCL-g-Dex copolymer by a Huisgen’s cycloaddition. This “reverse” copolymer architecture self-assembled in biodegradable nano-carriers, in the shape of dynamic polymeric micelles, and were loaded with doxorubicin (Dox) anti-cancer drug. Dox-loaded micelles showed different drug releases depending on the pH. Cytotoxicity tests showed that Dox-loaded micelles can selectively kill colon cancer cells (HCT-116) while they have no cytotoxic effect towards healthy cells (CCD-45SK). Fluorescent micelles based on FITC-labelled PCL-g-Dex copolymer were used for fluorescence imaging and flow cytometry assays. These experiments proved the effective and specific internalization of micelles by cancer cells, whereas healthy cells showed a very poor uptake. These results show that PCL-g-Dex micelles may be a promising Dox nano-carrier in cancer chemotherapy.

1. Introduction

One of the most important classes of materials investigated for nanotechnology in cancer therapy are polymeric materials (Cheng & Pun, 2015). More particularly, nanostructured compounds, such as nanoparticles, nano-vesicles or micelles, are extensively investigated as drug carriers to tumors to improve existing chemotherapy treatments. Thanks to their nano-size, they can offer a better delivery of anti-cancer agents (Vauthier & Labarre, 2008). However, they are rapidly cleared by phagocytes. To prolong their circulating time and/or to lower the complement system activation in the bloodstream, their surface can be sheltered with a hydrophilic polymeric shell to avoid non-specific protein adsorption and subsequent phagocytosis (Jeon, Lee, Andrade, & De Gennes, 1991; Labarre, 2012). As examples, polymeric micelles are stable dynamic core-shell nanostructures suitable for intravenous

injections and for internalization in cancer cells by enhanced permeability and retention (EPR) effect. They can incorporate hydrophobic drugs in their core which significantly enhance the drug solubility in body fluids. In this way, sensitive drugs are protected from degradation and organism is also protected from the toxic side-effects of drugs. Several amphiphilic polymeric micelles are currently in late phase clinical trials for delivery of chemotherapeutics like paclitaxel, Dox or cisplatin (Cabral & Kataoka, 2014; Cho, Lai, Tomoda, & Kwon, 2015). Amphiphilic copolymers with a well-defined architecture are materials of choice to form copolymeric micelles (Blanco, Kessinger, Sumer, & Gao, 2009; Mahmud, Xiong, Aliabadi, & Lavasanifar, 2007; Nishiyama & Kataoka, 2006; Wei et al., 2009). In this field, synthetic polymers, like poly(ϵ -caprolactone (PCL) or poly(lactic acid) (PLA) received considerable attention because they are biocompatible, bioresorbable and FDA-approved (Cho et al., 2015; Coumes, Darcos, Domurado, Li, &

* Corresponding author.

E-mail addresses: victor.delorme@etu.umontpellier.fr (V. Delorme), laure.lichon@umontpellier.fr (L. Lichon), hana_mhd@live.fr (H. Mahindad), sylvie.hunger@umontpellier.fr (S. Hunger), nabila.laroui@etu.umontpellier.fr (N. Laroui), morgane.daurat@etu.umontpellier.fr (M. Daurat), anastasia.godefroy@etu.umontpellier.fr (A. Godefroy), jean.coudane@umontpellier.fr (J. Coudane), magali.gary-bobo@inserm.fr (M. Gary-Bobo), helene.van-den-berghes@umontpellier.fr (H. Van Den Berghe).

¹ These two authors contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115764>

Received 4 October 2019; Received in revised form 3 December 2019; Accepted 17 December 2019

Available online 24 December 2019

0144-8617/  2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Coudane, 2013; Freichels, Alaimo, Auzély-Velty, & Jérôme, 2012; Freichels, Pourcelle, Auzély-Velty, Marchand-Brynaert, & Jérôme, 2012; Guerry et al., 2013; Samad et al., 2016; Zhang, Tong, Wu, & Wang, 2016). Poly(ethylene glycol) (PEG) has also been largely used to form the hydrophilic outer shell (Coumes et al., 2013; Freichels, Alaimo et al., 2012, 2012b; Zhang, Tong et al., 2016) since it is known to be protein repellent, biocompatible and non-immunogenic (Jeon et al., 1991; Owens & Peppas, 2006; Samad et al., 2016). However, the lack of chemical functions along its chains makes PEG unsuitable for the linkage of molecules such as tumor cell-recognition ligands or fluorescent labels. Polysaccharides are another class of hydrophilic polymers reported to form the hydrophilic shell of copolymeric micelles (Chen, Cai, Zhang, Jiang, & Wang, 2011; Guerry, Cottaz, Fleury, Bernard, & Halila, 2014). For example, Dex can act as a protein repellent hydrophilic polymer (Labarre, 2012). It is biocompatible, biodegradable, and contrary to PEG, it bears numerous hydroxyl groups along its backbone that make possible the coupling of targeting molecules (antibodies, peptides, nucleic acids, carbohydrates) (2009, Wu et al., 2005) or fluorescent probes.

Dex-b-PCL diblock copolymers loaded with Dox for anti-cancer therapy were also prepared (Lee, Li, & Wang, 2015; Li, Wang, Wang, Wang, & Jiang, 2013; Nikouei, Ghasemi, & Lavasanifar, 2016; Sun et al., 2010; Wu et al., 2018; Zhang et al., 2015; Zhang, Dou, & Jin, 2010). However, it was demonstrated that copolymeric grafted structures are more efficient than their counterpart diblock structures (with a similar hydrophilic-lipophilic balance (HLB)) to stabilize nano-objects as well as for protein repellency (Labarre, 2012; Rieger et al., 2006). Moreover, HLB can be modulated by varying the grafting ratio. Polyester-polysaccharide graft copolymers described in literature are mostly composed of a hydrophilic backbone and hydrophobic side chains, taking account of the multifunctionality of the polysaccharide chain (Bajgai, Aryal, Lee, Park, & Kim, 2008; Dong, Qi, Huang, & Jing, 2011; Saldías, Velásquez, Quezada, & Leiva, 2015; Soliman et al., 2019; Stanley et al., 2014; Zhang, Chen et al., 2016).

In this work, we aim at synthesizing a “reverse” new graft copolymeric structure, PCL-g-dextran (PCL-g-Dex), composed of a PCL hydrophobic backbone and dextran hydrophilic side chains (Scheme 1) to confer new physico-chemical and biological properties to micelles based on these copolymers.

To our knowledge, Guerry et al. is the only group reporting the synthesis of a polyester-polysaccharide “reverse” structure, namely PCL-g-chitosan (Guerry et al., 2013). This method required the synthesis of a functional cyclic caprolactone which is a long process, with a limited amount of product and restricted to low molecular weights polymers. We describe here a new synthesis method of a PCL-g-Dex, using the grafting of Dex-N3 chains onto a PCL-yne backbone by a

copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC). This “click” reaction is quantitative, carried out under mild conditions that prevents PCL degradation, tolerant to many functional groups and specific so that protection/deprotection steps are unnecessary. For this purpose, a “clickable” PCL-yne was synthesized on a multigrams scale in a one-pot reaction using an anionic activation at the α -position of a commercial PCL, as described by Coudane’s group (Leroy et al., 2014; Ponsart, Coudane, & Vert, 2000; Samad et al., 2015). Simultaneously, a “clickable” Dex-N3 was prepared in two steps according to adapted procedures (Inaba et al., 2008; Verma & Gu, 2012). Then, micelles based on PCL-g-Dex copolymers were formed by a nanoprecipitation process and loaded with Dox, a potent anti-cancer agent. These micelles were characterized in terms of size and critical aggregation concentration (CAC). Their cytotoxicity towards human colorectal cancer cells (HCT-116) and human healthy fibroblasts (CCD-45SK) was assessed. Furthermore, a fluorescent probe, fluorescein isothiocyanate (FITC), was covalently coupled onto some hydroxyl groups of dextran to prepare fluorescent micelles and to compare the cellular uptake of the latter by cancer and healthy cell lines by fluorescence imaging and flow cytometry experiments.

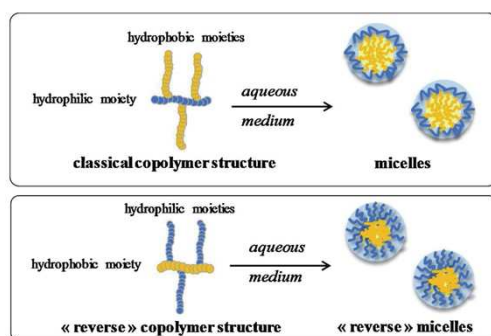
2. Experimental

2.1. Materials

Dextran from *Leuconostoc* spp. (Dex) ($M_r = 6000 \text{ g.mol}^{-1}$), with a molecular weight $M_n = 2500 \text{ g.mol}^{-1}$ (determined by SEC in acetate buffer pH 4.5), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ($M_n \sim 45,000 \text{ g.mol}^{-1}$), propargyl bromide (80 wt% in toluene), lithium diisopropylamide (LDA) (2 M in THF/heptane/ethylbenzene), 3-bromopropylamine hydrobromide, sodium cyanoborohydride, sodium azide, copper bromide (I), N, N, N', N'-pentamethyl diethylenetriamine (PMDETA), Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC), triethylamine, Doxorubicin hydrochloride (European Pharmacopoeia Reference standard) (Dox), Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (PBS) and solvents were purchased from Sigma Aldrich and were used as received. NH_4Cl (> 99 %) was purchased from Acros Organics, technical grade MgSO_4 from Carlo Erba. THF was dried with a solvent purification system (Innovative Technology). PBS 0,1 M (pH 5.8) was prepared by dissolving 13 g of KH_2PO_4 with 3.6 mL of a NaOH solution (0.1 M) in 1 L of distilled water. Spectra/por® dialysis tubes with a Molecular Weight Cut-Off; (MWCO) of 6–8 kDa, 3.5 kDa or 1 kDa were obtained from Spectrum Labs. Cell lines were purchased from ATCC® CCL-247. HCT-116 cell line derived from human colon cancer were grown in McCoy’s 5A Medium (Modified) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and 0.5 % gentamycin $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. CCD-45SK cells are human healthy fibroblasts and were grown in Dulbecco’s Modified Eagle Medium supplemented with 10 % FCS and 1 % gentamycin $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO_2 .

2.2. Instrumentation

^1H NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrophotometer operating at 300 MHz. Deuterium oxide (D_2O) or deuterated dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) were used as solvents, chemical shifts were expressed in ppm. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) experiments were performed on a Bruker Avance III spectrometer using $\text{DMSO-}d_6$ as solvent. Size exclusion chromatography (SEC) in DMF was performed on Waters 515 (HPLC pump) equipment fitted with $2 \times 300 \text{ mm}$ long 8 μm Polargel M columns coupled with a Waters 410 refractometric detector at 35 °C and a Waters 2489 UV-vis detector. The mobile phase was DMF with 0.1 % of LiBr at 1 mL.min^{-1} flow rate. SEC in acetate buffer was performed on Waters 515 (HPLC pump) equipment fitted with TSKgel PW5000 and TSKgel PW3000 columns coupled with a Waters 410 refractometric detector at 35 °C. Calibration was performed with pullulan standards.



Scheme 1. Representation of classical and « reverse » graft copolymer structures.

The mobile phase was an acetate buffer (pH 4.5) at 1 mL.min⁻¹ flow rate. Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrophotometer using the attenuated total reflectance (ATR) method. Elementary analysis was performed with a Elementar Vario Micro Cube analyser. Microchemical analyses were performed using an Agilent 7700x quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). CAC of the copolymers was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. CAC measurements were carried out with an RF-5301PC Shimadzu spectrofluorometer equipped with a xenon light source (UXL-150S, Ushio, Japan).

CAC of the copolymers was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. Measurements were carried out with an RF-5301PC Shimadzu spectrofluorometer equipped with a xenon light source (UXL-150S, Ushio, Japan). Briefly, an aliquot of pyrene solution (6×10^{-6} M in acetone, 1 mL) was added to different vials and the solvent was evaporated. Then, 10 mL of aqueous solutions of different concentrations were added to the vials. The final concentration of pyrene in each vial was 6×10^{-7} M. After three hours of stirring at room temperature, each sample was filtered with a RC45 filter and ultra-sonicated for 15 min. The fluorescence emission spectra of solutions were recorded from 350 to 450 nm at an excitation wavelength of 340 nm. The emission and excitation slit widths were 5 nm and 3 nm, respectively. The emission fluorescence values at 374 and 394 nm were used for subsequent calculations. The CAC was determined from the intersection of linear regression lines of the I_{374}/I_{394} ratio versus polymer concentration plots. Dynamic Light scattering (DLS) was carried out using a Malvern Instruments Nano-ZS equipped with a He-Ne laser ($\lambda = 632.8$ nm). Samples were prepared in phosphate buffer saline (pH 7.4) medium at a concentration of 0.1 g.L⁻¹ and were filtered with a 0.45 μ m filter. Mean radius values were obtained from triplicate runs. Standard deviations were evaluated from hydrodynamic radius distribution. UV-spectrometry was performed on a Perkin-Elmer Precisely Lambda 35 spectrometer, with 1 cm optical path quartz cuvettes.

2.3. Methods

2.3.1. Synthesis of Dex-N3

Dex-N3 oligomers were synthesized in two steps. First, bromopropyl-dextran (Dex-Br) was prepared according to a modified reductive amination procedure (Verma & Gu, 2012). In a typical procedure, commercial dextran (3 g, 1.2 mmoles) was dissolved in borate buffer (8 mL, 0.05 M, pH 8.2). 3-bromopropylamine hydrobromide (2.65 g, 12 mmoles) and sodium cyanoborohydride (540 mg, 8.5 mmoles) were added. The reaction proceeded under stirring at room temperature in dark for 3 days. The polymer was then recovered by precipitation in cold methanol. After centrifugation, the precipitate was dialyzed against water (MWCO = 1000 Da) for 24 h and finally freeze-dried. Then, Dex-N3 was synthesized by a substitution reaction. Typically, Dex-Br (1.5 g, 0.6 mmoles) was dissolved in 50 mL of distilled H₂O and reacted with sodium azide (161 mg, 2.5 mmoles) under stirring at 60 °C overnight. The product was dialyzed against water (MWCO = 1000 Da) for 2 days and then freeze-dried. Dex-N3 was obtained with a 60 % yield.

2.3.2. Synthesis of PCL-g-dextran copolymer

PCL-yne was synthesized according to a previous work (Leroy et al., 2014; Samad et al., 2015). Copolymer PCL-g-Dex was synthesized according to a classical procedure (El Habnoui et al., 2013). Typically, PCL-yne (8 % alkyne groups with respect to hydroxycaproic acid units, $M_n = 17,100$ g.mol⁻¹, $\bar{D} = 1.9$, 0.07 g, 4.9×10^{-2} mmoles of propargyl units), Dex-N3 (0.3 g, 7.2×10^{-2} mmole azido function, 1.5 eq/propargyl units) and CuBr (0.014 g, 2 eq/propargyl units) were solubilized in 20 mL of DMSO for 1.5 h in a Schlenk tube. The solution was degassed by three freeze-pump-thaw cycles. N,N,N',N',N''-

Pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) (20.5 μ L, 2 eq/propargyl units) degassed by argon bubbling was added to the reaction medium. Reaction was carried out for 2 days at 40 °C under stirring and inert atmosphere. The crude medium was dialyzed (MWCO = 6–8000 Da) against decreasing DMSO/H₂O ratios and finally against H₂O for two weeks. Copolymer was recovered by freeze-drying with a yield of 52 %.

2.3.3. Synthesis of fluorescent PCL-g-dextran-(FITC) copolymer

PCL-g-Dex copolymer (80 mg, 0.032 mmoles) was dissolved in 8 mL of DMSO. 2.6 mg of FITC (6.65×10^{-3} mmoles) were added to the medium as well as 1 μ L of triethylamine (6.65×10^{-3} mmoles). Reaction was completed in dark at 60 °C for 24 h. Resulting fluorescent copolymer was dialyzed against a DMSO/H₂O gradient and then against H₂O (MWCO = 3500 Da) for 3 days and recovered by freeze-drying with a yield of 63 %. The covalent coupling of FITC onto the copolymer was confirmed by a SEC analysis in DMF with a fluorescence detector.

2.3.4. Preparation of PCL-g-dextran micelles

Copolymer micelles were prepared by a nanoprecipitation process. 20 mg of PCL-g-Dex copolymer was dissolved in 2 mL of DMSO, poured into water (18 mL) at a constant flow rate (1 mL.min⁻¹) and stirred at 300 rpm for 2 h. The suspension was then dialyzed (MWCO = 3500 Da) against H₂O for 24 h to eliminate DMSO and then filtered through a 0.45 μ m filter.

2.3.5. Preparation of Dox-loaded micelles

Dox-loaded micelles were prepared by a nanoprecipitation process. 20 mg of PCL-g-Dex copolymer and Dox (3 or 6 mg) were dissolved in 2 mL of DMSO at 55 °C before addition in water (18 mL) at a constant flow rate (1 mL.min⁻¹) and stirred at 300 rpm for 2 h at 55 °C. The suspension was then dialyzed (MWCO = 3500 Da) against H₂O for 24 h to eliminate DMSO and unloaded Dox and then filtered through a 0.45 μ m filter.

Drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) were determined by UV-vis spectrophotometry at 480 nm. Quantification was performed with respect to a calibration curve of Dox in DMSO/PBS: 4/1 (v/v). The following equations were used to determine DL content and EE:

$$DL \text{ (wt\%)} = (\text{mass of Dox in micelles}/\text{mass of micelles}) \times 100$$

$$EE \text{ (wt\%)} = (\text{mass of Dox in micelles}/\text{initial mass of Dox}) \times 100$$

In vitro Dox releases from PCL-g-Dex micelles were performed in PBS (pH 7.4) or in PBS (pH 5.8) at 37 °C under constant orbital shaking (180 rpm; Heidolph Unimax 1010). 2 mL of Dox-copolymer micellar suspension at 1 g.L⁻¹ were put in a dialysis bag (MWCO = 3500 Da) which was immersed in 20 mL of PBS (pH 7.4 or 5.8) at 37 °C. At specific time points, the entire release medium was removed and replaced with 20 mL of fresh PBS. Collected samples were analyzed by UV-vis spectrophotometry at 480 nm with reference to a calibration curve of Dox in PBS (pH 7.4 or 5.8). The amount of released Dox (R_{DOX}) was calculated based on the following formula:

$$R_{DOX} \text{ (\%)} = 100 \times M_{RDOX}/M_{DOX}$$

with M_{RDOX} = mass of released Dox and M_{DOX} = mass of Dox in micelles.

A release of free Dox in PBS pH 7.4 at 37 °C in the same conditions was also performed to compare with previous experiments.

2.3.6. *In vitro* biological assays

All culture cell lines were purchased from ATCC®. HCT-116 and HT-29 cell lines derived from human colon cancer cells were grown in McCoy's 5a Medium (Modified) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and gentamycin 50 μ g.mL⁻¹. CCD45SK cells, healthy human fibroblasts derived from skin, were cultured in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % FCS and

gentamycin $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Human breast cancer cells (MCF-7) were cultured in DMEM-F12 supplemented with 10 % FCS and gentamycin $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. All cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO_2 .

MTT assay was performed to evaluate the cell death. Briefly, the day prior to transfection, 2000 cells were seeded into a 96 multi-well plate in $200 \mu\text{L}$ complete culture medium. 24 h after seeding, dispersed compounds (empty micelles, Dox-loaded micelles) were added on cells with increasing concentrations (from 0 to $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 h and compared with the effect of the equivalent concentration of Dox. After this incubation, cells were treated for 4 h with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Promega) in media. The MTT/media solution was then removed and the precipitated crystals were dissolved in EtOH/DMSO (1:1). The solution absorbance was read at 540 nm.

Internalization of fluorescent FITC-micelles in cancer and healthy cells was studied by confocal imaging. One day prior to the experiment, HCT-116 cells and CCD-45SK were plated onto bottom glass dishes (World Precision Instrument, Stevenage, UK) at a density of 10^6 cells $\cdot\text{cm}^{-2}$. Adherent cells were then washed once and incubated in 1 mL culture medium containing FITC-micelles at a concentration of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 20 h. Fifteen minutes before the end of incubation, cells were loaded with CellMask™ plasma membrane stain (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at a final concentration of $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Prior the observation, cells were washed gently with McCoy's 5a Medium. Cells were then visualized with a LSM 780 LIVE confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France), at 488 nm using a high magnification (63x/1.4 OIL DIC Plan-Apo).

Internalization of FITC-micelles was quantified by flow cytometry experiments. Cells were treated or not with $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of FITC-micelles for 1, 3, 6 and 24 h. After treatment, control and treated cells were washed once in cold Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested and centrifuged (1300 rpm, 5 min). Cell pellets were suspended in PBS enriched with CaCl_2 , MgCl_2 and stained by propidium iodide ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), a cell death indicator. Flow cytometric determination of living cells and micelles with FITC positive cells was done by FACS CytoFlex Flow Cytometer (Beckman Coulter, France) with a minimum of 5000 living cells collected.

Caspase-3 immunofluorescence was analyzed *in vitro*. The day prior to transfection, HCT-116 and HT-29 cells were seeded into 8 well-cover glass (SARSTEDT, AG & Co. Germany) in $500 \mu\text{L}$ complete culture medium. One day after seeding, dispersed compounds were added or not in culture medium at concentrations of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for empty micelles and Dox-micelles; and $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for Dox. One day after this treatment, they were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature (RT), washed 3 times with PBS then permeabilized with PBS/0.2 % Triton X-100® for 5 min at RT, washed again with PBS 3 times and incubated with Blocking buffer (PBS/0.1 % Tween20® + 5 % goat serum) at RT, for 2 h. After blocking, cells were washed once with PBS then incubated overnight at 4°C with affinity-purified rabbit anti-human caspase-3 active (1/100, Millipore, Temecula USA). The following day, cells were washed twice with PBS, twice with PBS/0.1 % Tween20® and twice with PBS at RT. Cells were

treated with goat anti rabbit Alexa Fluor 488 anti-body (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc) for 2 h, at RT protected from light and finally washed twice with PBS. The Hoechst dye 33342 (Invitrogen) was added to the last wash at $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and incubated for 10 min. After 3 washes with PBS/0.1 % Tween20®, slides were finally examined under a Carl Zeiss confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 880, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Analysis of the recorded images was carried out with image J software.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of PCL-g-Dex amphiphilic graft copolymer

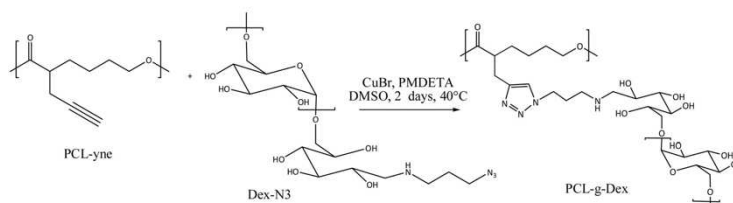
First, both derivatives of hydrophobic and hydrophilic homopolymer moieties were synthesized to further prepare amphiphilic PCL-g-Dex copolymer by a “click” reaction.

PCL-yne was synthesized by functionalization of a commercial native PCL (molecular weight of $40\,100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ by SEC in THF) along its backbone according to the general route of anionic post-polymerization described by Coudane's group (Leroy et al., 2014; Ponsart et al., 2000; Samad et al., 2015) (Scheme S1 in Supporting Information). Contrary to the Guerry's method (Guerry et al., 2013), this process is an easy and rapid one-pot reaction, few grams of PCL-yne were obtained in a couple of hours. A substitution ratio of 8 mol% was determined by $^1\text{H-NMR}$ according to the integration ratio of the alkyne proton at 2.0 ppm and of a methylene proton at 4.0 ppm (Fig. S1 in Supporting Information), which was fully satisfying to obtain amphiphilic copolymers. However, one can note that this method can generate moderate chain scissions because of the presence of a strong base (LDA), but this can be easily predicted. PCL-yne was obtained with a number molecular weight of $17\,100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ and a dispersity $\bar{D} = 1.9$, measured by SEC in THF, which showed that despite moderate and predictive degradation, the aimed molecular weight value was achieved.

Simultaneously, a hydrophilic Dex-N3 oligosaccharide was prepared (Scheme S2 in Supporting Information). A first step consisted in a bromination by a reductive amination process onto the reductive extremity of a commercial dextran with bromopropyl amine according to a previous work (Verma & Gu, 2012). The pH of the medium was maintained at 8.2 in order to form a Schiff base, which was then selectively reduced in an alkyl amine by addition of sodium cyanoborohydride. The resulting dextran derivative was purified by precipitation in cold methanol, dialysis against water and was finally recovered by freeze-drying. The second step consisted in a nucleophilic substitution with sodium azide to convert the bromo into azido group. The reaction product was purified by dialysis against water and recovered by freeze-drying. A substitution ratio of 60 % was determined by elemental analysis.

PCL-g-Dex amphiphilic copolymer was then synthesized by a CuAAC Huisgens reaction between the propargyl groups of hydrophobic PCL-yne and azido functions of hydrophilic Dex-N3 oligosaccharide (Scheme 2).

Typically, an excess of Dex-N3 relative to alkyne functions of PCL-yne was used in presence of Cu^{I} catalyst and the reaction was performed



Scheme 2. Synthesis of PCL-g-dextran copolymer.

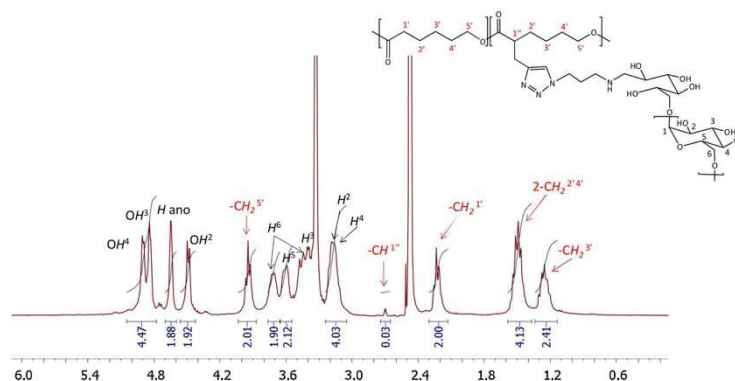


Fig. 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PCL-g-dextran copolymer (DMSO d_6 , 300 MHz).

in DMSO under inert and oxygen-free atmosphere. DMSO, copper traces as well as unreacted products were removed by dialysis against water. The resulting copolymer was soluble in water and recovered by freeze-drying. FT-IR confirmed the presence of both dextran at 3370 cm^{-1} and 1010 cm^{-1} and PCL at 1720 cm^{-1} corresponding to the ester carbonyl function (data not shown). $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy showed peaks characteristics of dextran: 3.0–3.8 ppm (C–H of the glucose units), 4.4–5.0 ppm (O–H), 4.7 ppm (anomeric proton) and peaks corresponding to PCL at 4.0 ppm ($\text{CH}_2\text{-O-}$), 2.7 ppm (CH-CO), 2.3 ppm ($\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 1.5 ($\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) and 1.3 ppm ($\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) (Fig. 1).

Provided that dextran and PCL homopolymers were removed, the grafting ratio was determined by $^1\text{H-NMR}$. According to the ratio between integrations of the PCL hydrogen (-CH-), in α of the grafting site, at 2.7 ppm and of a PCL hydrogen at 2.3 ppm, a 3 % grafting ratio was calculated. Moreover, the integration of the anomeric proton and the polymerization degree of dextran ($\text{DP} = 16$) confirmed the 3 % grafting ratio and that free dextran was fully removed. The Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB), defined as the ratio number of glucose unit/number of hydroxycaproic unit, was evaluated at 2.0 from the $^1\text{H-NMR}$ spectrum. $^1\text{H-NMR}$ analysis showed that both glucose and hydroxycaproic units were present, but it can't confirm an effective grafting reaction: no triazol group was detected at 8.1 ppm, which can be explained by the length of the dextran chains and the 3 % grafting ratio. SEC and DOSY NMR analyses were realized to show the effective grafting reaction. SEC analyses of Dex-N3, PCL-yne and PCL-g-Dex were performed in DMF which is a solvent of the 3 samples (Table 1).

PCL-g-Dex has a molecular weight of $4200\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ with a monomodal distribution and a narrow dispersity ($\text{D} = 1.5$). This suggested that a copolymer was effectively obtained, without free Dex-N3 or PCL-yne homopolymers. The molecular weight of the copolymer was higher than the one of Dex-N3 but lower than the one of PCL-yne, which is a classical observation in SEC when amphiphilic copolymers are analyzed, due to the chain bending.

The successful PCL-g-Dex copolymer synthesis was also confirmed by DOSY-NMR analysis in DMSO (Fig. 2). It is shown that $^1\text{H-NMR}$ signals of both PCL and dextran present the same diffusion coefficient,

Table 1
Molecular weights of Dex-N3, PCL-yne and PCL-g-Dex (SEC in DMF).

	Molecular weight Mn ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Dispersity D
Dex-N3	2900	1.5
PCL-yne	7700	3.0
PCL-g-Dex	4200	1.5

which is consistent with an efficient grafting of dextran chains onto PCL backbone.

Moreover, no residual homopolymer was observed, which means that the purification process by dialysis was efficient. This result was also in good agreement with the previous SEC experiments. Dialysis might also be suitable to remove any copper traces providing from the catalyst, since copper causes cell damage and has to be eliminated for all biological applications. ICP-MS analysis revealed 6.95 ppm of residual copper in the copolymer, which is very satisfying for its use in biological media.

3.2. Self-assembly of PCL-g-dextran copolymer

Nano-objects based on PCL-g-Dex copolymer ($\text{HLB} = 2.0$) were prepared by a typical nanoprecipitation process. Briefly, copolymer was solubilized in DMSO and the solution was added to water under controlled stirring and flow to form a suspension of nano-objects which was then purified by dialysis against water to remove DMSO. The dialysis yield was 75 %.

To verify if the self-assembly of PCL-g-Dex generated polymeric micelles in aqueous medium, a critical aggregation concentration (CAC) of a copolymer was determined by fluorescence spectroscopy. These experiments were performed in emission with an excitation wavelength at $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{ nm}$ using pyrene as fluorescent probe. The intensities of emission peaks at $\lambda_{\text{em}} = 374$ and 394 nm , namely I_{374} and I_{394} , were pointed out since the variation of the I_{374}/I_{394} ratio is correlated to the distribution of pyrene between the aqueous phase and the hydrophobic core of PCL-g-Dex micelles. The I_{374}/I_{394} intensity ratio as a function of the copolymer concentration allowed to calculate the CAC at $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ from the intersection of the two lines and corresponded to the minimum copolymer concentration necessary to form micellar aggregates (Fig. S2 in Supporting Information). This value is close to the one obtained with Dex-g-PCL (Wu et al., 2018: $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Liu & Zhang, 2007: $0.06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

The size of PCL-g-Dex micelles was determined by Dynamic Light Scattering (DLS, nanosizer). This analysis showed a monomodal distribution in intensity with a mean hydrodynamic diameter $D_H = 109\text{ nm}$ and a narrow polydispersity $\text{PDI} = 0.18$ (Fig. S3 in Supporting Information). This nanometric size was suitable to make these nano-carriers able to pass through tumoral cell membranes *in vivo* by EPR effect.

3.3. Dox loading of PCL-g-dextran micelles

PCL-g-Dex copolymer micelles were loaded with Dox, an anti-cancer agent frequently used for chemotherapy treatments. Dox has a

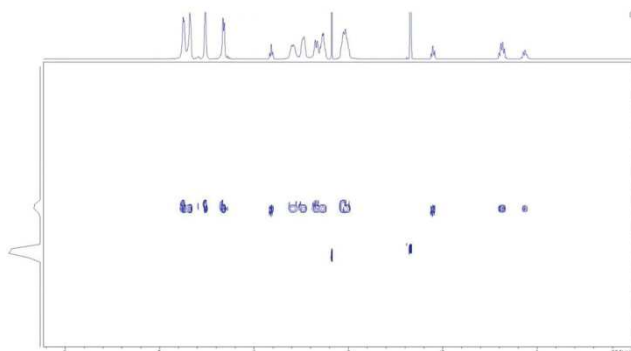


Fig. 2. DOSY-NMR spectrum of PCL-g-Dex copolymer (DMSOd6).

solubility of 10 g.L^{-1} in water and is non selectively distributed in the organism, which means that despite its efficiency towards tumoral cells, healthy cells are also affected by its cytotoxicity. However, its good activity makes it a potent drug usually used to treat various cancers. Its incorporation in nano-systems should increase its bioavailability and significantly decreases its side-effects cytotoxicity.

To incorporate Dox into copolymeric micelles, the nanoprecipitation process was used by dissolving the drug and PCL-g-Dex (HLB = 2) in DMSO. Two drug:copolymer ratios were tested, i.e. 3.0:20 and 6.0:20 (mg:mg) to evaluate the impact of the initial drug amount on the loading. The size of loaded nano-carriers was evaluated by DLS and their drug loading (DL) as well as their encapsulation efficiency (EE) were determined by UV-vis experiments (Table 2).

Diameter size of micelles was in the range of those obtained with Dex-g-PCL (Saldías et al., 2015) or PCL-b-Dex (Lee et al., 2015; Zhang et al., 2015). Loaded micelles showed a monodisperse size distribution with a narrow polydispersity. Hydrodynamic diameter was higher than the one of empty micelles, which is in good agreement with the loading. Increasing the Dox/copolymer ratio (3:20 to 6:20) led to an improvement of DL from 2.0 wt% to 5.1 wt% which is satisfying for the aimed cytotoxic activity as shown in subsequent experiments, and close to values obtained by Wu et al. (2018) and Zhang et al. (2015) with Dex-g-PCL or PCL-b-Dex. For this reason, we did not investigate the possibility to increase this DL.

In vitro release of Dox from PCL-g-Dex loaded-micelles (DL = 2.0 wt %) was studied as a function of pH. Release profiles of free Dox and Dox loaded in micelles for a 2 days' period in physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) are presented in Fig. 3(A). Interestingly, no burst effect was observed during the first hours. Unlike free Dox that was fully released after 2 days, the release of Dox from the micelles was sustained: $\approx 40\%$ of drug were released after 24 h before reaching a plateau. The release of Dox loaded in micelles as a function of the pH is illustrated in Fig. 3(B). As expected, Dox was more rapidly released in acidic pH (5.8) that mimics the intracellular medium (endosomes, pH ~ 5.0–6.5; lysosomes, pH ~ 4.5–5.0) (Cao et al., 2015) than in physiological pH (7.4), with a complete release after 2 days.

These results fit well with the aimed application where micelles should preferably quickly release Dox in the acidic pH of endosomes or

lysosomes and not in the blood at pH 7.4.

3.4. Cytotoxicity of drug-loaded micelles

For anti-cancer applications it is important to compare the cytotoxicity of Dox-loaded micelles on cancer and healthy cells, induced after 24 h incubation with increasing doses of Dox, free or encapsulated in micelles. Loaded micelles with a DL of 5.1 wt% were chosen to perform these experiments. Fig. 4 describes the results obtained with Dox-loaded micelles on colorectal cancer cells (HCT-116) and on healthy fibroblasts (CCD-45SK). These culture cells were incubated with 0, 2.5, 5, 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of free Dox or with 0, 50, 100 or 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Dox-loaded micelles for an equivalent amount of drug. Empty micelles were also tested to verify the safety of these nano-carriers, in the same concentrations than Dox-loaded micelles.

Fig. 4 showed the biocompatibility of empty micelles, without important toxicity in the culture cells. In contrast, at the higher concentration, free Dox induced the death of 51 % of colorectal cancer cells and 55 % of healthy cells, and the curve profile is very close for each cell line. Interestingly, drug-loaded micelles induced different biological effects depending on whether they were incubated with cancerous or healthy cells. In colorectal cancer cells the profile of drug loaded micelles is close to the one of free Dox while in healthy fibroblasts, the curve is merged with the one of empty micelles, meaning that drug-loaded micelles are not more toxic than empty micelles for healthy cells.

The cytotoxicity studies were reproduced on two other human cancer cell lines: a second colorectal cancer cell line, HT-29 (Fig. S4 in Supporting Information) and also MCF-7, a breast cancer cell line (Fig. S5 in Supporting Information). Data validated the hypothesis of a potential nano-carrier using for drug delivery in cancer cells. In addition, the activation of apoptotic pathway was verified by an immunofluorescence experiment highlighting the increased expression of caspase 3 protein in colorectal cancer cells treated with Dox and Dox-loaded micelles (Fig. S6 in Supporting Information).

These results showed that i) micelles didn't induce an important cell death, they are biocompatible ii) Dox had the same high toxicity for cancer and healthy cells iii) Dox-loaded micelles killed cancer cells

Table 2

Hydrodynamic diameter (D_H), polydispersity (PDI), drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) of Dox-loaded micelles as a function of Dox/copolymer ratio.

	Dox : copolymer (w : w)	D_H (nm)	PDI	DL (wt%)	EE (wt%)
Empty micelles	0.0 : 20	108.5	0.18	/	/
Dox-loaded micelles	3.0 : 20	144.0	0.18	2.0	7.5
Dox-loaded micelles	6.0 : 20	142.2	0.16	5.1	15.4

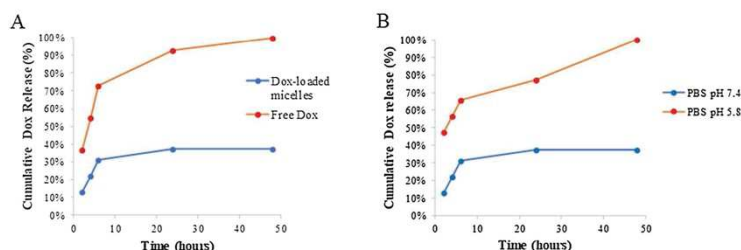


Fig. 3. Cumulative release of (A) free Dox and Dox from PCL-g-Dex micelles at pH 7.4 (B) Dox from PCL-g-Dex micelles as a function of pH.

almost as effectively as free drug (iii) healthy cells were not affected by the incubation with Dox-loaded micelles. This is the proof of a specific cytotoxicity of Dox-loaded micelles on cancer cells.

3.5. Cell internalization of fluorescent PCL-g-Dex micelles

To establish the difference of micelles internalization between cancer cells and healthy cells, fluorescent micelles were prepared. A fluorescent probe (FITC) was covalently coupled to PCL-g-Dex copolymer to prepare then fluorescent micelles (FITC-micelles) by nanoprecipitation. Internalization was studied by fluorescence imaging on a confocal microscope. It is shown that, after 24 h incubation of cells with FITC-micelles at $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, micelles were efficiently internalized by colorectal cancer cells whereas in healthy fibroblast cells, they were not internalized and formed aggregates out of the cells (Fig. 5).

The difference in internalization between healthy and cancerous cells was then quantified by flow cytometry. FITC-micelles were incubated in the culture cells at a concentration of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ during different periods (1 h, 3 h, 6 h and 24 h). Then, kinetics of micelles internalization was determined in colorectal cancer cells and healthy fibroblast cells (Fig. 6). In colorectal cancer cells, after 1 h of incubation, a high internalization level (86 % stained cells) was reached and after 24 h, 98 % of cells were stained. In contrast, in healthy fibroblast cells, after 24 h of incubation, only 13 % of cells internalized FITC-micelles. These data clearly demonstrated the poor internalization of micelles by healthy cells in comparison with cancer cells.

All together these results demonstrated that using micelles for drug delivery allow reaching cancer cells without affecting healthy cells. In addition, micelles vectorization of the Dox did not affect the efficiency of the drug.

4. Conclusion

A new reverse oligosaccharide-based copolymer, PCL-g-dextran, based on biodegradable and biocompatible polymers, was successfully synthesized. The synthesis route allowed a rapid preparation of the copolymer and an easy variation of Hydrophilic Hydrophobic Balance via the control of the grafting ratio of the hydrosoluble dextran moiety on the PCL backbone. Biodegradable Dox-loaded micelles were obtained by nanoprecipitation of the copolymer and Dox. *In vitro* drug release of Dox-loaded micelles fit well with the aimed application where micelles quickly release Dox in the acidic pH of endosomes or lysosomes and not in the blood at pH 7.4. Moreover, Dox-loaded micelles were non-toxic for healthy cells and toxic for cancer cells after 24 h incubation, showing excellent target recognition. In addition, micelles vectorization of the Dox did not affect the efficiency of the drug. Finally, internalization of micelles was effective only in cancer cells and not in healthy cells. Based on the results obtained with Dox-loaded micelles, this new PCL-g-dextran copolymer structure is the base of promising nano-vectors for effective drug delivery in cancer therapy.

Acknowledgments

The authors wish to thank the French Ministry of Higher Education and Research for Victor Delorme's funding, the "Cancéropôle Grand Sud-Ouest" french organization for Hana Mahindad's funding, Stéphane Dejean for his help in polymer synthesis and for ^1H NMR analyses, Aurélien Lebrun and Cédric Totée of the "Plateforme d'Analyses et de Caractérisation-Pôle Chimie Balard" for DOSY NMR experiments and Léa Causse of the AETE-ISO Platform (OSU OREME) for the ICP-MS measurements.

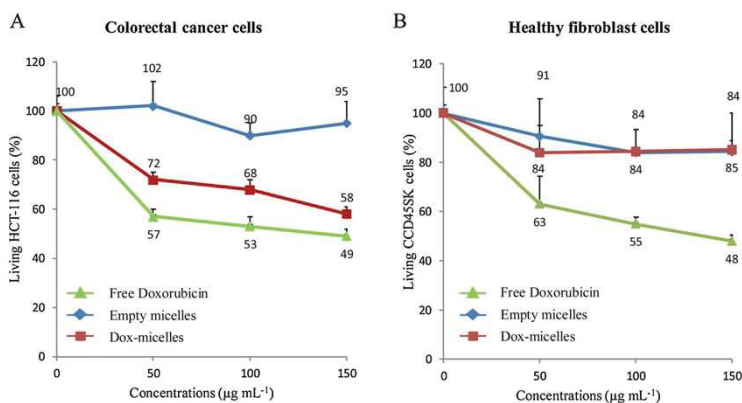


Fig. 4. Cytotoxicity study on cancer and healthy cells. (A) Human colorectal cancer cells (HCT-116) or (B) human healthy fibroblasts (CCD-45SK) were incubated with increasing concentrations (from 0 to $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of free Dox, empty micelles and Dox-loaded micelles (DL = 5.1 %) (Dox-micelles) (from 0 to $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Results are means \pm standard deviations of two independent experiments performed in triplicate.

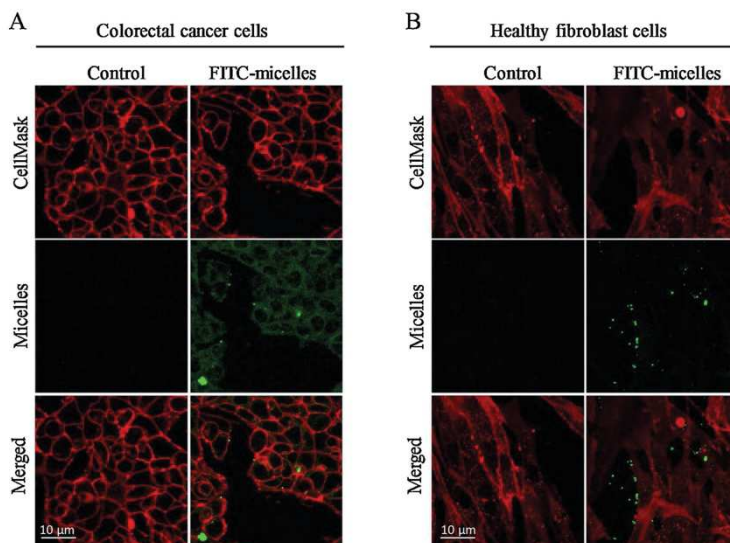


Fig. 5. Cancer and healthy cells uptake of FITC-micelles. (A) Colorectal cancer cells (HCT-116) and (B) healthy fibroblasts cells (CCD-45SK) were incubated for 24 h with FITC-micelles at a concentration of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Membranes were stained with CellMask (red). Fluorescence imaging was performed on living cells under a 488 nm wavelength with a Carl Zeiss Microscope (magnification x63) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

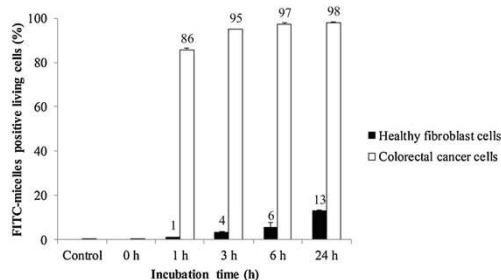


Fig. 6. Internalization of FITC-micelles by living cancer and healthy cells. Cells were treated or not with $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of FITC-micelles for 1, 3, 6 and 24 h. Non-fixed cells were incubated with propidium iodide ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to remove dead cells and FITC-micelles fluorescence was analysed by flow cytometry on living cells only. Data represent means \pm SEM of two experiments.

Appendix A. Supplementary data

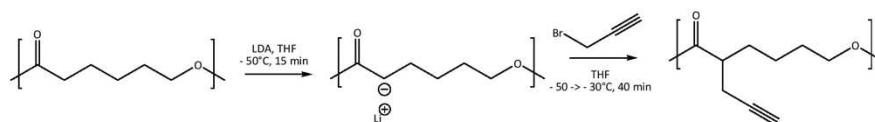
Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115764>.

References

- Bajgai, M. P., Aryal, S., Lee, D. R., Park, S.-J., & Kim, H. Y. (2008). Physicochemical characterization of self-assembled poly(epsilon-caprolactone) grafted dextran nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, *286*(5), 517–524. <https://doi.org/10.1007/s00396-007-1795-5>.
- Blanco, E., Kessinger, C. W., Sumer, B. D., & Gao, J. (2009). Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy. *Experimental Biology and Medicine*, *234*(2), 123–131. <https://doi.org/10.3181/0908-MR-250>.
- Cabral, H., & Kataoka, K. (2014). Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *Journal of Controlled Release*, *190*, 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042>.
- Cao, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Liu, J., Liu, J., Dong, A., et al. (2015). pH/redox dual-sensitive nanoparticles based on the PCL/PEG triblock copolymer for enhanced intracellular doxorubicin release. *RSC Advances*, *5*(36), 28060–28069. <https://doi.org/10.1039/C5RA01833A>.
- Chen, C., Cai, G., Zhang, H., Jiang, H., & Wang, L. (2011). Chitosan-poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) graft copolymers: Synthesis, self-assembly, and drug release behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *96A*(1), 116–124. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32965>.
- Cheng, J., & Pun, S. H. (2015). Polymeric biomaterials for cancer nanotechnology. *Biomaterials Science*, *3*(7), 891–893. <https://doi.org/10.1039/C5BM90025E>.
- Cho, H., Lai, T. C., Tomoda, K., & Kwon, G. S. (2015). Polymeric micelles for multi-drug delivery in cancer. *AAPS PharmSciTech*, *16*(1), 10–20. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0251-3>.
- Coumes, F., Darcos, V., Domurado, D., Li, S., & Coudane, J. (2013). Synthesis and ring-opening polymerisation of a new alkyne-functionalised glycolide towards biocompatible amphiphilic graft copolymers. *Polymer Chemistry*, *4*(13), 3705. <https://doi.org/10.1039/c3py00375b>.
- Dong, X., Qi, R., Huang, Y., & Jing, X. (2011). Synthesis of biodegradable dextran-g-(PCL-b-PEG) by combination of ring-opening polymerization and click chemistry. *Journal of Controlled Release*, *152*, e198–e199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.006>.
- El Habnoui, S., Nottelet, B., Darcos, V., Porsio, B., Lemaire, L., Franconi, F., et al. (2013). MRI-visible poly(epsilon-caprolactone) with controlled contrast agent ratios for enhanced visualization in temporary imaging applications. *Biomacromolecules*, *14*(10), 3626–3634. <https://doi.org/10.1021/bm400978a>.
- Freichels, H., Alaimo, D., Auzély-Velty, R., & Jérôme, C. (2012). A-acetal, omega-alkyne poly(ethylene oxide) as a versatile building block for the synthesis of glycoconjugated graft-copolymers suited for targeted drug delivery. *Bioconjugate Chemistry*, *23*(9), 1740–1752. <https://doi.org/10.1021/bc200650n>.
- Freichels, H., Pourcelle, V., Auzély-Velty, R., Marchand-Brynaert, J., & Jérôme, C. (2012). Synthesis of poly(lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone)-graft-mannosylated poly(ethylene oxide) copolymers by combination of “click” and “click” chemistries. *Biomacromolecules*, *13*(3), 760–768. <https://doi.org/10.1021/bm201690w>.
- Guerry, A., Bernard, J., Samain, E., Fleury, E., Cottaz, S., & Halila, S. (2013). Aniline-catalyzed reductive amination as a powerful method for the preparation of reducing end-“clickable” chito oligosaccharides. *Bioconjugate Chemistry*, *24*(4), 544–549. <https://doi.org/10.1021/bc3003716>.
- Guerry, A., Cottaz, S., Fleury, E., Bernard, J., & Halila, S. (2014). Redox-stimuli responsive micelles from DOX-encapsulating polycaprolactone-g-chitosan oligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.052>.
- Inaba, Y., Fujimoto, T., Ono, H., Obata, M., Yano, S., & Mikata, Y. (2008). A general route to pendant C-glycosyl 1,2- and 1,3-diamines. *Carbohydrate Research*, *343*(5), 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.030>.
- Jeon, S. I., Lee, J. H., Andrade, J. D., & De Gennes, P. G. (1991). Protein–Surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science*, *142*(1), 149–158. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(91\)90043-8](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90043-8).
- Labarre, D. (2012). The interactions between blood and polymeric nanoparticles depend on the nature and structure of the hydrogel covering the surface. *Polymers*, *4*(2), 986–996. <https://doi.org/10.3390/polym4020986>.
- Lee, R.-S., Li, Y.-C., & Wang, S.-W. (2015). Synthesis and characterization of amphiphilic photocleavable polymers based on dextran and substituted-epsilon-caprolactone. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.062>.
- Leroy, A., Samad, A. A., Garric, X., Hunger, S., Noël, D., Coudane, J., et al. (2014).

- Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol- γ ne photo cross-linking of multifunctional polyesters. *RSC Advances*, 4(60), 32017–32023. <https://doi.org/10.1039/C4RA03665D>.
- Li, B., Wang, Q., Wang, X., Wang, C., & Jiang, X. (2013). Preparation, drug release and cellular uptake of doxorubicin-loaded dextran-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.051>.
- Liu, J.-Y., & Zhang, L.-M. (2007). Preparation of a polysaccharide-polyester diblock copolymer and its micellar characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.009>.
- Mahmud, A., Xiong, X.-B., Aliabadi, H. M., & Lavasanifar, A. (2007). Polymeric micelles for drug targeting. *Journal of Drug Targeting*, 15(9), 553–584. <https://doi.org/10.1080/10611860701538586>.
- Nikouei, N. S., Ghasemi, N., & Lavasanifar, A. (2016). Temperature/pH responsive hydrogels based on poly(ethylene glycol) and functionalized poly(ϵ -caprolactone) block copolymers for controlled delivery of macromolecules. *Pharmaceutical Research*, 33(2), 358–366. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1794-z>.
- Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3), 630–648. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.006>.
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- Ponsart, S., Coudane, J., & Vert, M. (2000). A novel route to poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers via anionic derivatization. *Biomacromolecules*, 1(2), 275–281. <https://doi.org/10.1021/bm005521t>.
- Rieger, J., Passirani, C., Benoit, J.-P., Van Butsele, K., Jérôme, R., & Jérôme, C. (2006). Synthesis of amphiphilic copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(ϵ -caprolactone) with different architectures, and their role in the preparation of stealthy nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 16(11), 1506–1514. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500110>.
- Saldías, C., Velásquez, L., Quezada, C., & Leiva, A. (2015). Physicochemical assessment of dextran-g-poly(ϵ -caprolactone) micellar nanoaggregates as drug nanocarriers. *Carbohydrate Polymers*, 117, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.035>.
- Samad, A. A., Bakkour, Y., Fanny, C., Omar, F. E., Coudane, J., & Nottelet, B. (2015). From nanospheres to micelles: Simple control of PCL-g-PEG copolymers' amphiphilicity through thiol- γ ne photografting. *Polymer Chemistry*, 6(28), 5093–5102. <https://doi.org/10.1039/C5PY00391A>.
- Samad, A. A., Bethry, A., Koziołová, E., Netopilík, M., Etrych, T., Bakkour, Y., et al. (2016). PCL-PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(37), 6228–6239. <https://doi.org/10.1039/C6TB01841F>.
- Soliman, S. M. A., El Founi, M., Vanderesse, R., Acherar, S., Ferji, K., Babin, J., et al. (2019). Light-sensitive dextran-covered PNBA nanoparticles to continuously or discontinuously improve the drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110393. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110393>.
- Stanley, N., Bucataru, G., Miao, Y., Favrelle, A., Briá, M., Stoffelbach, F., et al. (2014). Bronsted acid-catalyzed polymerization of ϵ -caprolactone in water: A mild and straightforward route to poly(ϵ -caprolactone)-graft-water-soluble polysaccharides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 52(15), 2139–2145. <https://doi.org/10.1002/pola.27250>.
- Sun, H., Guo, B., Li, X., Cheng, R., Meng, F., Liu, H., et al. (2010). Shell-sheddable micelles based on dextran-SS-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin. *Biomacromolecules*, 11(4), 848–854. <https://doi.org/10.1021/bm1001069>.
- Vauthier, C., & Labarre, D. (2008). Modular biomimetic drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 18(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(08\)50008-6](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(08)50008-6).
- Verma, M. S., & Gu, F. X. (2012). Microwave-enhanced reductive amination via Schiff's base formation for block copolymer synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2740–2744. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.025>.
- Wei, X., Gong, C., Gou, M., Fu, S., Guo, Q., Shi, S., et al. (2009). Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 381(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.033>.
- Wu, P., Malkoch, M., Hunt, J. N., Vestberg, R., Kallgrad, E., Finn, M. G., et al. (2005). Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *Chemical Communications*, 46, 5775. <https://doi.org/10.1039/b512021g>.
- Wu, D.-Q., Lu, B., Chang, C., Chen, C.-S., Wang, T., Zhang, Y.-Y., et al. (2009). Galactosylated fluorescent labeled micelles as a liver targeting drug carrier. *Biomaterials*, 30(7), 1363–1371. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.027>.
- Wu, X., Chen, X., Hu, P., Hou, M., Dong, Y., & Wei, Y. (2018). Antifouling zwitterionic dextran micelles for efficient loading DOX. *Carbohydrate Polymers*, 191, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.020>.
- Zhang, Z., Chen, X., Gao, X., Yao, X., Chen, L., He, C., et al. (2015). Targeted dextran-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles for cancer treatments. *RSC Advances*, 5(24), 18593–18600. <https://doi.org/10.1039/C4RA15696J>.
- Zhang, J., Chen, K., Ding, Y., Xin, X., Li, W., Zhang, M., et al. (2016). Self-assembly of pH-responsive dextran-g-poly(lactide-co-glycolide)-g-histidine copolymer micelles for intracellular delivery of paclitaxel and its antitumor activity. *RSC Advances*, 6(28), 23693–23701. <https://doi.org/10.1039/C5RA22463B>.
- Zhang, Y. L., Dou, X. W., & Jin, T. (2010). Synthesis and self-assembly behavior of amphiphilic diblock copolymer dextran-block-poly(epsilon-caprolactone) (DEX-b-PCL) in aqueous media. *Express Polymer Letters*, 4(10), 599–610. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2010.75>.
- Zhang, X., Tong, B., Wu, T., & Wang, Y. (2016). Synthesis and characterization of a novel amphiphilic poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) graft copolymers. *Designed Monomers and Polymers*, 19(7), 661–668. <https://doi.org/10.1080/15685551.2016.1198882>.

SUPPORTING INFORMATION



Scheme S1. Synthesis of propargylated PCL by an anionic post-polymerization modification.

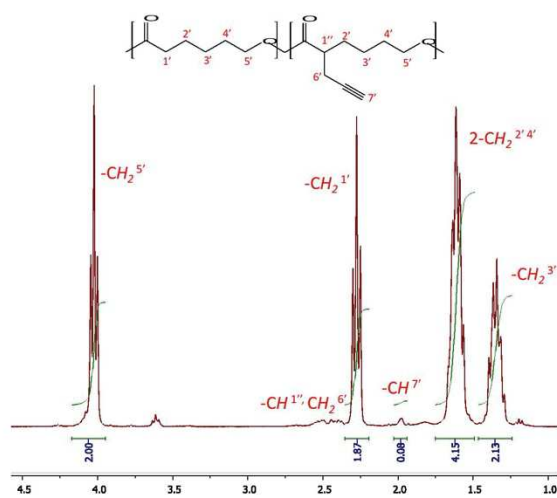
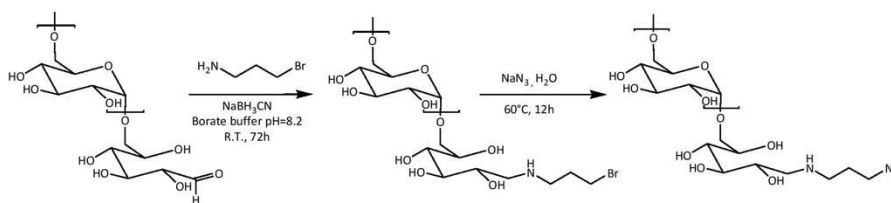


Fig. S1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PCL-yne (CDCl_3 , 300 MHz).



Scheme S2. Synthesis of azido-dextran.

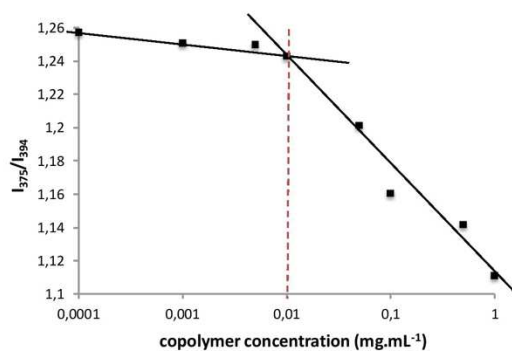


Fig. S2. Plot of the I_{375}/I_{394} intensity ratios of pyrene solutions as a function of PCL-*g*-dextran concentration in aqueous medium.

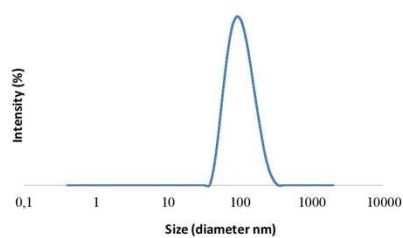


Fig. S3. DLS plot of PCL-*g*-Dex micelles.

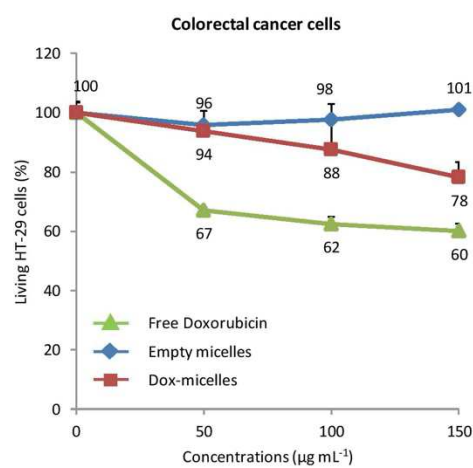


Fig. S4. Cytotoxicity study on HT-29 colorectal cancer cells. Cells were incubated 24 h with increasing concentrations of free Dox (from 0 to 7.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), empty micelles and Dox-loaded

micelles (DL=5.1%) (Dox-micelles) (from 0 to 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Results are means \pm standard deviations of two independent experiments performed in triplicate.

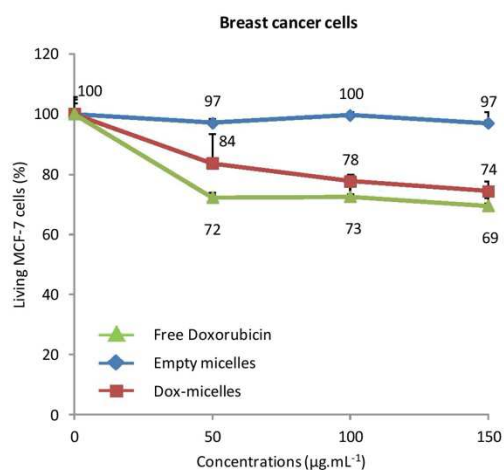


Fig S5. Cytotoxicity study on human breast cancer cells (MCF-7). Cells were incubated 24 h with increasing concentrations of free Dox (from 0 to 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), empty micelles and Dox-loaded micelles (DL=5.1%) (Dox-micelles) (from 0 to 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Results are means \pm standard deviations of two independent experiments performed in triplicate.

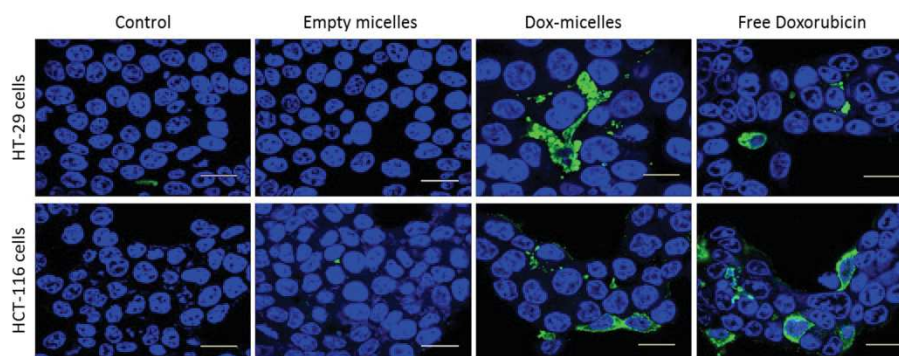


Fig. S6 : Immunofluorescent images of activated caspase-3 protein. HT-29 and HCT-116 cells were incubated for 24 h with empty micelles and Dox-loaded micelles at a concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Free Dox was also tested as a positive control (2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Fluorescence imaging indicating the activation of caspase 3 (green) was performed on fixed cells under a 488 nm wavelength with a Carl Zeiss Microscope. Scale bars represent 20 μm .