



HAL
open science

Caractérisation des nanoparticules siRNA-Squalène et étude de leur transport et internalisation

Marie Caillaud

► **To cite this version:**

Marie Caillaud. Caractérisation des nanoparticules siRNA-Squalène et étude de leur transport et internalisation. Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL058 . tel-04348737

HAL Id: tel-04348737

<https://theses.hal.science/tel-04348737>

Submitted on 17 Dec 2023

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.

Caractérisation des nanoparticules siRNA-Squalène et étude de leur transport et internalisation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie
(BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat: recherche clinique, innovation technologique, santé
publique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Maladies et hormones du système
nerveux, 94276 , Le Kremlin-Bicêtre, France

Réfèrent : Faculté de Médecine

**Thèse présentée et soutenue à Le Kremlin-Bicêtre,
le 16 décembre 2020, par**

Marie CAILLAUD

Composition du Jury

Didier DESMAELE Directeur de recherche, Université Paris-Saclay (UMR CNRS 812)	Président
Corinne CHANEAC Professeure, Sorbonne université (UMR 7574)	Rapporteur
Chantal PICHON Professeure, Université d'Orléans (UPR 4301 CNRS)	Rapporteur
Miryana HEMADI Maîtresse de conférences, Université de Paris (UMR 7086)	Examinatrice
Juliette VERGNAUD Maîtresse de conférences, Université Paris-Saclay (UMR CNRS 812)	Examinatrice
Liliane MASSADE Directrice de recherche, Université Paris Saclay (U1195 INSERM)	Directrice de thèse

Remerciements

Ce travail a été soutenu par une subvention publique de la région Ile de France dans le cadre du programme "ARDoC" (allocations doctorales sur domaine ciblés). Je tiens donc à remercier grandement la région d'avoir financé mon projet et de m'avoir donné la possibilité de poursuivre mes études.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Liliane Massade. Par sa disponibilité et son soutien quotidien, ce travail a pu être effectué dans les meilleures conditions. Un grand merci également pour son aide et ses conseils lors de la rédaction de ce manuscrit et au cours de la thèse.

Je voudrais remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Merci aux Pr Corinne Chanéac et Chantal Pichon qui ont accepté d'être rapporteurs et de me consacrer de leur temps et leur expérience pour examiner ce travail. Je remercie également les Dr Miryana Hémadi et Juliette Vergnaud pour leurs aides et conseils scientifiques au cours des comités de thèse. Un grand merci au Dr Didier Desmaële pour sa gentillesse, pour sa disponibilité, ses réponses à mes questions et demandes, merci également d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à l'École Doctorale Biosigne de m'avoir accordé la confiance de mener un doctorat de Sciences, un merci particulier à Laurent Surdi pour sa gentillesse et disponibilité pour répondre à mes questions administratives auxquelles il a certainement déjà répondu des centaines de fois.

Ce travail a été possible grâce à la collaboration avec différentes équipes. Je remercie tout d'abord le Pr Patrick Couvreur pour son aide et son avis scientifique lors des réunions du Labex Nanosaclay. Un grand merci aux Dr Frédéric Gobeaux et Fabienne Testard pour leur aide et expertise sur les techniques de diffusion aux petits angles. Je remercie de nouveau le Dr Miryana Hémadi de m'avoir ouvert les portes du laboratoire ITODYS et permis d'utiliser de nouvelles techniques, un grand merci à tous les membres de cette unité, en particulier à Christine et Roland pour m'avoir aidée dans l'adaptation.

La partie introductive de ce travail découle de ma thèse de pharmacie, j'en profite donc pour remercier de nouveau les membres du jury, le Pr Karine Andrieux et le Dr Morgane Renault pour avoir jugé ce travail l'année dernière. Un grand merci également au Dr Caroline Roques qui m'avait aidée lors de la rédaction.

J'ai eu la chance d'avoir connu deux laboratoires au cours de cette thèse. Tout d'abord, l'UMR 8203 à l'Institut Gustave Roussy, merci au Dr Luis Mir pour m'avoir accueillie et permis

d'y commencer ma thèse. Merci d'abord au Dr Giorgia Urbinati de m'avoir apporté sa connaissance et pour les discussions scientifiques. Un grand merci à Célia et Céline pour leur gentillesse, leur écoute et leur soutien indéfectible, je ne pouvais imaginer faire une thèse sans les supers collègues que vous avez été. Vous êtes devenues des véritables amies de la vie de tous les jours. Je remercie également Linda pour son extrême gentillesse, son rire et sa bonne humeur, tu fais partie avec Célia et Céline de mes plus belles rencontres amicales de de cette thèse. Un grand merci à Adeline, Amina, Florian, Jean-Rémi, Léna, Sandra et Thai-Hoa pour leur présence et bonne humeur quotidienne. Je remercie Isabelle pour sa gentillesse et son aide administrative.

Ensuite nous avons déménagé quelques kilomètres plus loin à l'UMR 1195, merci au Dr Michael Schumacher de nous avoir accueillies et avoir permis de continuer nos thèses dans les meilleures conditions. J'en profite pour re-remercier le Dr Liliane Massade d'avoir pris la décision de changer de domaine de recherche pour permettre au projet de « grandir », décision qui était un risque mais qui s'est avérée bénéfique : j'espère que la suite de la formulation siRNA-SQ sera aussi belle que ces deux dernières années semblent indiquer. Un grand merci à l'ensemble des membres de l'unité 1195 (1^{er} et 2^{ème} étage), de MAPREG et l'Institut Baulieu, pour leur aide à notre arrivée et leur gentillesse. Merci à l'équipe de la GC-MS pour leur expertise dans l'utilisation de l'HPLC et leur bonne humeur (merci à Philippe d'avoir pris de son temps pour relire cette thèse et pour ses remarques pertinentes). Merci à Narimène pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses phrases sorties de nulle part durant les déjeuners avec Natalie et Wassila.

Je remercie profondément les membres de l'équipe avec qui j'ai travaillé et aussi grâce auxquels ce travail a pu aboutir. A huge thank to Suzan for being a truly friend, I couldn't have imagined a better lab partner than you. Thanks for your smile that enjoyed a lab day and for the listening of my stress especially in these last moments, even if I am pretty sure that you often don't understand what I said but thanks for pretending it. Un grand merci à Julien pour ton amitié, tu es un élément indispensable à cette équipe par ton écoute et ta bonne humeur. Merci à Mévidette pour ton soutien, les fous rires déclenchés sans le faire exprès (épisode des clefs USB) mais surtout pour ta gentillesse et ton calme qui ont ensoleillé l'équipe, j'espère que nos chemins se recroiseront en Afrique du Sud, Egypte ou ailleurs. Merci à Alexandre pour ton aide sur ce travail de thèse, pour les discussions scientifiques que nous avons eues au cours de tes deux stages, pour ta gentillesse (encore merci d'avoir été mon taxi de retour de nombreuses fois) et pour ta bonne humeur quotidienne. Merci à Alice pour ton soutien durant les derniers mois et ton amitié. Merci également aux autres étudiants stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer : Théo, Jérôme, Cristina et Valentina. A toutes les personnes citées

précédemment, je voudrais de nouveau exprimer ma gratitude. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous tous et votre soutien.

Je voudrais remercier quelques personnes rencontrées au cours de mes précédents stages. Un grand merci au Docteur Virginie Beray-Berthat qui a été ma directrice de stage Master 1 et m'a donné envie de continuer dans la recherche. Merci également à Kahina pour son soutien et son écoute des derniers mois. I would like to thank Dr Shivangi Yadav who was my supervisor during my internship in Italy, thanks for your advice, your kindness, I missed our cappuccino morning and our Italian coffee break.

Enfin, je remercie mes proches et ma famille qui m'ont soutenue. Un grand merci à Cynthia, Mégane et Patricia pour leur amitié, gentillesse et bonne humeur. Merci à tous mes amis rencontrés au cours de mes études pour les moments de joie partagés au cours de ces trois dernières années. Merci à Alice et Aurélie, mes comparses de M2 et thèse (pour une fois c'est moi la première qui soutient), pour votre amitié, votre soutien et votre écoute.

Un grand merci à Aurélie et Florine d'avoir été toujours là et de m'avoir écoutée, merci pour tous ces moments de joie et de bonheur que nous avons partagés (et il y en a eu beaucoup), vous êtes des amies en or. Un grand merci également à celles qui me suivent depuis le lycée, Aurore, Charlotte et Charlotte, merci de m'avoir toujours poussée vers le haut (et les vrais le savent, ce n'est pas facile avec moi). Votre amitié m'est précieuse, merci pour votre soutien indéfectible (la preuve en a été apportée une fois de plus au cours de la rédaction de ce manuscrit).

Pour finir, je souhaiterais remercier ma famille proche et lointaine. A mes grands-parents paternels, l'ensemble de mes oncles, tantes, cousins et cousines, merci pour votre écoute au cours des différentes réunions de famille et pour m'avoir toujours soutenue dans mes différents choix. Un grand merci à Pierre-Arnaud pour son amitié, son écoute et sa présence au sein de la « coloc qui tangué » du confinement.

Je remercie mes parents pour m'avoir toujours fait confiance, m'avoir laissé suivre ma voie et pour leur soutien. Je le répète mais rien n'aurait été possible si je ne vous savais pas derrière moi. Merci à Mamie pour ton soutien et ton amour. Une pensée pour mon grand-père maternel, qui j'espère, aurait été fière de moi. Enfin simplement merci à mes sœurs et mon frère, Camille, Juliette et Paul, dont le soutien m'a été indispensable. Rien n'aurait été possible si je ne vous avais pas dans ma vie.

Pour conclure, merci encore à toutes les personnes rencontrées qui ont fait de ces années de thèse une expérience enrichissante et m'ont apporté à la fois personnellement et professionnellement.

Table des matières

Listes des figures	9
Listes des tableaux	12
Abréviations	13
Introduction générale	16
Partie 1 : L'ARN interférence et les siRNA	18
I. Les petits ARN interférents (siRNA)	19
A. Mécanisme d'action des siRNA	19
B. Construction de la séquence	21
C. Intérêt thérapeutique des siRNA	22
D. Avantages et inconvénients des siRNA	24
Partie 2 : Formulation galénique des siRNA	27
I. La vectorisation	27
A. Nanoparticules lipidiques	27
B. Nanoparticules polymériques	33
II. Modifications chimiques des siRNA	36
A. Conjugaison à un dérivé ose	36
B. Conjugaison à des dérivés lipidiques : le squalène	38
III. Article de synthèse décrivant les différentes approches d'encapsulation des siRNA et leurs développements précliniques et cliniques	43
Partie 3 : Interactions nanoparticules – protéines	57
I. Les interactions avec le sérum	57
A. Les protéines majoritaires du sérum	59
B. Effets des interactions nanoparticules – protéines	63
II. Techniques analytiques pour mettre en évidence les interactions sérum-nanomatériaux	66
A. Méthodes spectroscopiques	66
B. Méthodes chromatographiques	70
C. Méthodes physiques	72
D. Autres méthodes	72
E. Avantages et inconvénients des techniques analytiques	76
Partie 4 : Internalisation des nanoparticules	77
I. L'extravasation : la sortie de la circulation sanguine	77
II. Entrée cellulaire des nanoparticules	78
A. Les différentes voies d'endocytose	78
B. Entrée cellulaire par contact direct	81

Objectifs de la thèse	84
Matériels et méthodes	85
I. Les siRNA utilisés et leurs modifications chimiques	85
II. Synthèse des nanoparticules siRNA-SQ.....	86
A. Bioconjugaison du brin sens du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre	86
B. Purification du bioconjugué brin sens siRNA-SQ par RP-HPLC.....	87
C. Hybridation des bioconjugués siRNA-SQ.....	87
D. Nanoprécipitation des bioconjugués siRNA-SQ	88
III. Caractérisation des NPs siRNA-SQ.....	90
A. Détermination de la taille et de la charge.....	90
B. Observation des NPs siRNA-SQ au cryo-TEM	90
IV. Caractérisation des NPs siRNA-SQ par diffusion aux petits angles	91
A. Diffusion de neutrons aux petits angles (Small Angle Neutron Scattering ; SANS).....	91
B. Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering ; SAXS).....	91
C. Modélisation de la structure interne des NPs siRNA-SQ.....	92
V. Électrophorèse des NPs siRNA-SQ.....	92
VI. Spectroscopie de fluorescence.....	93
A. Capture de la fluorescence : BSA fluorescence quenching	93
B. Fluorescence d'état stable	94
VII. Dichroïsme circulaire du rayonnement synchrotron (Synchrotron radiation circular dichroism ; SRCD)	97
VIII. Calorimétrie par titrage isotherme (ITC)	98
IX. Lignées cellulaires et culture	98
X. Transfection cellulaire <i>in vitro</i>	98
A. Etude de l'effet de la charge sur l'internalisation <i>in vitro</i> des NPs siRNA-SQ	99
B. Rôle de la disponibilité de la surface cellulaire	100
C. Effet du LDLR et de la pré-incubation.....	100
XI. Extraction de l'ARNm et PCR quantitative en temps réel (Real Time PCR ; RT-qPCR)	102
XII. Western Blot.....	102
A. Etude de l'expression de LDLR dans différentes lignées cellulaires.....	102
B. Augmentation de l'expression du LDLR.....	103
XIII. Analyses statistiques	104
Résultats	106
I. Synthèse, bioconjugaison et nanoprécipitation des siRNA-SQ	106
A. Synthèse et bioconjugaison.....	106
B. Mise au point de la nanoprécipitation	108

II.	Etude de l'identité synthétique des nanoparticules siRNA-SQ	109
A.	Les NPs siRNA-SQ ont une taille ~200 nm et un potentiel ζ ~-35 mv.....	109
B.	Les NPs ont une forme sphérique en solution aqueuse.....	110
C.	Article de recherche	111
III.	Structure des NPs siRNA-SQ	124
A.	La structure de la double hélice n'est pas altérée par la chimie clic sans cuivre.	124
B.	Une nanoparticule siRNA-SQ encapsule des milliers de siRNA-SQ	124
IV.	Etude de l'identité biologique des nanoparticules siRNA-SQ	127
A.	Interactions avec le sérum	127
B.	Interactions avec l'albumine	130
C.	Interactions avec les lipoprotéines de basse densité.....	137
D.	Interaction du siRNA « nu » avec le sérum et ses composants.....	139
V.	Etude de l'internalisation des NPs siRNA-SQ.....	140
A.	La charge négative des NPs siRNA-SQ empêche leur internalisation <i>in vitro</i>	140
B.	La disponibilité de la surface cellulaire semble avoir son importance dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ.....	142
C.	Le récepteur des LDL pourrait jouer un rôle dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ.....	144
	Discussion	148
	Conclusion générale et perspectives	157
	Références numériques	159
	Références bibliographiques	160
	Annexes	172
I.	Etude <i>in vitro</i> des NPs siRNA-SQ avec le brin espaceur TEG	172

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique des travaux de la thèse

Figure 2 : Chronologie de la découverte de l'ARN interférence et de ses effecteurs

Figure 3 : Voie de signalisation de l'ARN interférence

Figure 4 : Formules chimiques de quelques différents lipides composant les lipoplexes

Figure 5 : Formule chimique du DLin-DMA

Figure 6 : Les deux phases possibles d'un lipide

Figure 7 : Voie thérapeutique du médicament Onpattro®

Figure 8 : Formules chimiques du monomère de β -cyclodextrine (a), du cyclodextrine polycationique (CDP) modifié et polymérisé (b) et du cyclodextrine polycationique grâce à un groupement chimique imidazole et polymérisé (CDPim)

Figure 9 : Représentation schématique de la nanoformulation CALAA-01.

Figure 10 : Formule chimique de bioconjugué siRNA- tri N-acétyl-galactosamine développé par Alnylam Pharmaceuticals

Figure 11 : Synthèse chimique du cholestérol

Figure 12 : Conjugaison du siRNA RET/PTC1 au SQ *via* une addition de Michaël

Figure 13 : La cycloaddition de Huisgen, aussi appelé la chimie click sans cuivre, pour conjuguer le brin sens du siRNA au SQ

Figure 14 : Représentation de l'interface bio-nano et de ses composantes

Figure 15 : Représentation schématique de la « protein corona »

Figure 16 : Les différentes lipoprotéines présentes dans le sang et leurs caractéristiques.

Figure 17 : Les deux identités des nanoparticules avant et après injection *in vivo*

Figure 18 : Spectres de dichroïsme circulaire de polypeptides et de protéines avec des structures secondaires représentatives

Figure 19 : La diffusion dynamique de la lumière

Figure 20 : Représentation schématique des couches ioniques autour d'une nanoparticule anionique

Figure 21 : La calorimétrie isotherme

Figure 22 : Les principaux mécanismes d'endocytose

Figure 23 : Représentation schématique des voies d'entrée cellulaire direct des NPs.

Figure 24 : Couplage chimique du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre

Figure 25 : Hybridation du bioconjugué brin sens siRNA avec le brin antisens complémentaire

Figure 26 : Représentation schématique de la nanoprécipitation inverse utilisée pour former les nanoparticules siRNA-SQ

Figure 27 : De la bioconjugaison à la nanoprécipitation des NPs siRNA-SQ.

Figure 28 : Représentation schématique de l'ajout de SQ⁺ sur les NPs siRNA-SQ

Figure 29 : Modifications chimiques et bioconjugaison du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre.

Figure 30 : La conjugaison au SQ augmente la lipophilie du brin sens des siRNA.

Figure 31 : Caractéristiques physico-chimiques des NPs RE/PTC1-SQ et PMP22-SQ

Figure 32 : Les NPs siRNA-SQ ont une forme sphérique

Figure 33 : La conformation du siRNA n'est pas modifiée par la synthèse chimique

Figure 34 : Caractérisation structurelle des NPs siRNA-SQ

Figure 35 : Les NPs siRNA-SQ interagissent avec des composants du sérum.

Figure 36 : Les NPs siRNA-SQ sont stables dans le sérum.

Figure 37 : Les NPs siRNA-SQ conservent leur structure dans le sérum.

Figure 38 : Etude de l'interaction des NPs siRNA-SQ avec la BSA.

Figure 39 : La fluorescence émise par la BSA diminue en présence des NPs siRNA-SQ

Figure 40 : Spectroscopie de fluorescence de la BSA en présence des NPs siRNA-SQ.

Figure 41 : Calorimétrie isotherme

Figure 42 : Les NPs siRNA-SQ sont stables en présence de BSA.

Figure 43 : Les NPs siRNA-SQ interagissent avec les LDL.

Figure 44 : Le siRNA « nu » n'interagit pas avec le sérum total, l'albumine et les LDL.

Figure 45 : L'inversion de la charge favorise l'internalisation des NPs siRNA-SQ.

Figure 46 : Une surface cellulaire plus disponible permet d'internaliser les NPs siRNA -SQ dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules non tumorales

Figure 47 : Western blot représentatif de l'expression protéique du récepteur LDL dans les plusieurs lignées cellulaires.

Figure 48 : Le sérum et les LDL ne favorisent pas l'internalisation cellulaire des NPs siRNA-SQ.

Figure 49 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des travaux de la thèse

Listes des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques principales des différentes molécules de l'ARNi

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des siRNA pour une utilisation thérapeutique

Tableau 3 : Résumé des différences entre vectorisation et modification chimique avec leurs avantages/inconvénients

Tableau 4 : Présentation des quatre protéines plasmatiques les plus abondantes

Tableau 5 : Les différents méthodes spectroscopiques

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de différentes techniques analytiques utilisées pour caractériser les interactions nanoparticules – protéines sériques

Tableau 7 : Séquence des siRNA utilisés

Tableau 8 : Optimisation de la nanopréciptation.

Tableau 9 : Concentration des échantillons siRNA utilisés pour l'étude par dichroïsme circulaire

Tableau 10 : Séquence des primers reverse (R) et forward (F) des gènes RET/PTC1, PMP22 et GAPDH

Tableau 11 : Optimisation de la méthode de nanopréciptation

Tableau 12 : Constantes de la capture de la fluorescence de la BSA par les NPs siRNA-SQ à une température (25°C)

Tableau 13 : Inversion de la charge des NPs siRNA-SQ après ajout du SQ cationique.

Tableau 14 : Comparaison des paramètres physico-chimiques des nanoformulations squalénisées

Abréviations

Ad-SQ : adénosine-squalène
Apo : apolipoprotéine
ARN : acide ribonucléique
ARNdb : ARN double brin
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
aTTR : amylose héréditaire à transthyrétine
BC : bioconjugué
BHE : barrière hémato-encéphalique
BSA : bovine serum albumin
C6 : N-(hexaméthylényl)-6-oxohexanamide
CDP : cyclodextrine polycationique
CDPim : cyclodextrine polycationique imidazole
CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CMT : maladie de Charcot-Marie-Tooth
cryo-TEM : cryo-microscope à transmission électronique
DBCO : dibenzocyclooctyne
DC : dichroïsme circulaire
DC-cholesterol : 3 β -[N-(N',N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholestérol
Dlin-DMA : 1,2-dilinoléoyloxy-N,N-diméthyl-3-aminopropane
DLS : dynamic light scattering
DOPE : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido) ethyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTAP : 1,2-dioleoyloxy-3-triméthylammoniumpropane
DSPC : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DSPE-PEG2000 : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)-2000]
EMA : European Medicines Agency
EPR : enhanced permeability and retention effect
EtOH : éthanol
FBS : fetal bovine serum
FDA : Food and Drug Administration
GalNAc : N-AcétyleGalactosamine
HDL : high density lipoprotein
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IR : infrarouge
IRTF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ITC : isothermal calorimetry
ITODYS : Interface Traitements Organisation et Dynamique des Systèmes
IV : intraveineuse
LDL : low density lipoprotein
LDLR : récepteur des LDL
LIONS : Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire
LPs : lipoprotéines
miRNA : micro RNA
MPS : système mononucléaire phagocytaire
MS : spectrométrie de masse
NP(s) : nanoparticule(s)

OF : oncogène de fusion
PBS : tampon phosphate salin
PC : protein corona
PDI : index de polydispersité
PEG : polyéthylène glycol
PEG2000-C-DMG : 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000
piRNA : piwi-interacting RNA
PMP22 : peripheral myelin protein 22
RET : rearranged during transfection
RISC : RNA-induced silencing complex
RISC : RNA-induced silencing complex
RMN : résonance magnétique nucléaire
RRM2 : Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel
SANS : small angle neutron scattering
SAXS : small angle X-ray scattering
SC : sous-cutanée
SEM : standard Error of the Mean
siRNA : small interfering RNA
SNALP : stable nucleic acid lipid particle
SNP : système nerveux périphérique
SQ : squalène
TEAA : acétate de triéthylamine
TEM : microscope à transmission électronique
THF : tétrahydrofurane
TLR - toll-like receptor
TTR : transthyrétine
UV : ultraviolet
VLDL : very low density lipoprotein
WB : western blot

Introduction générale

En 1998, Fire et Mello ont mis en évidence que des petits ARN doubles brins, les siRNA, étaient capables d'inhiber spécifiquement et de façon transitoire l'expression d'un gène cible en dégradant son ARNm (Fire, Xu et al. 1998). Cette découverte, qui a été décorée du prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2006, a rapidement intéressé le monde académique et pharmaceutique à la recherche de thérapies ciblées pour des pathologies. Néanmoins, l'utilisation de ce mécanisme naturel comporte un inconvénient majeur : la délivrance du siRNA aux cellules ciblées. En effet, du fait de sa nature oligonucléotidique, le siRNA rencontre de nombreux problèmes de stabilité et d'internalisation cellulaire. Pour les pallier, les chercheurs ont développé des moyens physiques et chimiques pour modifier ses paramètres physico-chimiques et permettre aux siRNA d'exercer leur effet inhibiteur dans le cytoplasme des cellules cibles (voir article de synthèse, Caillaud, El Madani et al., 2020). Vingt ans après leur découverte, le premier siRNA, l'Onpattro®, a été approuvé pour le traitement de l'amylose héréditaire à transthyrétine (Adams, Gonzalez-Duarte et al. 2018).

Au laboratoire, il a été développé en collaboration avec l'équipe du Pr Couvreur, une approche de couplage chimique innovante par bioconjugaison du siRNA à un polyterpène précurseur du cholestérol, le squalène (SQ). Le SQ a été fonctionnalisé par ajout d'une malèimide sur sa fonction carboxylique entraîne la formation d'un bioconjugué siRNA-SQ par addition de Michael. Après nanopréciptation, les nanoparticules (NPs) formées sont stables, mesurent 170 nm de diamètre et sont injectables par voie intraveineuse (IV). Les NPs siRNA-SQ ont montré leur efficacité dans les cancers à oncogène de fusion (OF), qui sont la conséquence de réarrangements chromosomiques et sont impliqués dans l'initiation et la progression de plus de 20% des cancers (Latysheva and Babu 2016). Leurs expressions uniques dans les cellules tumorales en font une cible de choix pour une thérapie ciblée par siRNA. La conjugaison du siRNA au SQ a permis d'inhiber la croissance tumorale, corrélée à une inhibition de l'expression des gènes ciblés, dans différents modèles de cancer à OF : le carcinome papillaire de la thyroïde (avec les siRNA anti-RET/PTC1 et anti-RET/PTC3) et le cancer de la prostate (siRNA anti-TMPRSS2-ERG) (Raouane, Desmaele et al. 2011, Ali, Maksimenko et al. 2014, Urbinati, Ali et al. 2015, Urbinati, de Waziers et al. 2016). Cependant, cette méthode de bioconjugaison est fastidieuse et entraîne une perte de 65% du principe actif la rendant inutilisable pour des futures applications cliniques.

Pour améliorer le rendement de la réaction et simplifier la méthode de synthèse, j'ai contribué à **optimiser la méthode de bioconjugaison par « chimie clic sans cuivre »** puis à **caractériser les propriétés physico-chimiques des NPs résultantes** de cette nouvelle

méthode de vectorisation des siRNA (1 sur la figure 1), ce qui a amené à la publication d'un article en 2018 (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018).

Cette approche a été utilisée pour traiter une pathologie neurodégénérative périphérique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth qui est la neuropathie périphérique héréditaire la plus fréquente. Le sous-type 1A (CMT1A) est dû à une duplication sur le chromosome 17 entraînant une augmentation de l'expression de la glycoprotéine PMP22 responsable de la myélinisation au niveau des cellules de Schwann (Boutary, Echaniz-Laguna et al. 2020). L'injection intraveineuse des NPs siRNA PMP22-SQ a permis de normaliser l'activité motrice et musculaire dans un modèle animal de CMT1A (thèse de sciences du Dr Suzan Boutary soutenue en décembre 2019). Cette efficacité thérapeutique est corrélée avec une normalisation de l'expression de PMP22, confirmant l'internalisation des NPs siRNA PMP22-SQ dans les cellules de Schwann (Boutary, Caillaud et al., 2020 soumis).

L'ensemble des études effectuées au laboratoire montre l'efficacité antinéoplasique ou myélinisante des NPs siRNA-SQ *in vivo*. Cependant, aucune activité inhibitrice n'a été observée *in vitro*, sans utilisation d'un agent transfectant. Je me suis intéressée à comprendre les différences d'efficacité observées entre les **études *in vitro* et *in vivo*** en **étudiant les mécanismes de transport des NPs dans la circulation sanguine *via* les interactions avec le sérum et ses principaux composants** (2 sur la figure 1) et en **déterminant les facteurs limitant l'internalisation *in vitro* des NPs siRNA-SQ** (3 sur la figure 1).

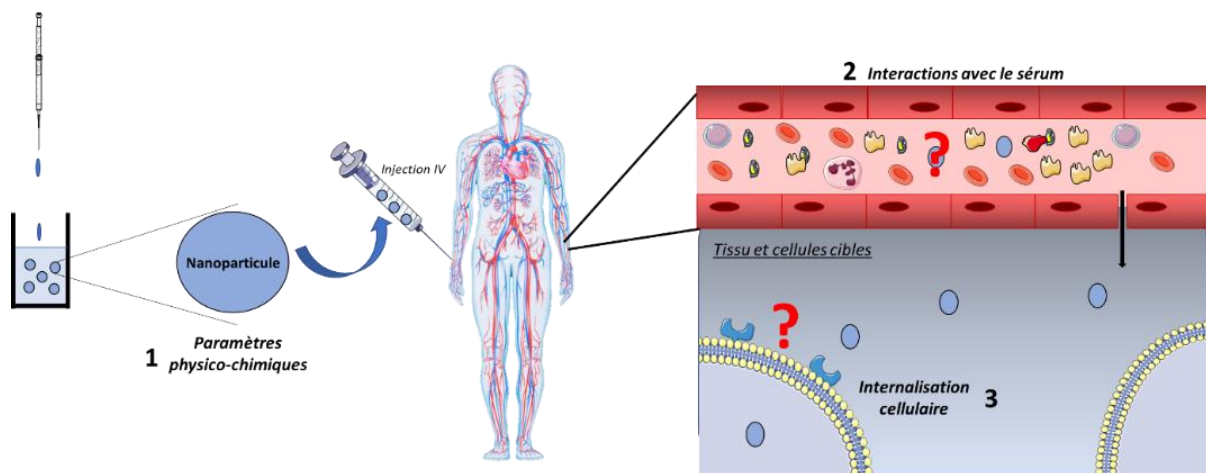


Figure 1 : Représentation schématique de notre hypothèse de travail de la thèse.

Dans ce manuscrit, nous présentons les connaissances actuelles sur le sujet, les résultats obtenus seront intégrés à la suite suivis par leurs analyses dans la discussion et d'une conclusion qui ouvrira les perspectives.

Partie 1 : L'ARN interférence et les siRNA

L'interférence par l'ARN (ARNi) est un processus cellulaire permettant l'inhibition de l'expression d'un gène cible par reconnaissance de sa séquence d'ARNm. L'article fondateur a été publié en 1998 dans Nature (Fire, Xu et al. 1998) mais au début des années 90, différentes équipes de recherche avaient commencé à mettre en évidence ce phénomène dont la chronologie de la découverte est résumée sur la figure 2.

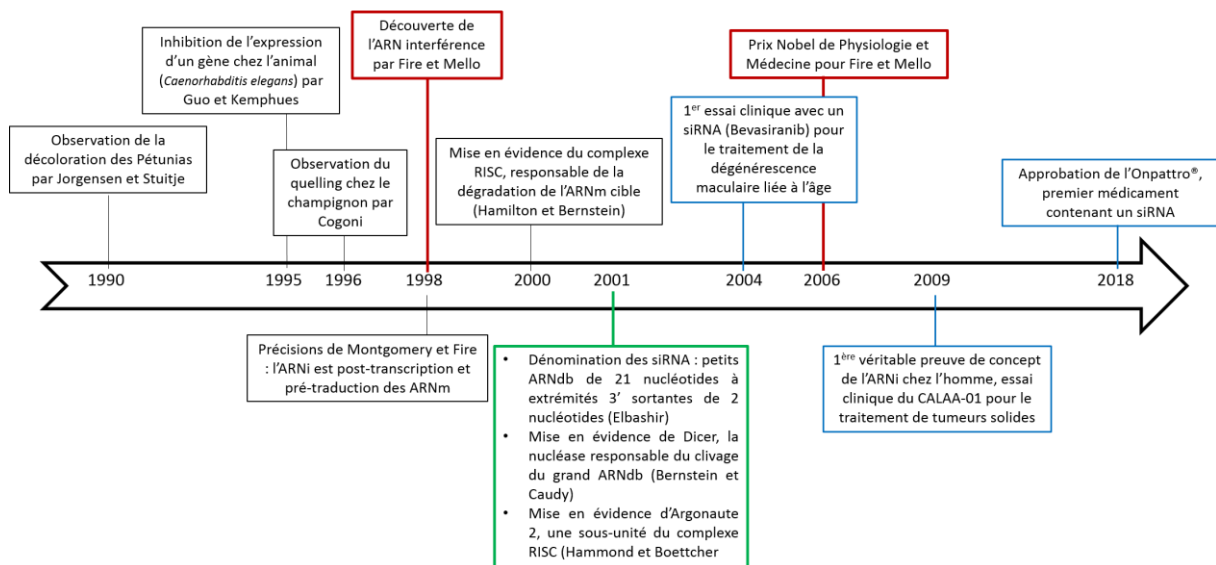


Figure 2 : Chronologie de la découverte de l'ARN interférence et de ses effecteurs

Une partie de ce manuscrit a été rédigée dans le cadre de de ma thèse de Pharmacie, « **De la découverte de l'ARN interférence au développement clinique des siRNA** », soutenue et obtenue le 17 décembre 2019 avec les félicitations du jury.

I. Les petits ARN interférents (siRNA)

A. Mécanisme d'action des siRNA

La voie des small interfering RNA ou siRNA est historiquement la première voie de l'ARNi découverte. Fire et Mello ont montré que des petits ARN double brins exogènes étaient capables d'inhiber l'expression d'un gène cible (Fire, Xu et al. 1998). Dernièrement, il a été décrit que les siRNA pouvaient être issus de la transcription de certains loci génomiques aussi et donc avoir une origine endogène.

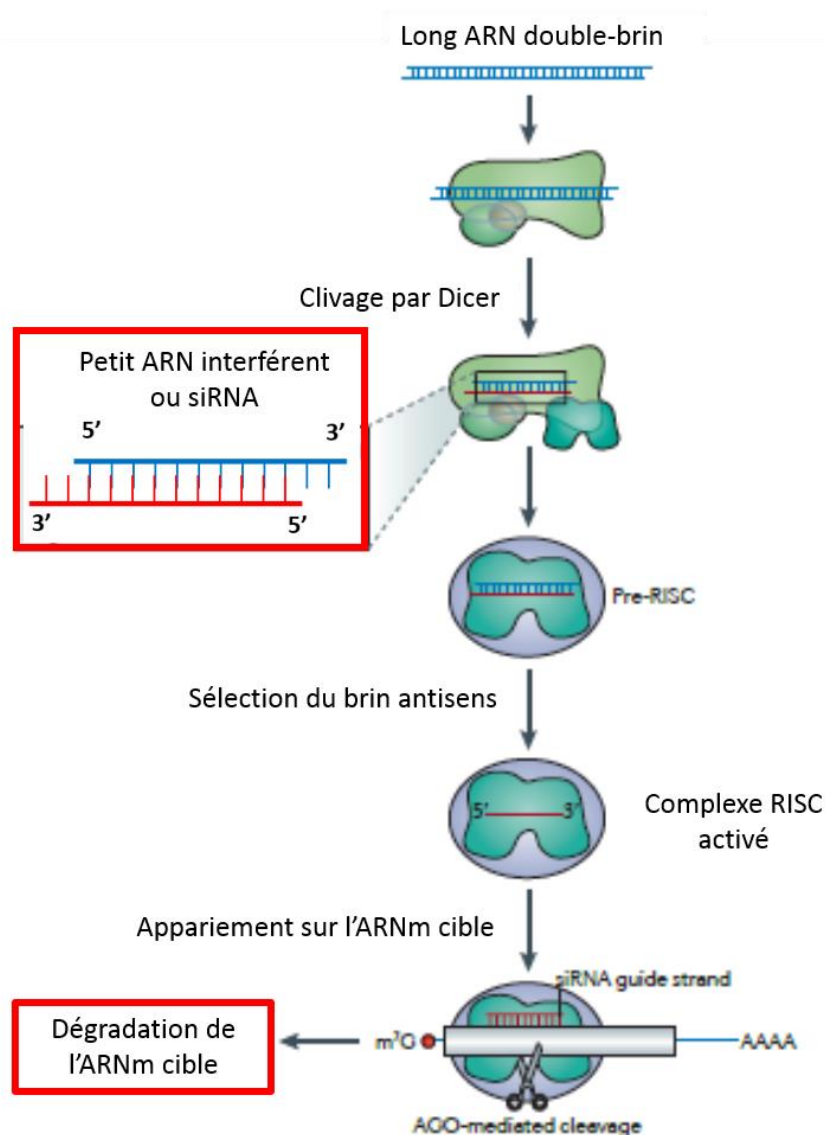


Figure 3 : Voie de signalisation de l'ARN interférence. Adapté d'après Davidson and McCray, (Davidson and McCray 2011)

Le mécanisme des siRNA synthétiques et endogènes est le suivant (Figure 3). Si ces ARN doubles brins ont une taille supérieure à 21 nucléotides, ils sont pris en charge par la nucléase Dicer, qui les clive en petits ARN double brin de 19 à 21 nucléotides avec des extrémités 3'-cohésives (2 nucléotides sortants). Le siRNA à proprement parlé, est ensuite pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), qui sépare les 2 brins. Le brin antisens, chargé dans une sous-unité de RISC, Ago2, s'apparie avec un ARNm dont il est totalement complémentaire, conduisant à la dégradation de ce dernier et donc à l'inhibition de l'expression du gène ciblé (Lam, Chow et al. 2015, Tatiparti, Sau et al. 2017). Le clivage de l'ARNm cible se produit au niveau des 10^{èmes} et 11^{èmes} nucléotides en 5'- du siRNA. Une fois cette première coupure effectuée, l'ARNm est libéré du complexe et dégradé par d'autres exonucléases dans le cytoplasme. Le complexe RISC activé (avec brin antisens inclus) peut dégrader d'autres ARNm ciblés, ce qui permet de réduire au silence un gène de façon transitoire pendant 3-7 jours dans les cellules à division rapide et pendant plusieurs semaines dans les cellules à division lente (Whitehead, Langer et al. 2009, Xue, Liu et al. 2014).

Les cibles sont différentes en fonction de l'origine du siRNA. Dans le cas de siRNA exogènes utilisés en recherche ou en thérapeutique, la cible est le transcrit d'un gène spécifique dont les scientifiques souhaitent étudier le rôle (par un knockdown) ou inhiber pour traiter une maladie. Les siRNA endogènes ciblent principalement l'ARN de rétrotransposons, qui pourraient s'insérer dans le génome et créer une instabilité génétique (Husson, Pilot et al. 2011).

En dehors des siRNA, il existe d'autres molécules de l'ARN interférence, les miRNA et piRNA dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques principales des différentes molécules de l'ARNi

	siRNA	miRNA	piRNA
Nature et origine	ARN double brin exogène (majoritaire) ou issus de transcrits de transposons	ARN double brin issus de transcrits du génome	ARN simple brin issus de transcrits de transposons
Taille	19 à 21 nucléotides	19 à 25 nucléotides	24 à 35 nucléotides
Expression	Endogène : ovocytes et cellules embryonnaires souches	Ubiquitaire	Cellules germinales
Effets biologiques	Appariement parfait du brin guide avec l'ARNm cible → dégradation de l'ARNm et inhibition de l'expression du gène cible	Appariement imparfait avec la région 3'UTR des ARNm → répression de la traduction	Extinction des transposons par dégradation de leurs ARN → protection de l'intégrité génomique des lignées germinales

B. Construction de la séquence

Comme décrit précédemment, un siRNA est un ARN double brin composé de 19 à 21 nucléotides à bouts cohésifs en 3' dont le brin antisens, également dénommé brin guide, est complémentaire de la séquence d'ARNm d'un gène cible.

Pour construire la séquence du siRNA, il existe quelques règles essentielles à prendre en compte. La séquence du siRNA doit être évidemment totalement complémentaire du transcrit cible dans le but d'avoir une molécule biologique efficace et d'éviter un effet off-target (inhibition de l'expression d'un gène non ciblé). Reynolds *et al.*, a décrit 8 critères à suivre pour construire un siRNA efficace dont un taux de bases G/C compris entre 30 et 52% pour garantir une bonne stabilité thermodynamique (Reynolds, Leake *et al.* 2004). La sélection du brin guide à l'intérieur de RISC ne se fait pas au hasard. En effet, le complexe garde préférentiellement le brin qui a l'instabilité thermodynamique la plus importante en 5' - (avec un fort taux A/U). De plus, ce brin doit avoir en position 1 du côté 5' - la base U ou A, contrairement au brin sens où une base G ou C est préférée pour minimiser le risque d'être chargé dans RISC (Lam, Chow *et al.* 2015). Enfin pour limiter la reconnaissance dans le sang par les nucléases, Tuschl préconise de remplacer les 2 nucléotides sortants en 3' - par des désoxynucléotides (Tuschl 2002).

C. Intérêt thérapeutique des siRNA

Les siRNA sont spécifiques de la séquence d'ARNm d'un gène cible. L'inhiber pourrait permettre de déterminer sa fonction dans la cellule, que cela soit dans un but de recherche fondamentale ou dans le cadre d'une utilisation en thérapeutique. En effet, un certain nombre de maladies humaines - cancer, maladie métabolique, infections virales – est dû au dérèglement d'un ou plusieurs gènes et dont l'inhibition serait bénéfique pour stopper ou normaliser la progression de la pathologie.

a) Cancers

Les cancers sont généralement dus à des mutations sur des gènes responsables de la croissance cellulaire, la prolifération ou l'apoptose (Tseng, Mozumdar et al. 2009, Jain, Pathak et al. 2018).

Dans le domaine de la recherche de thérapies anticancéreuses, les oncogènes de fusion (OF) sont intéressants par leur présence unique dans les cellules tumorales. Ils sont la conséquence de réarrangements chromosomiques, qui entraînent le rapprochement illégitime de deux gènes. Les OF sont impliqués dans l'initiation et la progression de plus de 20% des cancers (Latysheva and Babu 2016). Les plus connus sont retrouvés dans la leucémie myéloïde chronique (fusion des gènes *BCR* et *ABL*) (Rowley 1973), le sarcome d'Ewing (fusion des gènes *EWS* et *Fli1*) (Delattre, Zucman et al. 1992), le cancer thyroïdien papillaire (fusion des gènes *RET* et *PTC*) (Romei and Elisei 2012) ou encore le cancer de la prostate (fusion des gènes *TMPRSS2* et *ERG*) (Tomlins, Rhodes et al. 2005).

La translocation t(9 ;22) *BCR-ABL* est retrouvée dans 95% des cas de leucémie myéloïde chronique et entraîne l'expression de la protéine chimérique BCR-ABL à activité tyrosine kinase. Une thérapie inhibant cette protéine de fusion, l'Imatinib (Glivec®), a été mise au point et est aujourd'hui le traitement de référence pour ce type de leucémie puisque 90% des patients entrent en rémission avec ce traitement (Kujak and Kolesar 2016).

Le sarcome d'Ewing est une tumeur rare et agressive des os, qui survient chez l'enfant ou le jeune adulte. La translocation t(11;22)(q24;q12) est retrouvée dans 85% des biopsies et entraîne l'expression du facteur de transcription EWS-Fli. Il n'existe pas de traitement curatif pour ce sarcome, le traitement standard comprend différentes molécules de chimiothérapie qui augmentent la survie pour les patients non métastasés (Yu, Ge et al. 2017). Un siRNA ciblant cet OF a été encapsulé dans une nanoparticule polymérique fonctionnalisée. La

formulation a montré une forte activité antitumorale *in vivo*, sans observation de toxicité ou de stimulation du système immunitaire (Hu-Lieskovan, Heidel et al. 2005).

L'OF *RET/PTC* est retrouvé dans plus de la moitié des carcinomes papillaires de la thyroïde. Le rapprochement entre le gène *RET* (*rearranged during transfection*) et plusieurs autres gènes (*H4*, *PRKAR1A*, *ELE1*) est dû à une inversion sur le chromosome 10 (inv10q). Elle induit l'expression d'une protéine chimérique comprenant une partie de RET tronquée, ce qui provoque une localisation cytosolique de la protéine et l'activation constitutive de sa fonction tyrosine kinase (Romei, Ciampi et al. 2016). L'administration intraveineuse d'un siRNA ciblant l'oncogène de fusion *RET/PTC1* a permis d'inhiber la croissance tumorale sans induire de toxicité chez la souris athymique (Raouane, Desmaele et al. 2011).

L'OF *TMPRSS2-ERG* a été découvert dans 50% des biopsies de cancers prostatiques. Le réarrangement chromosomique à l'origine est une délétion sur le chromosome 21 del(21q22), qui entraîne la fusion entre le promoteur en 5'- du gène *TMPRSS2* et un gène de la famille *ETS* (E-twenty six) comme *ERG* (ETS-related gene). La conséquence est l'expression du facteur de transcription ERG, qui va induire l'expression de gènes jouant sur la prolifération et progression tumorale. Sa présence favorise aussi l'invasion en modulant l'expression des métalloprotéinases (MMP-9 notamment) et est également responsable de l'expression du proto-oncogène, *c-Myc*, activant le processus de cancérisation des cellules prostatiques (Sun, Dobi et al. 2008, Tomlins, Laxman et al. 2008).

La découverte de ces oncogènes de fusion a été révolutionnaire du point de vue de la recherche fondamentale et thérapeutique. En effet, le fait qu'ils soient uniquement exprimés dans les cellules cancéreuses ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de cancer à OF pour une thérapie ciblée par siRNA.

b) Neuropathie périphérique héréditaire

Certaines maladies héréditaires sont causées par la mutation d'un gène, qui peut avoir des importantes conséquences. Les dysfonctionnements du système nerveux périphérique (SNP) sont moins connus que ceux du système central mais concerne 2,5% de la population mondiale (Boutary, Echaniz-Laguna et al. 2020). Par eux, se distingue la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), qui est la neuropathie héréditaire périphérique la plus fréquente au monde. Le sous-type 1A est le plus fréquent et est dû à une duplication interstitielle au niveau du bras court 17p12, entraînant la surexpression du gène codant pour la protéine de myéline

périphérique de 22 kDa (PMP22). Cette protéine a un rôle essentiel dans la compaction de la gaine de myéline du SNP et permet de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans les cellules de Schwann (Li, Parker et al. 2013, Boutary, Echaniz-Laguna et al. 2020). Toute perturbation du gène PMP22 entraîne ainsi une désorganisation de la gaine de myéline et touche à l'intégrité axonale du nerf, qui se reflète par un ralentissement de la vitesse de conduction nerveuse, provoquant une neuropathie et une atrophie musculaire (Li, Parker et al. 2013). Réduire l'expression de PMP22 a depuis longtemps été une piste de recherche avec le test de nombreuses molécules actives comme l'acide ascorbique (vitamine C) ou l'onapristone. Récemment, une combinaison de trois médicaments (naltrexone, baclofène et D-sorbitol), le PXT3003, a montré des effets thérapeutiques intéressants mais l'étude clinique est toujours en cours (Chumakov, Milet et al. 2014). Ainsi pour le moment, aucun médicament curatif n'a été mis sur le marché, les seuls traitements proposés aux patients sont symptomatiques (physiothérapie, port de prothèses, chirurgie orthopédique).

L'approche thérapeutique par ARNi ouvre un nouvel espoir pour les patients atteints de CMT. Lee et ses collègues ont développé un siRNA ciblant une mutation spécifique Leu¹⁶Pro du gène PMP22, responsable de la neuropathie CMT1E. L'encapsulation dans une nanoparticule et l'injection intrapéritonéale de cette formulation ont permis d'améliorer les fonctions motrices et musculaires dans un modèle animal spécifique (Trembler-J mice) corrélée avec une remyélinisation des nerfs périphériques (Lee, Chang et al. 2017).

Pour ces deux pathologies, le challenge le plus important a été de développer des moyens d'amener le siRNA intact aux cellules cibles, car cette molécule oligonucléotidique comporte beaucoup d'avantages avec quelques inconvénients.

D. Avantages et inconvénients des siRNA

Contrairement aux petites molécules actives, le monde des siRNA n'a pas de limite de cibles. En effet, ce qui était considéré comme « undruggable » (cible pathologique connue mais sans option thérapeutique) peut l'être puisque le siRNA va jouer au niveau de la transcription et n'interagit pas avec l'ADN. Sa principale limite d'un point de vue efficacité est que cette molécule biologique ne peut qu'inhiber ou normaliser l'expression d'un gène et ne sera donc d'aucune aide si le but est de l'activer (Bumcrot, Manoharan et al. 2006, Lam, Chow et al. 2015).

Lors de la découverte de l'ARNi, les chercheurs ont observé que les siRNA étaient efficaces à faible dose, contrairement à l'injection du brin antisens seul (Fire, Xu et al. 1998).

Grâce au développement de logiciels de construction de siRNA, ce dernier est synthétisé avec une grande spécificité pour seulement le transcrite cible dont les scientifiques souhaitent inhiber l'expression. Cette efficacité et la spécificité à faible dose sont des avantages qui ont permis la recherche et le développement rapides de thérapies d'ARNi. De plus, la synthèse de siRNA est facile et à faible coût, en comparaison de la production de thérapies à base de protéines ou d'anticorps (Bumcrot, Manoharan et al. 2006).

Malheureusement, certaines caractéristiques physico-chimiques de ces molécules biologiques limitent leur utilisation. En effet, les siRNA sont des molécules oligonucléotidiques d'une taille inférieure à 7nm et peuvent donc être éliminés par filtration glomérulaire *in vivo*. De plus, ce sont des molécules « fragiles », rapidement dégradées dans le sang par les nucléases sériques. Il est estimé que la demi-vie plasmatique d'un siRNA est de moins de 15 min après dégradation par les RNases du sérum et élimination par filtration glomérulaire (Thompson, Kornbrust et al. 2012, Kanasty, Dorkin et al. 2013, Ozpolat, Sood et al. 2014). Ils peuvent également stimuler le système immunitaire en activant les TLR en fonction de la séquence. Plusieurs motifs de séquences immuno-stimulatrices ont même été décrits. En général, une séquence riche en U est en corrélation avec l'activation TLR-7 et 8, qui sont des récepteurs transmembranaires présents dans les endosomes des cellules dendritiques et monocytaires (Lam, Chow et al. 2015).

Pour rappel, les siRNA sont des oligonucléotides doubles brins de 19 à 21 paires de nucléotides, soit un poids final moyen de 13kDa, **ce qui en fait une macromolécule hydrophile et poly-anionique empêchant ainsi une bonne internalisation à l'intérieur des cellules** (Ozpolat, Sood et al. 2014).

Le tableau ci-dessous (tableau 2) résume les caractéristiques physico-chimiques des siRNA en les différenciant en avantage ou inconvénient pour une utilisation thérapeutique chez l'homme.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des siRNA pour une utilisation thérapeutique

Avantages	Inconvénients
Mécanisme naturel d'inhibition de l'expression d'un gène	Dégradation par les RNase
Spécifique de la séquence d'ARNm d'un gène cible	Clairance rénale rapide
Efficace à de faibles concentrations	Grosse molécule hydrophile et polyanionique
Pas de restriction de choix de cible	Effet off-target

Pour surmonter ces inconvénients, le siRNA doit être protégé afin de permettre son transport du site d'injection au tissu cible. Le principal challenge est de parvenir à mettre au point des systèmes qui vont améliorer la stabilité, la biodistribution et l'internalisation des acides nucléiques. Ce système devra être non toxique, biocompatible, biodégradable et non immunostimulant. Cependant, chaque moyen de protection a sa propre toxicité, sa propre biodistribution tissulaire et son internalisation en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques (Ozpolat, Sood et al. 2014).

Les vecteurs des siRNA peuvent être classés en deux catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Le premier groupe est principalement utilisé pour l'administration de plasmides d'ADN, moins pour le siRNA synthétique. Le principal avantage du virus en tant que système d'administration est sa grande efficacité d'infection, mais le risque de mutagénèse insertionnelle et le risque de stimulation immunitaire ne permettent pas une utilisation clinique sûre (Thomas, Ehrhardt et al. 2003). Pour ces raisons, d'autres moyens de protéger et de transporter le siRNA ont été étudiés (Deng, Wang et al. 2014).

Nous avons décidé de différencier en deux sous-catégories les moyens d'administrer les siRNA :

- La vectorisation utilisant pour vecteurs des lipides ou polymères cationiques
- Les modifications chimiques du siRNA par conjugaison à une molécule

Partie 2 : Formulation galénique des siRNA

Au cours de cette partie, différentes méthodes de protection et d'amélioration des propriétés physico-chimiques des siRNA sont décrites. Si dans un premier temps, la vectorisation dans un vecteur cationique semblait être le moyen le plus sûr et simple pour délivrer les siRNA, la tendance actuelle est à la modification chimique du siRNA (Weng, Xiao et al. 2019).

I. La vectorisation

La vectorisation consiste en la complexation du siRNA avec un matériel cationique par interaction électrostatique afin de contrôler sa distribution. Le matériel cationique utilisé peut être un lipide ou polymère cationique (David, Pitard et al. 2010). Elle est à différencier des méthodes de transfection physique des siRNA, qui transduisent le siRNA par des moyens physiques : la perturbation de la membrane plasmique par courant électrique (électroporation), le transfert direct dans le compartiment désiré (micro-injection) ou la délivrance par bombardement à très grande vitesse de billes enrobées d'acide nucléique (Bruniaux 2014, Yarmush, Golberg et al. 2014).

A. Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont un système de délivrance non-viral qui a été beaucoup étudié. Elles sont composées de différents lipides, capable de passer les membranes cellulaires (Kraft, Freeling et al. 2014). Nous avons choisi de décrire deux principaux groupes : les lipoplexes ou liposomes cationiques et les nanoparticules lipidiques stables d'acides nucléiques (stable nucleic acid particle ou SNALP).

a) Lipoplexe

Les liposomes sont des vésicules unilamellaires ou multilamellaires composées d'une bicouche lipidique et d'un cœur aqueux, enfermant des molécules lipophiles ou hydrophiles (Barros and Gollob 2012, Kraft, Freeling et al. 2014). Les lipides qui les constituent sont biocompatibles, c'est-à-dire théoriquement non toxiques et non immunogènes. Certaines formulations liposomales de différentes molécules actives ont été approuvées par les différentes agences de santé (FDA, EMA) et se sont révélées efficaces pour maintenir des concentrations plasmatiques élevées de médicaments à faible biodisponibilité et à

caractéristique hydrophile ou pour diminuer leur toxicité, comme la doxorubicine (Doxil® ; liposome PEGylé) (Tran, DeGiovanni et al. 2017).

Les lipides cationiques interagissent à l'aide d'interactions électrostatiques avec le siRNA polyanionique, entraînant la formation de "lipoplexes". Un lipide est composé de trois parties : la tête polaire, les queues hydrophobes et un bras espaceur entre les fonctions chimiques précédentes. La charge positive, portée par la tête polaire permet d'encapsuler le siRNA et de le protéger des nucléases sériques. Cette charge de surface positive est avantageuse pour l'encapsulation du siRNA, l'absorption cellulaire et l'échappement de l'endosome en se liant à la membrane cellulaire chargée négativement.

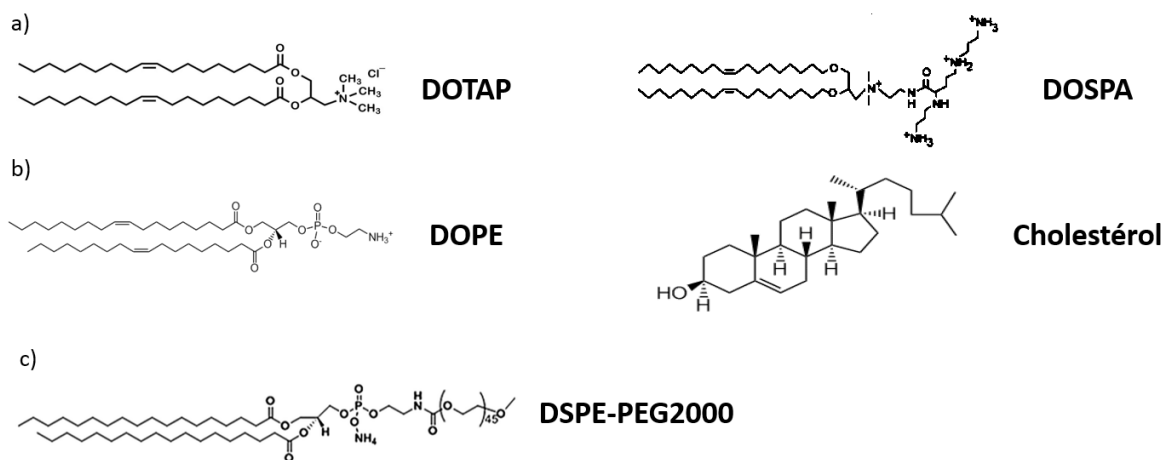


Figure 4 : Formules chimiques de quelques différents lipides composant les lipoplexes. a) lipides cationiques monovalent DOTAP (1,2-dioléoyloxy-3-triméthylammoniumpropane) ou multivalent DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate), b) lipides auxiliaires DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) et cholestérol, c) lipide PEGylé DSPE-PEG₂₀₀₀

Il existe deux catégories de base de lipides cationiques : monovalent et multivalent (Figure 4a). La différence réside dans le nombre de fonctions chimiques cationiques. Les lipides monovalents, comme 1,2-dioléoyloxy-3-triméthylammoniumpropane (DOTAP), en contiennent une. Les lipides multivalents ont été développés à partir des lipides monocationiques, leur tête polaire contient plus d'un groupement cationique. On y retrouve notamment le lipide 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA), présent dans l'agent de transfection commercial Lipofectamine® (DOSPA/DOPE 3/1). Dans les deux catégories, l'efficacité de transfection de ces lipides est élevée par leur charge positive permettant l'internalisation cellulaire et l'échappement de l'endosome (Xia, Tian et al. 2016).

Les lipoplexes sont également constitués des "lipides auxiliaires" tels que la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) ou le cholestérol, qui ont un rôle non négligeable dans la transfection des siRNA (Figure 4b) (Ramezani, Khoshhamdam et al. 2009). Ils facilitent la complexation du siRNA, augmentent la stabilité des liposomes et limitent leur toxicité en diminuant la quantité de lipides cationiques. Le lipide DOPE est le lipide auxiliaire le plus utilisé dans la formation des lipoplexes et cela s'explique notamment par son caractère fusogène. Ce lipide a une température de transition basse ($T_m \sim -11,5^\circ\text{C}$). Cela correspond à la température à laquelle le liposome passe d'une phase stable lamellaire (organisation observée dans la circulation sanguine) à une phase hexagonale inverse où il fusionne avec une membrane chargée négativement (notamment celle de l'endosome) (Kanasty, Dorkin et al. 2013). Le lipide DOPE facilite donc la libération du siRNA dans le cytoplasme (Heyes, Palmer et al. 2005, Ramezani, Khoshhamdam et al. 2009, Xia, Tian et al. 2016, Antimisiaris, Mourtas et al. 2017).

Le troisième élément pouvant composer les lipoplexes, sont les lipides PEGylés (Figure 4c). Le poly-éthylène glycol (PEG) est un polymère biocompatible, qui va couvrir la surface du liposome pour la rendre neutre et plus hydrophile (Barros and Gollob 2012). Cela permet aux lipoplexes de ne pas être reconnus par les opsonines et donc de retarder leur capture par le système mononucléaire phagocytaire (MPS) responsable de l'élimination rapide des NPs.

b) Stable Nucleic Acid Lipid Particle (SNALP)

Les SNALP sont des nanoparticules lipidiques composées d'une bicouche lipidique contenant un mélange de :

- *Lipides ionisables, sensibles au pH* : ces lipides ont été optimisés pour avoir une tête polaire chargée lors de la condensation du siRNA et lors de l'internalisation cellulaire et neutre à pH physiologique dans la circulation sanguine (Kanasty, Dorkin et al. 2013).
- *Lipides auxiliaires* : comme pour les lipoplexes, ils contribuent à la stabilité et à l'efficacité de la nanoparticule lipidique (Cheng and Lee 2016)
- *Lipides protecteurs (shielding lipid)* : c'est un lipide PEGylé utilisé pour stabiliser les particules et fournir une surface hydrophile neutre. Ce lipide peut également servir d'ancrage pour un ciblage actif (Barros and Gollob 2012).

La structure des lipides chargés peut avoir une incidence significative sur l'efficacité et la toxicité des SNALP. Pour la prévenir, des banques de lipides ont été mises au point pour sélectionner des lipides efficaces pour améliorer l'inhibition de l'expression des gènes et

réduire leur toxicité (Semple, Akinc et al. 2010, Barros and Gollob 2012). Les lipides ionisables ont été construits en se basant sur la relation structure-activité du lipide classique 1,2-dilinoléoyloxy-N,N-diméthyl-3-aminopropane (DLin-DMA) (Figure 5) et sur son mécanisme d'action *in vivo* (notamment sa capacité à s'échapper de l'endosome). Dans une étude de Semple *et al.*, en 2010, les auteurs ont décrit deux paramètres d'optimisation : le pKa et la température de transition. Le premier doit être inférieur à 7 pour circuler dans le sang avec une charge neutre et avoir une charge positive lors de l'internalisation pour s'échapper de l'endosome.

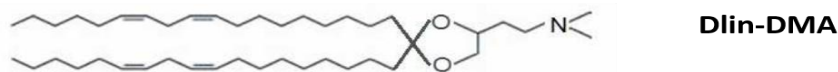


Figure 5 : Formule chimique du DLin-DMA. *Adapté d'après Semple et al. (Semple, Akinc et al. 2010)*

Le deuxième paramètre correspond à la capacité des lipides protonés d'induire une phase hexagonale H_{II} lorsqu'ils sont en présence de lipides anioniques, notamment présents dans la membrane de l'endosome (Figure 6). La phase H_{II} est une phase inverse qui permet de déstructurer l'endosome et de libérer la molécule active de la SNALP. Les auteurs de cette étude ont déduit que la température de transition optimale était inférieure à 7°C (Semple, Akinc et al. 2010).

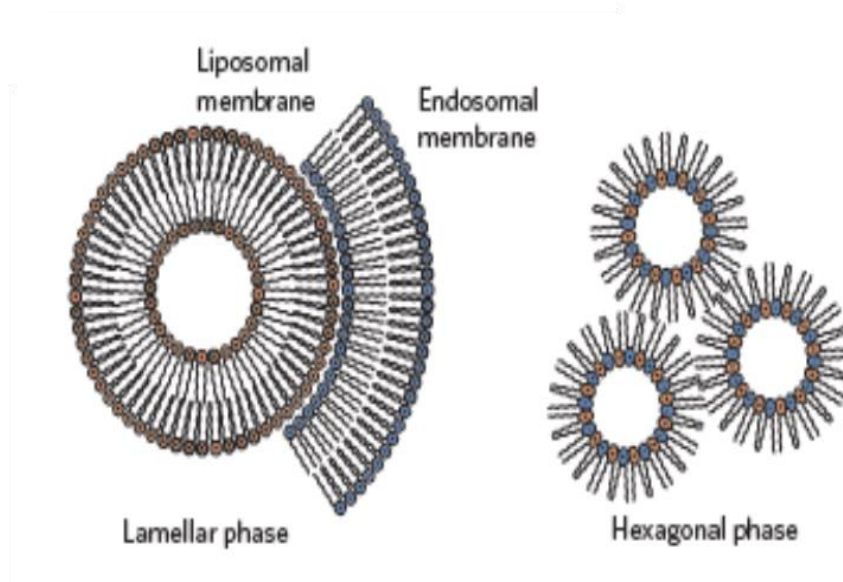


Figure 6 : Les deux phases possibles d'un lipide. *En présence de lipides anioniques, les lipides cationiques peuvent passer d'une phase lamellaire à une phase hexagonale instable, qui entraîne la fusion des deux membranes. Adapté de Kanasty et al. (Kanasty, Dorkin et al. 2013)*

c) Développement et approbation de l'Onpattro®

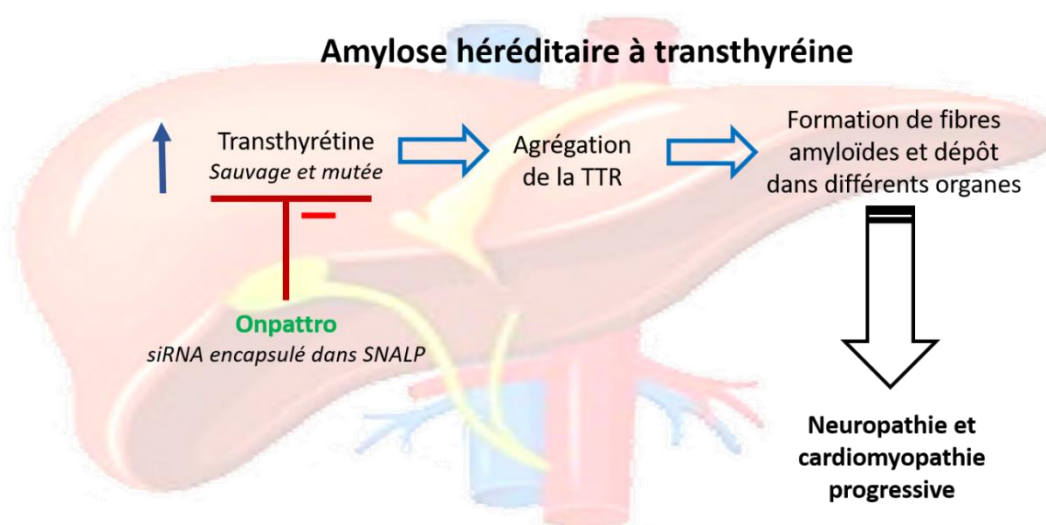


Figure 7 : Voie thérapeutique du médicament Onpattro®

L'amylose héréditaire à transthyréine (aTTR) est une maladie évolutive rare causée par le dépôt anormal de la transthyréine amyloïde dans divers organes, y compris les nerfs périphériques. Les phénotypes cliniques sont hétérogènes : les patients souffrent principalement d'une neuropathie et d'une cardiomyopathie évolutive dont la survie médiane est inférieure à 15 ans après le diagnostic. La transthyréine (TTR) est une protéine circulante synthétisée par le foie, dont le rôle est de transporter le rétinol (vitamine A) et dans une moindre mesure l'hormone thyroïdienne (thyroxine). Dans l'aTTR, le gène codant pour la TTR peut être muté, ce qui entraîne un mauvais repliement et une agrégation des protéines, qui vont former des fibrilles amyloïdes et se déposeront dans les tissus (Figure 7). Aucun traitement curatif n'existait avant l'approbation d'Onpattro® par la FDA aux Etats-Unis (Rizk and Tuzmen 2017).

Ce médicament commercialisé par Alnylam Pharmaceuticals, est composé d'un siRNA ciblant à la fois la forme mutée et sauvage de TTR dans sa région 3'- non traduite de l'ARNm, vectorisé dans une SNALP (Patisiran). Les composants lipidiques de cette formulation comprennent le lipide aminé ionisable DLin-MC3-DMA, le lipide PEG2000-C-DMG, un lipide auxiliaire DSPC et le cholestérol. Dans la circulation sanguine, les lipides PEGylés sont éliminés et remplacés par des protéines sériques telles que l'apolipoprotéine E (ApoE), permettant une internalisation dans les hépatocytes (Akinc, Querbes et al. 2010). L'endocytose par le récepteur aux lipoprotéines entraîne la formation de l'endosome et son acidification, induisant la ré-ionisation du lipide ionisable et la libération du siRNA dans le cytoplasme (Setten, Rossi et al. 2019).

Chez le primate non humain, qui a la même séquence TTR, l'injection de cette formulation a induit une inhibition significative de TTR après une dose unique de 0,1-0,3 mg/kg. Butler *et al.* a observé une diminution durable et profonde de la TTR empêchant le dépôt des fibrilles. Par ailleurs, dans une lignée de souris transgéniques exprimant la variante TTR humaine pathogène mais pas la protéine murine, l'inhibition de l'expression de TTR était plus efficace que le tafamidis, le traitement utilisé jusqu'alors pour stabiliser la conformation tétramérique de TTR et empêcher son mauvais repliement (Coelho, Adams *et al.* 2013, Butler, Chan *et al.* 2016).

La formulation a passé avec succès l'essai clinique de phase I et II où des injections IV une fois toutes les 3 semaines à la dose de 0,3 mg/kg ont permis de réduire de plus de 80 % le taux de TTR circulant dans le sérum. Le patisiran a été généralement bien toléré, aucune toxicité limitante n'a été signalée et les effets indésirables les plus courants étaient liés à la voie d'injection. Les constantes biologiques n'ont montré aucune variation significative des paramètres hépatiques, rénaux ou hématologiques de toxicité. Une augmentation transitoire des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-1RA et IP-10) a été observée dans un sous-groupe mais est revenue à un niveau normal en 24 heures. Ces résultats fournissent des preuves de l'innocuité et de l'efficacité de Patisiran qui ont été confirmées en phase III. Dans cet essai, le médicament seul ou en association avec l'inotersen (oligonucléotide antisens diminuant la production de TTR, commercialisé depuis 2018), a amélioré les manifestations cliniques de l'aTTR et la qualité de vie des patients. **La première étude clinique a débuté en 2012 et 6 ans plus tard, le candidat-médicament, dénommé Onpattro®, a été approuvé**, apportant un nouvel espoir pour les patients atteints de aTTR (Coelho, Adams *et al.* 2013, Suhr, Coelho *et al.* 2015, Adams, Gonzalez-Duarte *et al.* 2018, Mathew and Wang 2019).

B. Nanoparticules polymériques

Pour la vectorisation du siRNA, peu de polymères ont été utilisés et encore moins ont atteint les stades cliniques. Contrairement aux lipides cationiques, les polymères n'ont pas de partie hydrophobe et sont totalement solubles dans l'eau. Un seul a été testé en clinique, il s'agit du CALAA-01, une nanoparticule polymérique composée de cyclodextrine dont les résultats sont présentés ci-dessous.

a) Polymère naturel : cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques naturels dont ils existent différentes familles. Les β -cyclodextrines sont composées de 7 unités oligosaccharidiques cycliques (Figure 8a). Chimiquement, chaque unité se présente comme une cage avec une cavité centrale apolaire pouvant accueillir des composés hydrophobes (Kanasty, Dorkin et al. 2013).

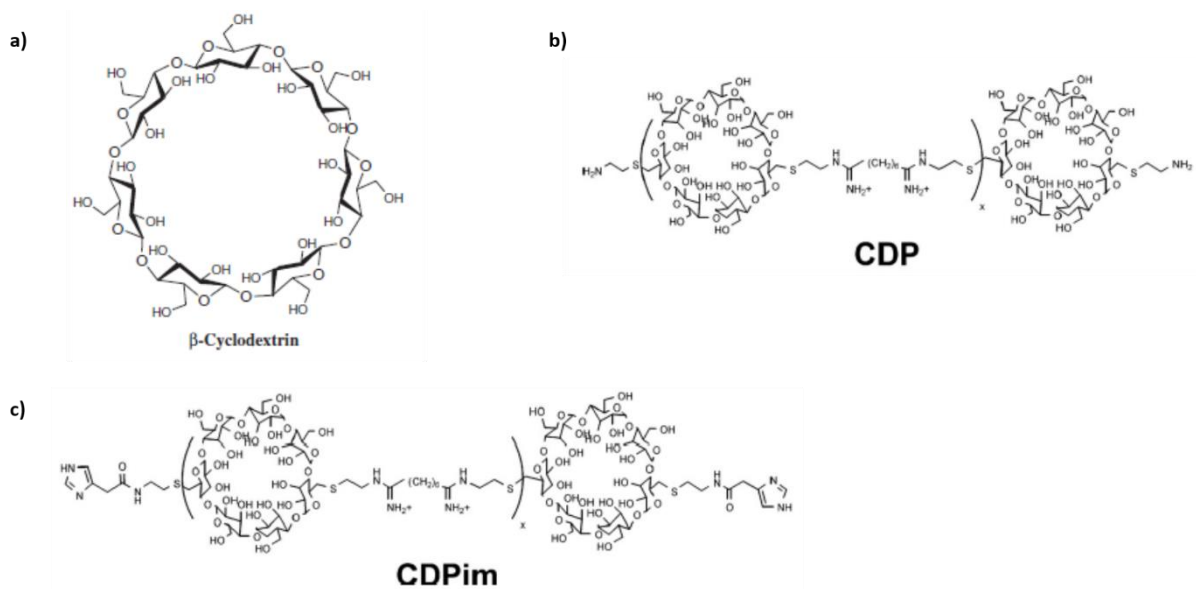


Figure 8 : Formules chimiques du monomère de β -cyclodextrine (a), du cyclodextrine polycationique (CDP) modifié et polymérisé (b) et du cyclodextrine polycationique grâce à un groupement chimique imidazole et polymérisé (CDPim)

Dans un premier temps, l'équipe du Pr. Davis a modifié un monomère de β -cyclodextrine en y ajoutant des groupements basiques pour former un dicysteamine- β -cyclodextrine et ensuite le polymériser pour former un cyclodextrine polycationique (CDP) (Figure 8b) (Hwang, Bellocq et al. 2001). Dans un second temps, ils ont remplacé les fonctions chimiques terminales par un groupement imidazole (Figure 8c), ce qui améliore son pouvoir tampon et l'échappement de l'endosome par un effet « éponge à protons » (Davis, Pun et al.

2004, Mishra, Heidel et al. 2006). Afin de stabiliser le polyplexe, la surface a été modifiée en y ajoutant des chaînes de PEG conjuguées à l'adamantane. Ce dernier est un hydrocarbure qui va se fixer à la surface du CDP, ce qui permet de minimiser les interactions avec le plasma et cibler plus facilement les récepteurs cellulaires (Pun and Davis 2002). Pour améliorer la biodistribution de cette formulation, la transferrine a également été conjuguée au PEG-adamantane pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, qui surexpriment son récepteur (Bellocq, Pun et al. 2003).

b) Développement de CALAA-01

Le **premier succès thérapeutique d'un siRNA chez l'homme** a été développé pour le traitement de cancers solides par Calando Pharmaceuticals (Figure 9).

Dans un premier temps, un siRNA ciblant la sous-unité M2 de la ribonucléotidase réductase (RRM2), responsable de développement de plusieurs cancers (sein, utérus, poumon, ...) a été construit et testé *in vitro* tout d'abord pour voir son efficacité à inhiber l'expression de cette enzyme, impliquée dans la réplication de l'ADN durant la phase G1/S (Heidel, Liu et al. 2007).

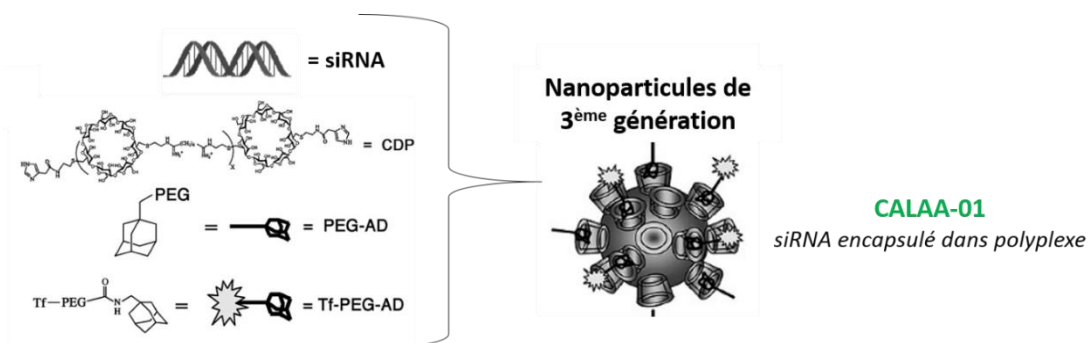


Figure 9 : Représentation schématique de la nanoformulation CALAA-01. *Adapté d'après Davis (Davis 2009). Abréviations : CDP cyclodextrine polycationique ; PEG-Ad polyéthylène glycol - adamantane ; Tf-PEG-Ad Transferrine – polyéthylène glycol - adamantane*

Dans un second temps, ce siRNA a été encapsulé dans le polyplexe fonctionnnalisé décrit précédemment (Figure 9). L'injection par voie *iv* de ce nanovecteur dans un modèle rongeur de neuroblastome a entraîné une forte réduction de la croissance tumorale, corrélée à une inhibition de l'expression de RRM2. Les études précliniques de toxicité ont montré une légère augmentation des enzymes hépatiques (transaminases), de l'urée sanguine et de la créatinine. L'augmentation de ces paramètres biologiques démontre une toxicité hépatique et rénale à la plus forte dose chez le primate non humain (27 mg/kg). Une légère stimulation

immunitaire a également été détectée à cette dose (augmentation du taux d'IL-6 chez tous les animaux). Cependant, aucun signe clinique de toxicité n'a été observé. Malgré l'absence d'études de toxicité avec un siRNA contrôle, ces NPs de troisième génération ont été considérées comme bien tolérées et avec un large index thérapeutique, les doses les plus faibles (3 et 9 mg/kg) correspondant aux doses antitumorales efficaces chez les rongeurs (pour les primates non humains 0,6-1,2 mg/kg) (Heidel, Yu et al. 2007, Bartlett and Davis 2008, Davis 2009, Stirland, Nichols et al. 2013).

Cette étude menée par le Dr Heidel chez Calando Pharmaceuticals a été la première à montrer que les injections multiples de siRNA pouvaient être effectuées en toute sécurité chez une espèce non-rongeur et ensuite chez l'homme (Heidel, Yu et al. 2007). En effet, en mai 2008, cette nanoparticule ciblée dénommée CALAA-01, est entrée en essai clinique (NCT00689065). Différents paramètres ont été étudiés pour déterminer la tolérance, le profil d'innocuité, la réponse pharmacocinétique et immunitaire. Il s'agit de la **première étude** qui détermine la dose efficace préliminaire pour les phases ultérieures et a **mis en évidence une dégradation de l'ARNm du gène ciblé par un siRNA chez l'homme**. Dans l'ensemble, le traitement a été bien toléré. Les quelques effets indésirables observés sont de grade 1-2, comme faiblesse, fièvre, frissons et les problèmes gastro-intestinaux, ainsi qu'une augmentation transitoire des taux d'IL-6 et de TNF- α . L'étude pharmacocinétique a permis de montrer une accumulation préférentielle de CALAA-01 dans les tumeurs humaines de mélanome métastatique grâce à son ligand, la transferrine. Malheureusement, la phase IB a été interrompue prématurément en raison de l'apparition d'une toxicité non spécifique (augmentation de la créatinine, thrombocytopénie) (Davis, Chen et al. 2008, Davis, Zuckerman et al. 2010, Xue, Liu et al. 2014, Setten, Rossi et al. 2019). Cette toxicité est très probablement due à l'instabilité de la transferrine, dont la structure a été altérée avec le temps (Zuckerman, Gritli et al. 2014, Zuckerman and Davis 2015).

Même si cet essai clinique a été finalement un échec à cause d'un problème dans la stabilité du polyplexe, il est le **tout premier qui a montré la faisabilité d'une thérapie ciblée par ARNi chez l'homme et a ouvert la voie aux futurs traitements par siRNA**.

II. Modifications chimiques des siRNA

A. Conjugaison à un dérivé ose

De nos jours, un tiers des molécules siRNA qui sont en développement clinique sont des oligonucléotides modifiés par conjugaison à la N-acétylgalactosamine (GalNAc). Ce glucide est un dérivé du galactose, qui présente une affinité de liaison accrue pour le récepteur de l'asialoglycoprotéine. Ce dernier est un récepteur de lectine de type C permettant la clairance de la glycoprotéine en circulation *via* une endocytose médiée par clathrine suivie d'un recyclage du récepteur. Il est fortement exprimé dans la membrane des hépatocytes (environ 10^5 - 10^6 par cellule). Certaines sous-unités ont également été retrouvées dans la thyroïde, le gros intestin, l'épithélium rénal, les testicules et les monocytes sanguins (Janas, Harbison et al. 2018).

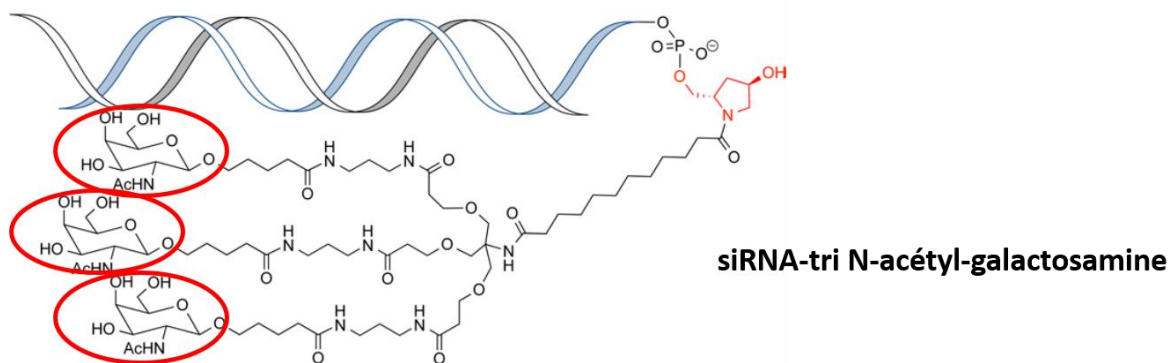


Figure 10 : Formule chimique de bioconjugué siRNA- tri N-acétyl-galactosamine développé par Alnylam Pharmaceuticals. *Adapté d'après Nair et al. (Nair, Willoughby et al. 2014)*

De petits ARN interférents ont été conjugués de manière covalente à 3 sucres GalNAc et délivrés avec succès au foie (Figure 10) (Lee, Kang et al. 2016, Janas, Harbison et al. 2018). Ces molécules sont injectées par voie sous-cutanée (SC) et montrent une accumulation hépatique accrue. La liaison du siRNA au GalNAc augmente la stabilité systémique et améliore les paramètres pharmacocinétiques.

Des études de toxicologie générale ont été menées chez deux espèces : un rongeur (rat Sprague-Dawley) et un primate non humain (macaque cynomolgus). Les rats sont connus pour être particulièrement sensibles à toutes toxicités hépatiques. À fortes doses, le récepteur de l'asialoglycoprotéine est saturé et le rein élimine l'excès de siRNA-GalNAc circulant. Aucune dose maximale tolérée n'a donc été atteinte. Histologiquement, des vacuolisations hépatocellulaires ont été observées après une injection par semaine pendant 3 semaines chez

le rat à des doses ≥ 30 mg/kg (30 à 300 fois supérieures aux doses pharmacologiques efficaces) mais sans effets cliniques significatifs. Cette vacuolisation n'a pas été observée chez le primate non humain. Les effets observés les plus fréquents sont les conséquences histologiques de l'accumulation du bioconjugué dans le foie, rein et les ganglions lymphatiques chez les deux espèces (dans des proportions différentes en fonction de leur sensibilité), mais ils n'ont pas été considérés comme des effets indésirables même à la plus forte dose répétée testée (Janas, Harbison et al. 2018).

a) Essais cliniques du Revusiran

En plus de l'Onpattro®, Alnylam Pharmaceuticals a développé un siRNA similaire à celui de Patisiran, mais au lieu d'être complexé dans une SNALP, le siRNA ciblant TTR est conjugué à trois GalNAc. La seconde différence est que le siRNA conjugué a plus de modifications chimiques au niveau de sa séquence, ce qui permet d'améliorer sa stabilité et d'espacer les injections de plusieurs semaines (Zimmermann, Karsten et al. 2017). Cette formulation a été nommée Revusiran.

Des études précliniques ont démontré l'efficacité et la non-toxicité chez les rongeurs et les primates non humains (Nair, Willoughby et al. 2014, Butler, Chan et al. 2016). Les injections SC chroniques d'une dose efficace de **1 mg/kg sur 280 jours entraînent un effet pharmacologique prolongé sans effets secondaires, indiquant la possibilité de traiter une maladie chronique** (Nair, Willoughby et al. 2014, Nair, Attarwala et al. 2017). L'essai clinique de phase I (NCT01814839) n'a pas montré d'effets indésirables graves, sauf ceux causés par l'injection (principalement des réactions légères à modérées au point d'injection et seulement une réaction grave avec érythème d'une taille supérieure à 10 cm). Toutes les doses testées ont été bien tolérées, sans stimulation immunitaire et sans atteinte d'une dose toxique limitante. D'un point de vue pharmacocinétique, l'injection multiple SC du Revusiran n'entraîne pas son accumulation dans l'organisme et une bonne inhibition du transcrit cible TTR a été observée après une dose unique de 1 à 5 mg/kg. **Il s'agit du premier exemple de siRNA bioconjugué induisant une efficacité chez l'homme** (Zimmermann, Karsten et al. 2017).

Le revusiran est passé en phase II et III : la phase II a notamment confirmé les résultats précédents mais la phase III (ENDEAVOUR ; NCT02319005) s'est terminée avant la fin en raison du développement d'une neuropathie périphérique dans le groupe traité. De plus, une augmentation de la concentration de lactate et un déséquilibre de mortalité ont été observés entre les deux groupes (Gillmore, Falk et al. 2015, Garber 2016). Les enquêtes post-essais n'ont pas permis d'établir de lien entre la mortalité plus élevée et l'injection du Revusiran, mais

n'ont pas exclu totalement que cette molécule ait une toxicité¹ (Setten, Rossi et al. 2019). Les recherches se sont donc poursuivies et se sont concentrées sur le lien entre le siRNA et les trois GalNAc. L'évolution d'une chimie standard à une chimie de stabilisation améliorée a permis d'obtenir d'un siRNA bioconjugué plus stable et plus sûr. Cette amélioration correspond à l'ajout de liaisons phosphorothioates au niveau des deux nucléotides 5'- de chaque brin. Cela a permis de stabiliser le siRNA et par conséquent de diminuer la dose optimale de traitement par 10 ainsi que le risque de toxicité (Nair, Attarwala et al. 2017).

Les molécules siRNA-triGalNAc actuellement en essai clinique ont toutes été modifiées par cette chimie de stabilisation améliorée (Springer and Dowdy 2018). Il y a actuellement cinq candidats-médicaments recensés sur clinicaltrials.gov :

- Vutrisiran pour le traitement de l'amylose transthyrétine héréditaire en phase III
- Lumasiran pour le traitement de l'hyperoxalurie primitive type 1 en phase III
- Fitusiran pour le traitement de l'hémophilie en phase III
- Inclisiran pour le traitement de l'hypercholestérolémie en phase II/III
- Cemdisiran pour le traitement du syndrome hémolytique et urémique atypique en phase II

Fin 2019, le **premier siRNA bioconjugué à 3 GalNAc** a été **approuvé** par les autorités de santé. Il s'agit du Givosiran, commercialisé sous le nom de **Givlaari®**, pour le **traitement de la porphyrie hépatique aiguë** (Scott 2020).

B. Conjugaison à des dérivés lipidiques : le squalène

Le squalène (SQ) est un triterpène polyinsaturé C₃₀H₅₀. Il tient son nom du fait qu'il a été retrouvé par le Dr. Tsujimoto en 1903 en forte quantité dans l'huile de foie de requins (squale en anglais) (Kim and Karadeniz 2012). Ce lipide est également présent dans l'huile d'olive et les glandes sébacées, où il est sécrété en large quantité et transporté *via* les lipoprotéines dans le sang (Reddy and Couvreur 2009). C'est un précurseur du cholestérol, synthétisé dans les cellules par la squalène synthétase et qui est cyclisé ensuite en lanostérol par deux enzymes, la squalène monooxygénase et la squalène epoxydase (Figure 11). Ce

¹ <https://www.genengnews.com/news/after-18-deaths-in-phase-iii-alnylam-halts-revusiran-development/>, visualisé le 28/11/19

lipide a été étudié seul pour ces effets biologiques anti-oxydants, antinéoplasiques et cytoprotecteurs (Kim and Karadeniz 2012).

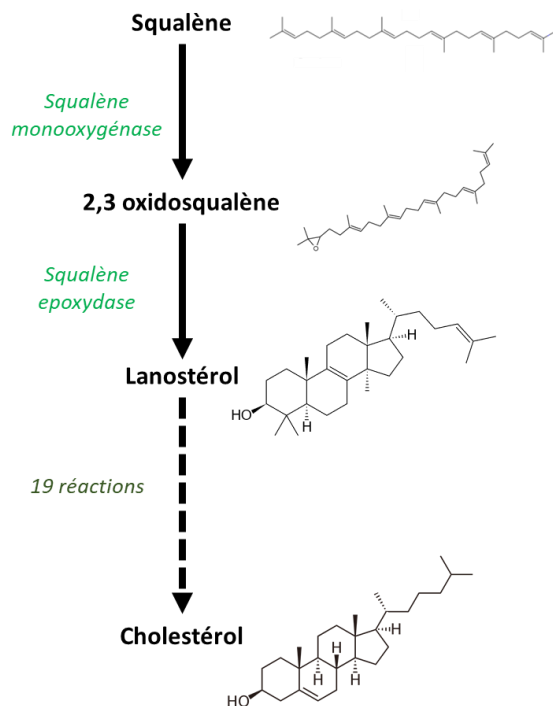


Figure 11 : Synthèse chimique du cholestérol

Le SQ est aussi utilisé depuis 1997 comme adjuvant avec une dose de 10 mg dans le vaccin antigrippal FLUAD®, afin de le rendre plus immunogène et de diminuer la dose vaccinale injectée (Mesa and Fernández 2004). Il est également présent dans l'adjuvant MF59 d'un autre vaccin antigrippal développé par Novartis. Il a été observé que l'administration de cet adjuvant n'entraînait pas la production d'anticorps anti-SQ, démontrant l'innocuité de ce lipide (Del Giudice, Fragapane et al. 2006, Del Giudice, Rappuoli et al. 2018).

Au cours de sa transformation en lanostérol, le SQ adopte une forme compacte dans la poche hydrophobe de l'enzyme squalène époxydase. Cette conformation unique en milieu aqueux a suscité l'intérêt de l'équipe du Pr Patrick Couvreur, qui a eu l'idée en 2006 de le lier à une molécule chimiothérapeutique d'origine nucléosidique, la gemcitabine, afin de la protéger de la dégradation et d'améliorer ses paramètres pharmacocinétiques (Couvreur, Stella et al. 2006, Couvreur, Reddy et al. 2008, Desmaele, Gref et al. 2012). Le concept de « **squalénisation** » est ainsi né : il consiste en le **couplage du squalène avec une molécule thérapeutique**. Les bioconjugués résultants s'auto-assemblent spontanément dans l'eau pour former des nanoparticules d'une taille < 300 nm. Depuis ces premiers résultats, cette méthode de couplage a été testée avec d'autres petites molécules thérapeutiques dans différents modèles pathologiques, où elle a prouvé à nouveau son efficacité (Valetti, Maione et al. 2014, Gaudin, Song et al. 2016).

En 2010, cette technologie innovante a donc été transposée avec succès au siRNA dans l'équipe du Dr Liliane Massade pour le traitement des cancers à OF. Un siRNA ciblant l'OF RET/PTC1 retrouvé dans 50% des carcinomes papillaires de la thyroïde a été conjugué *via* une addition de Michaël au SQ (figure 12). Pour ce couplage chimique, le siRNA est modifié en 3'- par un groupement thiol et le SQ par une fonction maleimide, entraînant la formation d'un bioconjugué siRNA-SQ lié par une fonction thioéther (Raouane, Desmaele et al. 2011). L'injection intraveineuse de cette nanoformulation a montré une importante activité antinéoplasique avec une diminution de près de 70% de la croissance tumorale corrélée à une inhibition des produits de l'OF (ARN et protéine) (Raouane, Desmaele et al. 2011, Raouane, Desmaele et al. 2012).

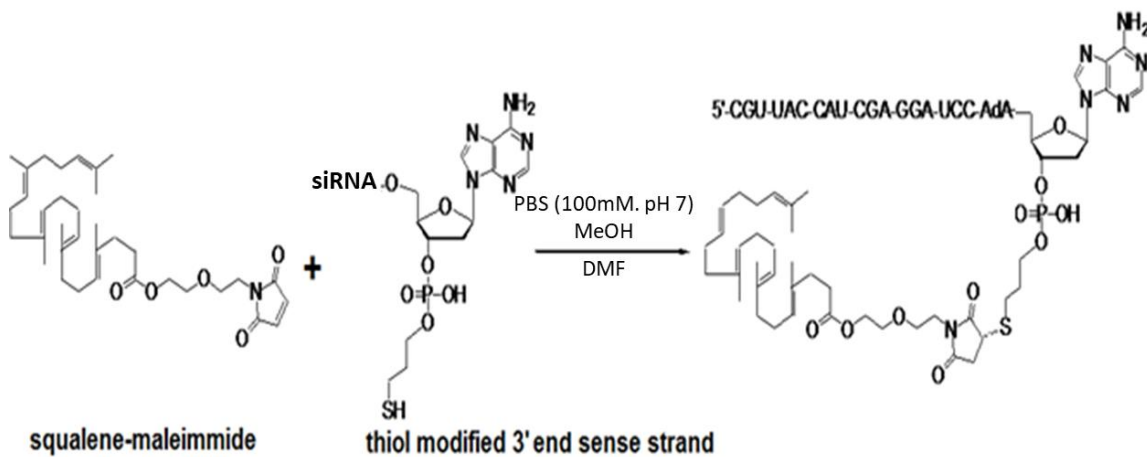


Figure 12 : Conjugaison du siRNA RET/PTC1 au SQ *via* une addition de Michaël. *Adapté de Raouane et al. (Raouane, Desmaele et al. 2011)*

Par la suite, ce résultat a été confirmé avec un autre siRNA ciblant l'OF RET/PTC3 qu'on retrouve également dans le carcinome papillaire de la thyroïde et anti-TMPRSS2-ERG présent dans plus de 50% des cancers de la prostate (Ali, Urbinati et al. 2014, Urbinati, Ali et al. 2015, Urbinati, de Waziers et al. 2016). La conjugaison au SQ par cette même méthode de couplage a permis d'inhiber de façon significative la croissance tumorale par induction de l'apoptose et inhibition de la prolifération. Cet effet antinéoplasique est corrélé à une inhibition de l'expression des OF RET/PTC3 et TMPRSS2-ERG confirmant l'internalisation du siRNA au sein des tumeurs.

La bioconjugaison du siRNA au SQ *via* une addition de Michaël a montré son efficacité avec trois siRNA différents dans trois modèles animaux pathologiques. Néanmoins, le protocole de synthèse était long et laborieux avec un rendement faible après purification par HPLC. Dans le but de simplifier le protocole et d'augmenter le rendement de la synthèse, une nouvelle méthode de bioconjugaison a été développée au laboratoire. **La réaction de chimie**

clic est une cycloaddition de Huisgen, où un alcyne acyclique et un azide réagissent pour former une liaison triazole. Jewett et al. ont pu s'affranchir de l'utilisation de cuivre, en remplaçant les alcynes acycliques par des cyclooctynes (Jewett and Bertozzi 2010). Cette méthode, appelée **chimie clic sans cuivre** (copper-free click chemistry), a été utilisée par différentes équipes pour conjuguer des oligonucléotides avec un bon rendement (autour de 80%) (Heuer-Jungemann, Kirkwood et al. 2013, Jawalekar, Malik et al. 2013). Ainsi au laboratoire, le brin sens du siRNA a été modifié en 5' par une fonction dibenzocyclooctyne (DBCO) et le SQ par une fonction azide N₃. Le couplage s'effectue en une étape pour former le bioconjugué brin sens du siRNA-SQ lié par une fonction triazole (Figure 13).



Figure 13: La cycloaddition de Huisgen, aussi appelé la chimie click sans cuivre, pour conjuguer le brin sens du siRNA au SQ.

Après purification par HPLC et une étape de lyophilisation, le rendement final de bioconjugaison est autour de 70% vs 12% par réaction de Michael. Le siRNA anti-TMPRSS2-ERG a été conjugué au SQ par cette méthode et a gardé son activité antinéoplasique *in vitro* et *in vivo* (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018). En effet, les NPs siRNA TMPRSS2-ERG-SQ ont inhibé l'expression de l'ARNm et des protéines de l'OF dans les cellules VCaP exprimant TMPRSS2-ERG. De plus, l'injection intraveineuse de ces NPs a permis d'inhiber la croissance tumorale d'environ 50 à 60 %. La bioconjugaison par chimie clic sans cuivre du siRNA RET/PTC1 au SQ n'a également pas modifié son activité inhibitrice *in vitro*.

Dernièrement, un siRNA ciblant l'expression de la PMP22 responsable de la pathologie démyélinisante CMT1A, a été couplé au SQ par la chimie clic sans cuivre. L'administration intraveineuse de cette nanoformulation a montré des résultats impressionnants dans un modèle de CMT1A : rétablissement des fonctions motrices et musculaires corrélé à une

normalisation de l'expression de la protéine PMP22, confirmant l'efficacité *in vivo* du siRNA (Boutary, Caillaud et al., 2020 soumis).

Les avantages et inconvénients des différents moyens de la vectorisation physique et chimique du siRNA sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résumé des différences entre vectorisation et modification chimique avec leurs avantages/inconvénients

	Vectorisation	Modification chimique
Interaction avec le siRNA	FAIBLE (liaisons électrostatiques)	FORTE (liaison covalente)
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Premier moyen de protéger et véhiculer les siRNA - Le plus étudié actuellement - Une formulation a été approuvée par les autorités de santé - Possibilité de cibler spécifiquement des cellules 	<ul style="list-style-type: none"> - 1^{ère} approbation par les autorités de santé en 2020 - Rapport équimolaire entre le siRNA et son vecteur - Caractérisation plus facile du bioconjugué siRNA-vecteur - Possibilité de cibler spécifiquement des cellules - Pas de complexation de la formulation
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Effets toxiques des charges cationiques - Altération de l'expression de certains gènes par le vecteur (en dehors des effets du siRNA) - Toxicité du PEG - Risque de libération immédiate du siRNA car interaction faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Généralement, efficacité moindre <i>in vitro</i> - siRNA plus exposé aux nucléases sériques - Risque perte efficacité du siRNA si trop modifié

III. Article de synthèse décrivant les différentes approches d'encapsulation des siRNA et leurs développements précliniques et cliniques

L'article de synthèse ci-après présente les différents obstacles se dressant pour une utilisation thérapeutique des siRNA. En effet, les barrières extracellulaires et intracellulaires de l'organisme couplées aux caractéristiques physico-chimiques du siRNA ne permettent pas une administration efficace et sûre de cette molécule. Le développement des nanotechnologies a permis d'y remédier en vectorisant le siRNA dans une nanoparticule cationique ou en le couplant à une molécule. Les avantages et inconvénients de ces méthodes d'encapsulation sont décrits ainsi que le développement clinique de quelques nanoformulations intéressantes. De nombreuses molécules sont actuellement à un stade avancé de leur développement et devraient être mise sur le marché prochainement.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

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

Review article

Small interfering RNA from the lab discovery to patients' recovery

Marie Caillaud, Mévidette El Madani, Liliane Massaad-Massade*

Université Paris-Saclay, Inserm 1195, Bâtiment Gregory Pincus, 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France



ARTICLE INFO

Keywords:

siRNA
Delivery
Nanotechnology
Formulation
Genetic
Clinical studies

ABSTRACT

In 1998, the RNA interference discovery by Fire and Mello revolutionized the scientific and therapeutic world. They showed that small double-stranded RNAs, the siRNAs, were capable of selectively silencing the expression of a targeted gene by degrading its mRNA. Very quickly, it appeared that the use of this natural mechanism was an excellent way to develop new therapeutics, due to its specificity at low doses. However, one major hurdle lies in the delivery into the targeted cells, given that the different extracellular and intracellular barriers of the organism coupled with the physico-chemical characteristics of siRNA do not allow an efficient and safe administration. The development of nanotechnologies has made it possible to counteract these hurdles by vectorizing the siRNA in a vector composed of cationic lipids or polymers, or to chemically modify it by conjugation to a molecule. This has enabled the first clinical developments of siRNAs to begin very quickly after their discovery, for the treatment of various acquired or hereditary pathologies. In 2018, the first siRNA-containing drug was approved by the FDA and the EMA for the treatment of an inherited metabolic disease, the hereditary transthyretin amyloidosis. In this review, we discuss the different barriers to the siRNA after systemic administration and how vectorization or chemical modifications lead to avoid it. We describe some interesting clinical developments and finally, we present the future perspectives.

1. Introduction

Since the RNA interference (RNAi) discovery, a new specific therapeutic approach for severe diseases has emerged and brings new hope for patients [1,2]. In 2001, Elbashir and Tuschl have already mentioned the possible use of small interfering RNA (siRNA) as “a new alternative to antisense or ribozyme therapeutics” [3]. The design and synthesis facilities lead to several research and development of siRNA drug [4].

Indeed, nine years after Elbashir and Tuschl discovery, the first RNAi evidence in human was done by Davis et al. [5]. The authors reported that the systemic administration of targeted nanoparticles of siRNA against M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) silence efficiently the targeted gene [5]. In 2018, the first-ever siRNA has been approved by the FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of a severe neuropathy, the hereditary transthyretin-mediated amyloidosis [6,7]. Very recently, a second siRNA has been marketed to cure an inherited rare hepatic disease after significant results in phase III clinical trial [8].

Despite the fact that siRNA are specific and efficient at low doses, their highly hydrophilicity and their short plasmatic half-life constitute the main hurdles for their systemic administration. Therapeutic applications of siRNA require development of nanosized delivery carriers,

named as nanovector or nanoparticle (NPs), to protect oligonucleotides and improve pharmacokinetic parameters. In this review, we describe the siRNA hurdles that must be overcome to exert its effects. Then, different vectorization approaches and their limits to counteract the siRNA barriers will be presented. Finally, we depict some interesting clinical studies and the future challenges of the RNAi therapy.

2. Hurdles for systemic siRNA-based therapeutics

2.1. Obstacles due to intrinsic siRNA properties

The siRNA is a double-stranded RNA composed of 19–21 base pairs with 3'-cohesive ends [3,9]. Antisense strand, also called guide strand, is fully complementary to a mRNA sequence of a targeted gene and induces its specific degradation. The synthetic siRNA bypasses through Dicer cleavage and is taken directly by the RNA-Induced Silencing Complex (RISC). The RISC nuclease, Ago2, unwinds siRNA strands and degrades the sense strand. The guide strand anneals with its complementary mRNA leading to its degradation and the silencing of the targeted gene [1,10]. The activated RISC complex (with antisense strand included) can move on, to degrade additional targeted mRNA, allowing a transient gene silencing for 3–7 days in rapidly dividing cells

* Corresponding author.

E-mail address: liliane.massade@inserm.fr (L. Massaad-Massade).<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.032>

Received 7 January 2020; Received in revised form 17 February 2020; Accepted 18 February 2020

Available online 19 February 2020

0168-3659/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

and, for several weeks, in slowly dividing cells [11,12].

The siRNA administration aims to deliver it from the injection point to the cytosol of targeted cells in enough quantities, to be able to inhibit the targeted gene expression. Unfortunately, some intrinsic characteristics do not help to reach this aim. Indeed once in the blood, naked siRNA are degraded by nucleases into shortened oligonucleotides then, eliminated by glomerular filtration, leading to a very short blood half-life (less than 15mins) [13–15]. Moreover, the siRNA is of high molecular weight (13kDa), hydrophilic and polyanionic thus preventing a good cellular uptake. It can also stimulate the immune system by sequence-dependent manner TLR-activation [1]. Several immune-stimulatory sequence patterns have been described, in general a U-rich sequence correlates with TLR-7 and 8 activation, which transmembrane receptors present in endosome of dendritic and monocytic cells [1].

To overcome these disadvantages, siRNA can be protected by a vector that should be non-toxic, biocompatible, biodegradable and non-immunostimulatory. However, each nanovector has its own toxicity, tissue biodistribution and internalization according to its physico-chemical characteristics [13].

We will focus on two siRNA vectorization strategies: the physical one (encapsulation in lipidic and polymeric nanovector) and the chemical one (modification on the siRNA).

2.2. Obstacles due to administration mode

The aim of siRNA encapsulation or modification is to deliver this biological molecule in the targeted tissue and cells. However, several extracellular and intracellular barriers obstruct this route depending on the administration mode.

Indeed, local injection corresponds to the direct administration of the drug inside the tissue. It limits systemic toxicity of siRNA and nanovector but only few tissues are candidates to localized therapy, including eye, skin, lung (by direct instillation) and local tumors. For deep tissues, systemic administration in the bloodstream via intravenous and subcutaneous injections is mandatory. Intravenous injections allow distribution through the whole bloodstream and avoid rapid hepatic clearance by the first-pass effect. The major disadvantage is the occurrence of frequent hypersensitivity reactions, that can be prevented by prophylactic antihistaminic treatment. Subcutaneous injections into adipose tissue are faster and easier to administrate, even by patients themselves. Molecules administered subcutaneously have a slower release into blood and can access circulation via capillaries or lymphatic drainage from interstitial space [10,16].

After systemic administration, active molecules disappear from the bloodstream by several ways. The most common one is through kidney clearance. Glomerular filtration allows water and small molecules (size < 8 nm) to pass into urine. This process of excretion concerns only naked siRNA because of its small size (less than 10 nm). On the other hand, siRNA vectorized into nanocarrier avoids renal clearance because of changes in its intrinsic properties. This would allow its retention in the blood circulation. The siRNA-nanovector can be uptaken by tissues of the mononuclear phagocyte system (MPS) after recognition by the monocytes and macrophages. These cells can phagocyte and degrade foreign molecules after their opsonization [17].

siRNA-loaded nanocarriers have to cross the bloodstream to reach the target tissue and achieve their inhibitory effect. This step is called extravasation. Knowledge and exploitation of the vascular characteristics of the target tissue are fundamental in the design and development of the vector that will carry the siRNA. Not all organs have the same accessibility, particularly depending on the endothelium surrounding them. For example, it is easier to reach the liver or some solid tumors, because there are surrounded by disjunct endothelial cells [18]. This endothelial specificity leads to passive accumulation of NPs > 100 nm in size. For tumor, this phenomenon, called “Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect” is due to uncontrolled angiogenesis and strong inflammatory reaction [19]. For other tissues/

organs, passive exit from the bloodstream is very limited due to continuous capillaries with constant endothelial cells and basal lamina. Only water and small molecules can easily diffuse [17]. In the nervous system, both blood-brain barrier (BBB) and the blood-nerve barrier (BNB) constitute an obstacle for drug delivery. In the brain, it is due to the continuous endothelium with tight junctions. However, transporters in the cerebral endothelial cells for hormones, amino acids and others, could facilitate the internalization of drugs [20]. In the peripheral nervous system, the perineurium and its projections into the endoneurium are responsible of the blood nerve barrier [21].

Once siRNA nanocarriers reach the targeted organs, a second limiting step appears, concerned with the uptake by the targeted cells within the tissues and endosomal escape to provide a silencing effect. Nanoparticles can enter the cells by different endocytosis mechanisms depending on their chemical structure, surface modification, surface charge and size. Macropinocytosis is a non-specific internalization mechanism, characterized by vesicles size from 100 nm to 5 µm. The mechanism is similar to phagocytosis, except that it can occur in all cells [22]. Clathrin- and caveolae-mediated endocytosis are both receptor-mediated endocytosis and are defined by internalization vesicles size of respectively, 120 and 80 nm [23]. The clathrin-endocytic pathway is used by several biological molecules, as lipoproteins and transferrin. Once the ligand attaches to its receptor, it triggers uptake inside the cells and endosome formation. The maturation of this internalization vesicle is correlated with a decrease of pH, the activation of enzymes involved in siRNA degradation and finally fusion with lysosome [24,25]. The ability of NPs to deliver their cargo in the cytoplasm is strongly determined by the mechanism through which they are taken up and how the siRNA goes from the endosome to the cytosol (named as endosomal escape) [26].

Finally, to elicit a biological response (Fig. 1), siRNA chemically modified or encapsulated in a cationic vector, have to circulate into the bloodstream and leave it, be internalized by the targeted cells, and escape from endosome before fusion with lysosome to bind to RISC complex.

3. siRNA vectorization for systemic delivery

3.1. Physical vectorization

Polyanionic siRNA is complexed with a nanomaterial as cationic lipid or cationic polymer via electrostatic interactions. Different generations of nanocarrier have been developed. The first generation is composed of simple nanovector that rapidly reach the MPS tissues mainly in the liver and spleen. The fast distribution into these tissues can be beneficial for the targeting of MPS organs. Otherwise, it can cause toxicity and treatment inefficiency [27]. To address this issue, these nanocarriers can be coated with highly flexible, hydrophilic and neutral polyethylene glycol (PEG) chains. This second generation vector, is also called “stealth nanovector”, because this coating permits to avoid opsonization by MPS cells, reducing non-specific interaction and therefore, improve their circulation time. The challenge here is to control the concentration of PEG surrounding the nanoparticle. A high concentration of polymer chains can reduce cellular uptake and siRNA delivery. Additionally, it causes a size increase of the siRNA nanocarrier, preventing uptake in some organs surrounded by continuous endothelium but allowing accumulation in sites where the endothelial barrier is fenestrated as liver, spleen and tumors with high EPR [15]. The distribution profile of siRNA nanocarriers could be improved by chemically modifying PEG chains through the addition of targeting ligands for specific interactions with receptor expressed at the targeted cells surface (third nanocarrier generation) [27,28].

3.1.1. Lipid nanoparticles (LNP)

Lipid NPs are one of the leading non-viral siRNA delivery nano-systems. There are composed of different lipid types, able to cross the

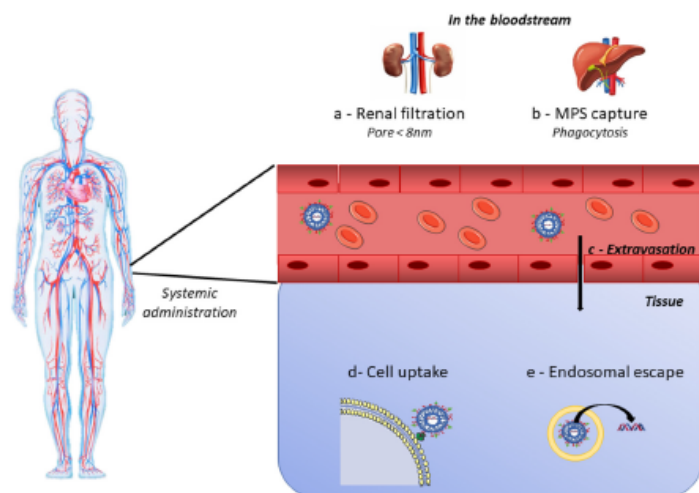


Fig. 1. Barriers to the delivery of siRNAs after systemic administration. After systemic injection, encapsulated siRNA (by physical or chemical interactions) has to avoid glomerular filtration (a) and phagocytosis by MPS cells (b). Once in the targeted tissue (c), it has to be internalized into the cell (d) and escape from endosome before degradation (e).

lipid bilayer of the cell membrane. We describe here the two main groups: the lipoplex or cationic liposome and the stable nucleic acid lipid particle (SNALP).

3.1.1.1. Liposome. Liposome are unilamellar or multilamellar vehicles composed of lipid bilayer, entrapping hydrophilic and lipophilic drugs [29,30]. Some liposomal formulations of different active molecules have been FDA-approved and show to be effective in maintaining high plasma concentrations of low bioavailable drugs with hydrophilic feature or to reduce toxicity, like the antineoplastic doxorubicin molecule (Doxil[®], PEGylated liposome) [31].

Cationic lipids interact via electrostatic interactions between their positive charges carried by the polar head and polyanionic siRNA, leading to “lipoplex” formation. Positive surface charges are advantageous for siRNA encapsulation, cell uptake and endosomal escape by binding to negatively charged cell membrane. Two basic categories of cationic lipids exist: the monovalent as 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammoniumpropane (DOTAP) and multivalent as 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido) ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA), a lipid present in the commercial lipoplex Lipofectamine (ratio DOSPA/DOPE 3/1). Lipid structure also has significant influence on lipoplex efficiency and toxicity which could be prevented by lipid library construction approaches, developed to select efficient cationic lipid characterized by enhanced gene silencing and reduced toxicity [32]. Other lipid types are also incorporated into lipoplexes. The “helper lipids” such as 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) or cholesterol, facilitate siRNA complexation, increase liposome stability and decrease their toxicity. The fusogenic characteristic of DOPE explains its common use in lipoplex formulation as its “fusogenicity” contributes to cytoplasmic delivery of nucleic acids by breakdown of endosomal membrane [32–34].

PEGylated lipid can also be incorporated. The benefit of this incorporation has been demonstrated several times. Recently, Lee and Ahn [35] observed a significant difference in tumor accumulation of a PEGylated and non-PEGylated formulation. This cationic liposome is composed of 3β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholesterol (DC-chole) as cationic lipid and DOPE as helper. It encapsulates a siRNA against kinesin spindle protein (KSP), involved in cell cycle (formation of bipolar mitotic spindle during centrosome separation). Its inhibition induces mitotic arrest during cell cycle followed by apoptosis. The results were interpreted in three points. Firstly, intravenous

injection of PEGylated KSP siRNA-lipoplexes did not activate the immune system in immunocompetent mice, confirming the non-immunostimulatory effects of this formulation. Secondly, biodistribution differences were observed between PEGylated and non-PEGylated form: the PEGylation of the lipoplex increased its circulation time, by reducing renal excretion and scavenging in liver and led to higher tumor accumulation. Thirdly, systemic administration of PEGylated KSP siRNA-lipoplexes caused gene silencing, correlated with substantial tumor growth inhibition [35].

PEGylation improves significantly pharmacokinetic parameters but does not prevent siRNA nanocarrier accumulation in MPS organs (mainly liver). Therefore, adding a ligand at the nanoparticle surface allows to target other tissues such as placenta and glioma [36,37].

Placenta connects the embryo to the uterine wall ensuring its nutrition and respiration. It can be the cause of dysfunction like pre-eclampsia, characterized by hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation. The lack of preclinical models leads Yu et al., to develop a relevant model based on siRNA anti-H19X vectorized in arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-modified PEGylated liposome [36]. The efficient delivery of this formulation is possible because placenta possesses similar features to tumors including rich blood flow, rapid proliferation and overexpressed $\alpha v\beta 3$ integrin receptor, which could be targeted by RGD peptide.

Glioma is one of the most aggressive and lethal cancer with a 5-years survival rate less than 10%. To have an antineoplastic effect, the drug must cross the BBB to reach the brain and the cancerous cells. In 2016, Wei et al., were able to formulate a third generation liposome with specific ligand of transferrin receptor and encapsulated a siRNA to silence epidermal growth factor receptor (EGFR) expression [37]. The transferrin receptor (TfR) is expressed on brain endothelial cells and cerebral glioma cells, so the conjugation of a peptide binding TfR leads to a dual targeting: BBB and glioma. Therefore, a T7 peptide was designed to bind TfR with high affinity and has been added to cationic liposome surface. This active targeting shows high capacity *in vitro* to cross the BBB and to be uptaken by glioma cells. *In vivo*, intravenous injections of this nanoformulation lead to higher accumulation in the brain tumor, associated with a longer survival without side effect [37].

The active targeting permits also to reach a specific cell type in a tissue. A good example is Vitamin A-coupled liposome at the nanovector surface to target specific cells in the liver, the hepatic stellate cells, responsible for liver fibrosis. The intravenous injection with a

siRNA against HSP47 (heat shock protein 47; collagen-specific chaperone), completely resolved hepatic fibrosis and prolonged survival in rat using three models of liver cirrhosis (with dimethylnitrosamine, CCl4 or bile duct ligation) [38].

3.1.1.2. Stable nucleic acid lipid particle (SNALP). The positive charge explains the success of lipoplex in delivering siRNA to cells, but it is also a cause of adverse events, such as non-specific interactions with negatively charged serum components [39]. Nowadays, new formulations are developed based on nanocarriers with distinct physico-chemical properties from lipoplex [30]. The stable nucleic acid lipid particles (SNALP) are composed of a lipid bilayer containing a lipids mixture of: i) *pH sensitive ionizable lipids* that are optimized in order to have a pKa polar head of around 7, allowing a neutral charge at physiological pH and, a cationic part at low pH allowing better siRNA condensation during nanocarrier formation and allowing a good siRNA release of the endosome. In blood circulation, the SNALP is uncharged, stable with an increased plasmatic half-life and a reduced toxicity, compared to lipoplexes [15]; ii) *Helper lipids* that contribute to the stability and delivery efficiency of the particle, enabling cellular uptake and endosomal release of siRNA [40] and, iii) *Shielding lipids*, PEGylated lipids used to stabilize particle and to provide a neutral hydrophilic surface. It increases circulation time into the blood and decreases uptake by MPS cells. Shielding lipid can be served as an anchor for a targeting ligand [30].

SNALP formation procedure is divided in three steps. Firstly, liposomes are prepared by injection of 40% ethanol solution containing lipid, into an acidic buffer (pH = 4). The resulting liposomes have a positive charge and a high membrane permeability, allowing siRNA to bind to the inner cationic membrane. The last step consists of removing the siRNA by dialysis against neutral buffer [32,40,41].

Different ionizable lipid exists. Alnylam Pharmaceuticals developed a novel type named "lipidoid". This "lipid-like material" is composed of a polar core surrounded by short hydrophobic carbon tails. The link between the different chemical groups is easily biodegraded by esterases [42].

Another interesting ionizable lipid –named malate deshydrogenase– contains a nitroimidazole chemical function linking the hydrophobic tails (whose nitro group from is converted to amino group in hypoxic conditions) and the polar head containing tertiary amines function protonable at low pH [43]. Tumor environment is hypoxic (partial pressure of oxygen near 0 mmHg) and acidic (pH < 7). Thus, the combination of this lipid with 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[aminopolylethylene glycol]-2000 (DSPE-PEG2000) and cholesterol leads to liposome formation named MLP and has the unique feature to be "doubling" positive in hypoxic tumor microenvironment [43]. Polo-like kinase 1 (PLK1) is a serine/threonine protein kinase, highly expressed in glioma tissues. PLK1-targeted siRNA has been encapsulated in MLP and injected intravenously *in vivo*. The safety of the formulation is demonstrated on heart, liver, lung and kidney with no-noticable tissue damages. MLP siRNA PLK1 shows also an effective inhibition of tumor growth *in vitro* and *in vivo* and seems to be a promising siRNA delivery for cancer treatment [43].

Other monogenic pathologies can be cured by siRNA such as thrombotic and hemostatic disorders. The coagulation factors are synthesized by the liver. SNALP was prepared by dissolving ionizable amino lipid, cholesterol, DSPE and PEG2000 and then assembled with different siRNA duplexes depending on animal models. Indeed, two common models for thrombosis and hemostasis study were used: rat model with siRNA anti-kallikrein and rabbit model with siRNA anti-factor X [44]. In both species, the lipidic formulation was well tolerated after single intravenous injection and exerted selective mRNA expression inhibition of over 90% until 7 days in the liver [44].

3.1.2. Polymeric nanocarriers

For siRNA vectorization, few polymers have been used and even less

have reached clinical stages. Contrary to LNP, polymeric nanocarriers contain only cationic polymers with no hydrophobic moiety and are fully soluble in water. Two polymer categories can be distinguished: synthetic (polyethyleneimine (PEI) or dendrimers) and natural (cyclodextrin, chitosan) [45,46].

3.1.2.1. Synthetic polymer. PEI is the most successful and widely studied polymer for oligonucleotide delivery due to its good cell membrane interaction, high cellular uptake and endosomal escape rate by the "proton sponge effect" [47]. The efficiency of different types of PEI depends on their chemical characteristics in terms of molecular weight and structure. Branched PEI in low molecular weight (25 kDa) is usually used *in vitro* for nucleic acid transfection. When PEI is bioconjugated to siRNA, delayed cytotoxicity was noticed after their cell internalization. This could be explained by the fact that after siRNA release, cationic charges of free PEI can disturb cellular process, leading to several changes such as reduced cell size, decrease of mitosis number and of cytoplasm vacuolization [39,41]. *In vivo*, PEI cannot be used because of its non-specific interaction with serum protein leading to aggregation and toxicity [39].

However, strategies to reduce toxicity and improve pharmacokinetic parameters, while retaining its potent transfection ability, are in development. They mainly concern surface modification. Administration of mixed micelles composed of methotrexate conjugated to PEI linked to a fatty acid, the linolenic acid, and siRNA against survivin (an apoptotic inhibitor) showed elevated tumor uptake and significant tumor growth inhibition. This co-delivery formulation may be a model for future anticancer bi-therapy in order to overcome some drug resistance and increases antineoplastic efficiency [48]. Moreover, another study proved that lipidation of PEI-based polyplex improved serum stability of siRNA, leading to an efficient delivery into orthotopic hepatocellular carcinoma xenograft tumors [49].

Apart from PEI, dendrimers, which are well-defined globular structures with low polydispersity index, are also frequently studied for nucleic acid delivery. The most commonly used, polyaminated dendrimers (PANAMs), can interact with siRNA to form dendriplexes, leading to efficient transfection *in vitro* and *in vivo* [50]. Despite their biocompatibility, they lack biodegradability and interact with blood components, resulting in toxicity when injected *in vivo*. Adding PEG chains to dendriplexes is one possibility to improve pharmacokinetic parameters and reduce toxicity [50]. This concept was successfully applied to target BACE1 (β -site APP cleavage enzyme 1) responsible for the accumulation of age-related amyloid-beta β peptide characterizing Alzheimer's disease [51]. It has been shown that inhibition of this enzyme reduced the amyloid-beta β peptide deposition and improved neurodegenerative and behavioral deficits in transgenic mice [52]. However, intracerebral administration of small or large molecules is very invasive. Therefore, a recent study was conducted to specifically deliver, by intravenous injection, a siRNA anti-BACE1 to neuronal cells [51]. The PEGylated polymer Poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) is known for its low toxicity. This nanomaterial has been coupled with cingulin peptide, a brain targeting ligand, to cross the BBB and, Tet-1 to target neuronal cells by binding on GT1B gangliosides. The bi-functionalized polyplex was injected intravenously and inhibited BACE1 expression inside the neurons. Moreover, the four injections of siRNA at 240 μ g cumulative dose succeeded in restoring cognitive performance of transgenic mice, similarly to wild-type. These results are encouraging and demonstrate the capacity of polymer to cross the BBB and achieve silencing to treat neurodegenerative disorders [51].

Nowadays, a commercially available lipid polymers was also used for *in vivo* siRNA delivery in the peripheral nervous system to treat the Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease [53]. CMT is the most common hereditary neurogenic disorders with a prevalence of 1:2500 worldwide. This pathology is no curable, only supportive care are available for the patients [54,55]. The cause is mutations in Schwann cells genes

leading to demyelination of peripheral nerves [56] [57]. Several genes are found to be involved in the CMT development. The most common subtype is CMT1A, caused by duplication of peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene, responsible for formation and maintenance of compact myelin [54,55]. Moreover, a mutation within this gene (Leu16Pro) is reliable to CMT1E development, therefore, a specific siRNA against one mutant allele of PMP22 gene, encapsulated in a commercial lipid polymers showed notable results. This formulation restored peripheral nerves myelination by the Schwann cells and improved the motor activity in the treated mice compared to the control [53]. These studies are promising and highlight the potentiality of RNAi molecules to treat non-hepatic or tumoral pathologies.

3.1.2.2. Natural polymer. Natural cationic polymers as chitosan and cyclodextrin are considered safer for oligonucleotides delivery. The polysaccharide chitosan is derived from chitin, usually found in crustacean exoskeleton. Its biocompatibility and biodegradability explain the study of this polycationic polymer for siRNA delivery. Compared to PEI, *in vitro* transfection efficiency is lower but it can be modified in order to optimize *in vivo* siRNA delivery. The most widely used approach is the PEGylation. The advantage of PEGylated chitosan is its high solubility, increased stability in the biological environment and reduced non-specific interaction [58]. Recently, survivin targeted siRNA loaded in PEGylated chitosan, showed higher antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo* in a breast cancer model compared to naked siRNA [59].

Cyclodextrins are neutral cyclic oligosaccharides. Accordingly, the team of Pr. Davis did chemical modifications to make them cationic [60–62]. Then, the nanoparticle surface has been modified by PEGylation and conjugated to transferrin to target specifically tumor cells [63,64]. A siRNA targeting the fusion oncogene, EWS-FLI1, present in 85% of Ewing's sarcomas, has been encapsulated in this functionalized polyplex. The formulation showed a strong anti-tumor activity *in vivo*, without any observations of toxicity or immune system stimulation [65].

3.1.3. Common limits of lipidic- and polymeric- siRNA nanocarriers

All of these formulations are the most commonly used to encapsulate siRNA in the past decades. However, they shared some disadvantages (Table 1) that can explain their non-approval by the health authorities until recently (Onpatro®, first siRNA drug encapsulated in a SNALP and approved in August 2018) [6].

Firstly, electrostatic interactions between the polyanionic siRNA and cationic carrier are considered weak and the risk of siRNA "burst release" just after systemic administration exists which can induce non-specific side effects and no siRNA efficiency [28].

Secondly, PEGylation is a strategy to escape MPS system and to extend plasmatic half-life of siRNA nanocarrier. Additionally to the size

increase induced by PEG chains, Ishida *et al.*, observed an "accelerated blood clearance" after repeated injections of PEGylated liposome [66]. Indeed, due to anti-PEG antibody synthesis after two injections, PEGylated liposomes were rapidly cleared from the blood circulation [67]. This resulted in the loss of long-circulating characteristic of the 2nd generation vector and faster excretion. Some hypersensitivity reactions related to complement activation have also been observed after repeated injection of a PEG-liposomal doxorubicin [66–69].

Thirdly, high numbers of cationic nanomaterials (lipidic or polymeric) have to be used to entirely encapsulate the siRNA and this is considered to be the main cause of toxicity. For example, PEI exhibits a dose-dependent toxicity, which may explain why it has not been used yet in clinical trials. Its toxicity depends on its physico-chemical characteristics. Indeed, high-molecular weight PEI is more toxic and even more if branched because of a high cell internalization [41]. Cationic lipids are divided in three parts: polar head-group, a linker and hydrophobic tails (Fig. 2). All can affect the cytotoxicity in a dose-dependent manner but toxic effects are mainly determined by the head-group chemical structure. Positive charges are responsible for non-specific interaction with anionic serum proteins, leading to unfavorable aggregation, clearance through the MPS system - mainly the liver - and of lower efficiency compared to *in vitro* results. Cationic nature of SNALP depends on the biological environment. However, the toxicity related to cationic charges (at acidic pH) is not negligible and remains a significant hurdle [39,45].

Most of the cationic NPs contain several excipients as polymer or lipid, PEG chains, ligand. Each additional component is another toxic risk and adds a difficulty to characterize precisely the nanovector [16,41]. Obviously, systemic and non-specific toxicity is reduced when nanoparticle surface is modified by the conjugation of a ligand targeting a specific receptor. Nevertheless, it is important to keep in mind that this ligand targets a receptor overexpressed in specific cells and therefore can also be uptaken by non-targeted cells expressing the same receptor but at another level [27].

Nanocarrier toxicity is not limited to the cytoplasm or biological fluids. It can also occur in the nucleus, where the modulation of gene expression alteration by chemical compounds is called as toxicogenomic. Akhtar and his colleagues demonstrated that polymeric and lipidic nanocarriers are able to alter cell gene expression, with consequences on cell phenotype and siRNA efficiency [70].

3.2. Chemical modification: siRNA conjugates

Even if the first therapeutic approved siRNA are encapsulated in a SNALP, their development is declining, because of the disadvantages cited above (Table 1). In order to avoid them, chemists and galenists searched for a novel way to deliver siRNA [71]. They modified the siRNA by linking it covalently to different molecules as lipid, aptamer,

Table 1
Advantages and disadvantages of siRNA physical and chemical encapsulation.

		Advantages	Disadvantages
Physical encapsulation	Common to all generations	Good cell internalization Possibility of cell targeting Studied for a long time	Burst release Toxic effects of cationic groups Gene expression alteration
	First generation Second generation « Stealth nanovector »	Improvement of pharmacokinetic parameters	Fast uptake by MPS cells Accelerated blood clearance due to PEG antibody synthesis
	Third generation Active targeting	Biodistribution improvement	Impossibility to target only a specific cell type
Chemical encapsulation		Equi-molar amounts of delivery material and siRNA Conjugation to different types of molecules No need for complexation with cationic lipids or polymers	Poor delivery efficacy compared to particle-based systems siRNA more exposed and vulnerable to enzyme nucleases blood Poorer knockdown efficiency <i>in vitro</i> Cost of the scale up Impossibility to target only a specific cell type

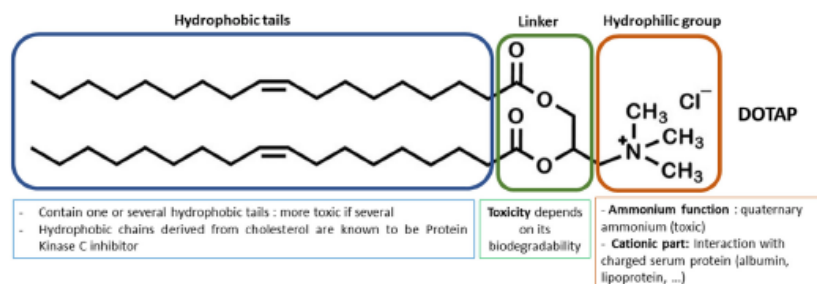


Fig. 2. Schematic representation of cationic lipid and its associated toxicity. DOTAP is 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammoniumpropane, a common cationic lipid used for siRNA delivery.

carbohydrate, and others [72,73]. As for physical encapsulation, siRNA bioconjugation changes its intrinsic characteristics and decreases its hydrophilicity in favor of the ligand lipophilicity, which changes some pharmacokinetics parameters. It improves its plasmatic half-life and its biodistribution depending on the linked molecule. Indeed, it is possible to link ligands targeting specific cells as hepatocytes, cancer cells. The link occurs usually on the sense strand to enhance RISC attachment and the keeping of the guide strand (the siRNA active part). Thus, the bioconjugate can be injected by themselves and so no additive cationic molecules will be administered. Compared to cationic nanocarriers, these formulations decrease the siRNA toxicity *in vivo* but render it more vulnerable and exposed to serum nucleases [72].

3.2.1. Conjugation to cholesterol

Different lipid types have been linked to siRNA to improve plasmatic half-life and intracellular uptake. Cholesterol is one of the major component of cell membrane and precursor of steroid hormones such as testosterone or cortisol. As mentioned above, it is usually used as a helper lipid in lipoplex to facilitate siRNA condensation, increase liposome stability and decrease cationic toxicity. In blood, lipoprotein (mainly low density lipoprotein LDL and high density lipoprotein HDL) carry the cholesterol to the different organs. Cholesterol-siRNA bioconjugates bind to these lipoproteins and are delivered to tissues expressing lipoprotein receptor, mainly the liver and cancer cells [74]. The first reported systemic administration of cholesterol-siRNA conjugate was at a higher dose (50 mg/kg) compared to liposomal nanosystems (less than 10 mg/kg) [75]. Efforts have been exerted to improve siRNA potency and delivery efficiency. Chernikov et al. [76] developed an anti-MDR1 siRNA-cholesterol NPs, that showed efficient silencing for 8 days before recovery of initial expression level, in cancer xenograft overexpressing the MDR1 gene. After intravenous injection, siRNA-cholesterol bioconjugates spread throughout all mice bloodstream and accumulated mainly in the liver and kidney (but to a lesser extent than with non-conjugated siRNA) in healthy mice. In mice bearing xenograft tumor, the lower renal clearance induced a higher drug accumulation within the tumor thanks to the EPR effect. However, when the siRNA-cholesterol bioconjugates were injected subcutaneously, the biodistribution of the formulation showed that it remained at the injection point and was not distributed in the mice organs [76].

The biotech company Arrowhead Pharmaceuticals, developed formulations with siRNA conjugated to cholesterol. The first one, named DynamicPolyConjugates (DPC), was composed of cholesterol-siRNA against Apolipoprotein B or factor VII genes. The cholesterol-siRNA bioconjugates were co-injected with a hepatocyte-targeted ligand (*N*-acetyl-galactosamine) linked to endosomal polymer (poly(butyl-aminovinyl ether) or PBAVE) [77]. This formulation allowed an efficient endosomal escape via polymer protonation, resulting in a significant decrease of siRNA dose injected in mice (500-fold less than that usually used) and a high gene silencing effect [77].

The second DPC formulation is constituted by cholesterol-conjugated siRNA but co-injected with the hepatocyte-targeted ligand *N*-acetyl galactosamine linked to melitin-like peptide (NAG-MLP). Melitin is a peptide component of bee venom, frequently used as endosomolytic agent and fully biodegradable. Two hepatitis B virus (HBV) targeted siRNA have been designed, conjugated to cholesterol and co-injected with 6 mg/kg of NAG-MLP to HBV transgenic mice. It leads to silencing more than 85% of targeted HBV mRNA, decreased significantly viral protein production and inhibited viral replication. This co-injection is well tolerated, all serum parameters are normal and no cytokine/chemokine secretions are detected [78,79].

3.2.2. Conjugation to galactose derivative

Nowadays, most of siRNA drug-candidates in clinical development are oligonucleotides modified by conjugation to *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). This carbohydrate is a galactose derivative, which has an enhanced binding affinity on the asialoglycoprotein-receptor. This receptor is a C-type lectin receptor allowing the clearance of circulating glycoprotein via clathrin-mediated endocytosis followed by receptor recycling. It is highly expressed in the hepatocyte membrane, some subunits have been found in human thyroid, large intestine, renal epithelium, testis and blood monocytes [80].

The most successful formulation has been developed by Alnylam Pharmaceuticals in various range of hepatic disorders [80–84].

Small interfering RNA have been covalently conjugated to a triantennary GalNAc sugar and successfully delivered to the liver [82]. In contrast to all previous presented siRNA nanocarriers, these molecules are injected subcutaneously. The link between chemically modified siRNA to GalNAc results in bioconjugates with high systemic stability and improved pharmacokinetics. Moreover, a higher liver accumulation was detected when it is injected subcutaneously compared to intravenous route that paralleled with robust and durable targeted gene silencing [82]. For example, siRNA targeted rodent transthyretin (TTR) has been successfully linked to triantennary GalNAc and demonstrated a relevant gene silencing after a single dose administration from 1 to 5 mg/kg. The chronic injections of an effective dose of 1 mg/kg over 280 days resulted in sustained pharmacological effect without toxicity, indicating the possibility to treat chronic disease [81,82].

The same formulation was also applied to treat primary hyperoxaluria, an autosomic recessive inborn error of metabolism, caused by mutation on alanine glyoxylate aminotransferase (AGT) gene leading to deficiency of this hepatic enzyme (Fig. 3). It induces high oxalate production, which will form calcium oxalate crystals in kidney and urinary tract, blocks urine elimination and leads to a progressive kidney disease that could be extended to other organs. No cure is available except liver transplantation after years of dialysis and vitamin B6 supplementation [85]. Herein, the authors inhibit by siRNA conjugated to GalNAc (named ALN-GO1) the expression of hepatic enzyme upstream of AGT, the glyoxylate oxidase (GO). Four weekly subcutaneous

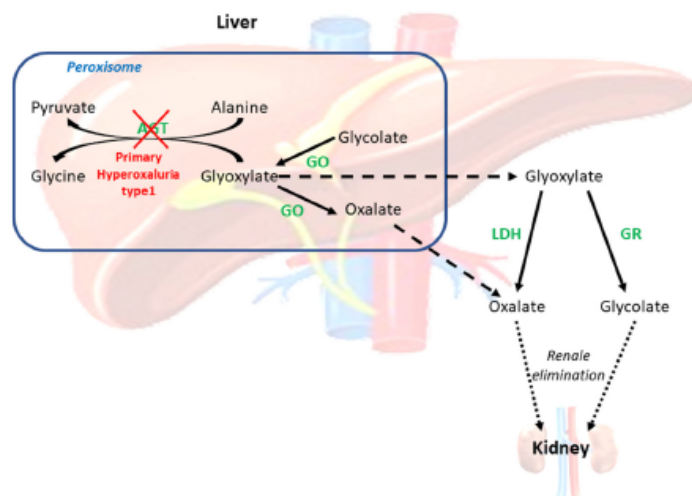


Fig. 3. Endogenous oxalate pathway in hepatocytes and primary hyperoxaluria type 1. AGT, alanine glyoxylate aminotransferase; GO, glyoxylate oxidase; LDH, lactate dehydrogenase; GR glyoxylate reductase.

injections of ALN-GO1 (from 0,3 to 3 mg/k for 14 days) in rodent with primary hyperoxaluria, silenced more than 95% of GO mRNA and inhibited urinary oxalate accumulation. In healthy non-human primates, subcutaneous injection of ALN-GO1 (single injection at 4 mg/kg) completely abolished GO mRNA up to 15 days [83,85].

General toxicology studies have also been performed for all siRNA-GalNAc bioconjugates, in two species: one rodent and one non-human primate. Rats are known to be more sensitive to detect hepatic toxicity. At high doses, asialoglycoprotein receptor is saturated and the siRNA-GalNAc excess is eliminated by the kidney. Histologically, hepatocellular vacuolation has been observed after one injection per week during 3 weeks in rats at doses ≥ 30 mg/kg (30- to 300-fold greater than efficient pharmacological doses) but without significant clinical changes. Interestingly, this observation has not been detected in non-human primate even at the highest repeated dose tested [80].

3.2.3. Conjugation to aptamer

Aptamer is a short single-strand oligonucleotide with a unique three-dimensional structure, that allows binding and uptake by specific cells when the targeted receptor is expressed. It has low production cost, minimal nonspecific toxicity and immunogenicity [86]. It has already been shown that aptamer conjugates have intracellular uptake via receptor-mediated endocytosis and efficient gene silencing *in vitro* and *in vivo* [72,86]. Aptamer-conjugated siRNA were first described in 2006 [87]. Passenger strand of siRNA is covalently linked to A10 aptamer targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA) expressed in LNCaP prostate cancer cells. Cell internalization of this formulation and efficient anti-cancer activity correlated with gene silencing were observed [87,88]. More recently in another study, bivalent PSMA aptamer allows the delivery of two different siRNAs silencing EGFR whose expression is associated with bone metastasis formation, and survivin which is an inhibitor of apoptosis protein family. This bi-combinatorial formulation leads to effective delivery to xenograft mice model, where it significantly suppressed tumor growth and angiogenesis [89]. Despite promising results in different diseases, no aptamers-mediated siRNA deliveries are under clinical trials. It can be explained by the lack of in-depth pharmacokinetic/pharmacodynamic and toxicities studies [86,90].

3.2.4. Common limits of siRNA bioconjugates

These bioconjugate formulations have been developed to overcome some undesirable effects of cationic lipid and polymer, such as the burst release and toxicity risk associated with cationic charges in order to have easier formulation (with only one component). Nevertheless, as physically encapsulated siRNA, conjugates may also have some disadvantages that can limit their clinical translation (Table 1) [91]. Indeed, compared to the “physical” encapsulation, siRNA conjugates have poorer silencing effects *in vitro* that can impede translation to develop preclinical and clinical studies [72]. Another limit, is the cost of the “scale-up” to have enough quantities of siRNA bioconjugates for clinical development. The “scale-up” nanoformulation has to respond to good manufacture’s practice and to the same quality control than the non-“scale-up” siRNA conjugate, meaning same size distribution, morphology and efficiency. The translation to clinics will depend on this step and on cost of the final product [91,92]. We should also keep in mind that the conjugated siRNA may be more exposed to serum nucleases than encapsulated siRNA and therefore have a lowest bioavailability due to unfavorable pharmacokinetic, leading to higher dose injected [72].

4. Therapeutic applications – overview of some clinical trials

Some of the formulations passed successfully all preclinical development steps, proving that they were found safe enough and efficient enough to be administered to patients whether they have been successfully translated to clinical phases or not. According to FDA website, the aim of clinical trials is to “test the potential treatments in human volunteers” in terms of safety, tolerance and efficiency.¹

We focused on different interesting drug candidates, which were or are currently in phase I, II or III clinical trials (Table 2).

¹ <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/conducting-clinical-trials>, accessed 26 December 2019

Table 2
Selected siRNA-based drug candidates in clinical trials.

Name	Delivery method: administration mode	Indication: target	Clinical phase	NCT number	Status	Study start	Study completion	Sponsor company	Comments	
Physical vectorization	Atad27	Liposome: intravenous injection	Advanced solid tumor: PKN3	phase I	NCT00938574	Completed	June 2009	September 2012	Siience Therapeutics	
	Patisirán	SNALP: intravenous injection	Tramethyresine amyloidosis	phase I/II	NCT01808638	Completed	March 2013	January 2016	Alnylam Pharmaceuticals	First siRNA nanocarrier approved by health authorities in United States
			Tramethyresine amyloidosis	phase II	NCT01617967	Completed	May 2012	January 2014		
			Tramethyresine amyloidosis	phase III	APOLLO	Completed	November 2013	August 2017		
	Cyclohexin polyplex: intravenous injection	Solid tumor: RRM2	phase I	NCT01960348	Terminated	May 2008	September 2012	Calando Pharmaceuticals	First proof of concept of siRNA efficiency in human, not continued because of toxicity	
Chemical vectorization	ARC-520	Cholesterol conjugated siRNA: subcutaneous injection	Chronic Hepatitis B: hepatitis B virus transcripts	phase I	NCT01872005	Completed	July 2013	November 2014	Arrowhead Pharmaceuticals	Ended clinical trial due to toxicity on the formulation
	ARO-HBV	N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA: subcutaneous injection	Chronic Hepatitis B: hepatitis B virus transcripts	phase II	NCT02349126	Withdrawn	February 2015	March 2016		
	ARO-AAT	N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA: subcutaneous injection	Alpha-1 antitrypsine (AAT) deficiency: AAT	phase I/II	NCT0365947	Recruiting	March 2018	September 2020	Arrowhead Pharmaceuticals	
				phase I	NCT0362242	Active, not recruiting	March 2018	September 2019	Arrowhead Pharmaceuticals	
				phase II	NCT03946449	Recruiting	November 2019	November 2021		
				phase II/III	NCT03945252	Recruiting	August 2019	May 2023		
Revsiran	N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA: subcutaneous injection	Tramethyresine amyloidosis	phase I	NCT01814839	Completed	March 2013	May 2015	Alnylam Pharmaceuticals	Discontinued clinical trial because of higher mortality rate in treated group compared to placebo	
			phase II	NCT01981837	Completed	December 2013	January 2015			
			phase III	NCT02319005	Completed	December 2014	March 30, 2017			
ALN-G01 (Lumasiran)	N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA: subcutaneous injection	Primary hyperoxaluria type 1: glycolate oxidase	phase I/II	NCT02706886	Completed	March 2016	January 2019	Alnylam Pharmaceuticals	Change in backbone chemistry (by comparison with Revsiran) to have more potency and safety of siRNA bioconjugates	
			phase II	NCT03050451	Enrolling by invitation	November 2017	September 2021			
			phase III	NCT03681184	Active, not recruiting	November 2018	May 2024			

Abbreviations: siRNA target PKN3 protein kinase 3, RRM2 ribonucleotide reductase subunit M2, AAT alpha-1 antitrypsine.

4.1. Lipid nanoparticles

4.1.1. Lipoplex

Atu027 is a liposomal siRNA formulation, composed of an anti-protein kinase 3 (PKN3; downstream effector of phosphatidylinositol 3 kinase) siRNA encapsulated with a new cationic lipid AtuPECT01 in combination with helper and PEG-modified lipids. It proved its efficiency in different cancer models (orthopic mouse models for prostate and pancreatic tumors) with significant tumor growth inhibition and changes in tumor lymphatic vasculature [93] without elevated systemic levels of immune cytokines (IFN- α or IL12) [94]. These results led to the clinical development of this novel lipoplex in oncology. The first-in-human phase I study on Atu027 started in 2009 on thirty-four patients with the aim to evaluate the safety, the tolerability, as well as the pharmacokinetic and therapeutic effects on primary tumors and metastatic lesions. Atu027 was considered to be well tolerated with only low-grade toxicities (1 and 2) and safe for patients with advanced solid tumors. Tumor growth was even stable in 41% patients [95]. A new phase I/II (NCT01808638) started in 2013. During this stage, Atu027 has been co-administered (one or two times per week) with the chemotherapeutic drug, gemcitabine. Twice weekly injection of Atu027 at a dose of 0.253 mg/kg with gemcitabine significantly increased patient survival compared to the single injection per week. In addition to this antineoplastic efficacy, patients' quality of life improved [96]. However, no follow-up was available since 2016.

4.1.2. SNALP

Transthyretin amyloidosis is a rare progressive disease caused by the abnormal deposition of transthyretin amyloid in various organs, including peripheral nerves. Patients suffer mainly from progressive neuropathy and cardiomyopathy with median survival less than 15 years after diagnosis. TTR is a circulating protein synthesized by the liver, its role is to carry mainly retinol (vitamin A) and in a lower proportion, thyroid hormone (thyroxine). The gene encoding for TTR can be mutated, resulting in protein misfolding and aggregation to form amyloid fibrils that will deposit in tissues. No curative treatment existed before the Onpatro[®] approval. Onpatro[®], commercialized by Alnylam Pharmaceuticals, is composed of patisiran, siRNA targeted mutant and wild-type TTR in the 3'-untranslated region of the mRNA and vectorized in a SNALP. The lipid components of this formulation include the ionizable amino lipid DLin-MC3-DMA, PEGylated lipid 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (PEG2000-C-DMG), a polar lipid 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) and cholesterol. In the bloodstream, PEGylated lipids are removed and replaced by serum protein such as apolipoprotein E, inducing hepatocyte internalization [16,97]. The receptor-mediated endocytosis leads to endosome acidification, inducing re-ionization of the main ionizable lipid and liberation of the siRNA in the cytoplasm. In non-human primate, which has the same TTR sequence as human, injection of patisiran induced efficient knockdown after single dose of 0.1–0.3 mg/kg that prevents protein deposition [98]. Besides, TTR silencing was more effective than tafamidis, the gold treatment used to inhibit products of the Val³⁰Met mutation of TTR gene [98,99]. Taking together these results, the patisiran passed successfully phase II [99,100] then phase III [6,7]. During these studies, it showed its non-toxicity and its efficiency in decreasing circulating TTR and improving patients' quality of life [7,100]. Six years after clinical studies beginning, drug-candidate was approved by the European Medicine Agency (EMA) and FDA bringing new hope for patients with hereditary transthyretin amyloidosis [6].

Another formulation has been also developed by Alnylam Pharmaceuticals but instead of being complexed in a LNP, the TTR-targeted siRNA is conjugated to triantennary GalNAc. This nanovector is amenable to less permissive administration mode (subcutaneous) and has been named revusiran. Preclinical studies demonstrated efficiency and non-toxicity in rodent and non-human primate species [98,99]. Phase I clinical trial (NCT01814839) did not display severe adverse

effects, except those caused by the injection (mostly mild to moderate injection site reactions and one severe with erythema > 10 cm) [101]. Phase II (NCT01981837) confirmed the previous results but phase III (ENDEAVOUR; NCT02319005) was dismissed before the end due to report of peripheral neuropathy. Moreover, an increase in lactate concentration and mortality imbalance were observed between treated patients and placebo group [102,103]. Post-trial investigations did not link the higher mortality in the treatment arm at the revusiran but did not totally exclude that this molecule have a toxicity² [16]. Formulation has been improved by chemical modifications on siRNA sequence and is currently in phase III clinical trial (Vutrisiran; NCT03759379).

4.2. Polyplex

Cyclodextrin is a nontoxic and non-immunostimulant cyclic oligomer of glucose. Formulation with linear cationic cyclodextrin-based polymer, PEG chains and transferrin receptor ligand has been developed for siRNA delivery [104]. Encapsulation in this polyplex of siRNA targeted ribonucleotide reductase subunit M2 (RRM2) leads to reduced tumor growth and gene expression silencing [104]. Preclinical toxicity studies in non-human primate displayed, at the highest dose (27 mg/kg), mild increase in transaminases and elevated blood urea nitrogen and creatinine, correlated with hepatic- and renal-toxicity respectively. Mild immune stimulation has also been detected at this dose (increased IL-6 levels in all animals). However, no clinical signs of toxicity have been observed; therefore it is used in clinical studies at lowest doses (efficient dose in non-human primates, 0.6–1.2 mg/kg) to avoid biological toxicity [105]. The phase I study conducted by Dr. Heidel at Calando Pharmaceuticals started in May of 2008 (NCT00689065), was the first to show that multi-siRNA injections could be safely and successfully accomplished in a non-rodent species and after then in human [5,105]. Indeed, the targeted nanovector denoted as CALAA-01, accumulated preferentially in human metastatic melanoma tumors in a dose-dependent manner due to its targeted ligand and inhibited RRM2 expression [106]. Unfortunately, phase IB was ended prematurely because of toxicity due to the long-term drug instability [106,107].

4.3. siRNA conjugates

These formulations aim to reduce toxicity due to cationic charges and are actually used to treat several hepatic disorders.

The eradication of hepatitis B virus was found to be unachievable in the case of chronic infection because the virus integrates the genome [108]. ARC-520 is developed by Arrowhead Pharmaceuticals and is composed of two HBV targeted siRNA conjugated to cholesterol and co-injected with 6 mg/kg of endosomolytic agent (NAG-MLP) to provide effective endosomal escape [78]. This promising formulation went into phase I clinical trial and was injected to healthy volunteers to assess its safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics. No serious side effects were found [109]. The phase I/II clinical trial started in 2015 and showed a significant efficiency of ARC-520 with a reduction of Hepatitis B antigen up to 57 days [110]. However, the clinical phases were stopped prematurely, due to toxicity concerns, after non-human primate death in preclinical studies³ [16,111].

The company, Arrowhead Pharmaceuticals, developed a new bio-conjugation method, named "Targeted RNAi Molecules (TRiM) technology" that can be injected subcutaneously. This time, the siRNA is directly linked to *N*-acetylgalactosamine but the specific structure is not yet published. ARO-HBV is one of the first molecule derived from "TRiM technology" and as for ARC-520, is composed of two siRNA

² <https://www.genengnews.com/news/after-18-deaths-in-phase-iii-alnylam-halts-revusiran-development/>, accessed 30 December 2019

³ <https://xconomy.com/wisconsin/2016/11/09/arrowhead-stock-falls-after-fda-places-hold-on-clinical-trial/>, accessed 30 December 2019

silencing HBV transcript and its integrated form, leading to reduce virus resistance to treatments and cure from the infection. Phase I/II of this drug candidate started in 2018 and study completion normally occurs in January 2020 (NCT03365947) [112]. It should be noted that another formulation is under development for deficiency in alpha-1 antitrypsin (OMIN code 613490) which is an inherited and well-defined disease that can trigger pulmonary and liver disorders [113,114].

After revusiran failure, Alnylam Pharmaceuticals continued the research and focused on changing the backbone chemistry (from standard template chemistry to enhanced stabilization chemistry platform by adding phosphorothioates linkages at the 5'-end of both strands) [82]. This leads to a more stable and safe GalNAc-conjugate siRNA [111]. Five drug-candidates are accounted currently in clinical studies: i) vutrisiran (phase III; NCT03759379) for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis, ii) lumasiran (phase III; NCT03681184) for the treatment of primary hyperoxaluria type 1 (PH1), iii) fitusiran (phase III; NCT03754790) for the treatment of hemophilia, iv) inclisiran (phase III; NCT03814187) for the treatment of hypercholesterolemia and, v) cemisiran (phase II; NCT03999840) for the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome.

ALN-GO1, also called lumasiran, is a siRNA-bioconjugated to triantennary GalNAc to treat the PHL pathology (Fig. 3), which is a rare autosomal recessive disease (OMIN code 259900) [115,116]. The impressive efficiency results in animal models (mice, rat and non-human primate) opened the door for clinical trials [83]. Phases I/II started in 2016. Urinary oxalate level decreased substantially after the first dose. The results showed that the treatment was well-tolerated among the patients with PHL. No drug-related severe adverse effects were observed. The majority of side effects were mild to moderate and unrelated to the drug candidate.⁴ The same patients were enrolled into phase II open-label extension and then in phase III (ILLUMINATE-A) which is currently ongoing in adult and children (NCT03681184).⁵

On November 20, 2019, the first-ever GalNAc-conjugate siRNA (givosiran, commercial name Givlaari®) has been approved by the FDA (followed in January 2020 by the EMA) for the treatment of a rare inherited hepatic pathology, the acute hepatic porphyria [8].⁶

5. What is next?

Therapeutic RNAi history spans over different eras. In 1998, its discovery paved the way for a new therapeutic field, which started development in the beginning of the 2000s (2005 to 2008). It was a lavish period for RNAi research, notably thanks to the Nobel Prize in 2006. Unfortunately, uncertainties about the real therapeutic effect of siRNA in human (more due to immunostimulatory effects than silencing) accompanied by bad investments by pharmaceutical companies, led to a funding crisis in early 2010s. Development of new nanomaterial less toxic, more efficient and RNAi efficiency demonstration in silencing targeted genes (proof of concept by CALAA-01) allowed a recovery of the pharmaceutical industries in this field [117–119]. Twenty years after RNAi discovery by Fire and his colleagues, the first siRNA drug has been approved by the FDA and opens a new era for RNAi research and development. However, some challenges still need to be addressed related to: 1) the lifelong administration of encapsulated siRNA in term of toxicity and 2) the enlargement of the treatment for non-hepatic or tumor pathologies.

The first challenge concerns toxicity due to a lifelong administration that can be developed by the siRNA and essentially the vector. Natural

lipids such as cholesterol and derivatives [72] or exosomes [120] could represent a safer solution.

One of the interesting cholesterol derivative is the squalene (SQ) that adopts a pickled shape in the hydrophobic pocket of the enzyme inducing its cyclisation in lanosterol (involved in the cholesterol synthesis metabolism). This unique conformation in aqueous medium oriented the interest of chemists and galenists to link it to small vulnerable active molecule in order to protect it from degradation and improve pharmacokinetics parameters [121–123]. This new technology has been successfully transposed to siRNA against fusion oncogenes: RET/PTC1 and RET/PTC3 found in papillary thyroid carcinoma and TMPRSS2-ERG observed in prostate cancer. The bioconjugates siRNA-SQ have been injected intravenously to mice. Each nanoformulation showed significant tumor growth inhibition correlated with fusion oncogene expression silencing [124–129].

Exosomes are extracellular vesicles excreted by different types of cells that mimic natural liposomes produced by human cells. They offer a more potent and safer alternative to synthetic NPs [120]. Preclinical studies proved their efficiencies in KRAS siRNA delivery to mouse models of pancreatic cancer with an increase of survival rate [130]. The major hurdle to overcome with this new nanocarrier is to be able to prepare good manufacturing practice exosomes during the scale-up. The same team of the MD Anderson Cancer Center develops a bio-reactor capable of generating engineered exosome carrying KRAS siRNA and to produce them at large scale [131]. This nanoformulation is currently in phase I clinical trial against pancreatic cancer (NCT03608631).

The second challenge concerns the siRNA-treatment expansion to other non-hepatic and tumoral pathologies. Indeed, aside from these tissues, it is difficult to cure diseases occurring in other organs because of lower blood flow and non-fenestrated endothelium. Few preclinical studies were able to study the effect of siRNA nanocarriers when crossing the BBB or the BNB and none were so far translated to clinical studies [51] [53]. Reaching the central-nervous and the peripheral nervous systems is important, because there is no cure for several pathologies including brain cancer (glioma), ischemic stroke and neurodegenerative diseases.

Most of the strategies used to cross the BBB are receptor-mediated delivery [37,51], but another way to reach the brain is to inject in the cerebrospinal fluid by intrathecal injection. Drug injected by this administration mode goes directly to the brain without crossing the BBB. Alnylam Pharmaceuticals reported recently preclinical results in CNS-targeted RNAi drug candidates with achievement of gene silencing after one intrathecal injection of siRNA-conjugate in rodent and non-primate human animal models. The company did not precise the vector linked to the siRNA.⁷ The injection route is usually well-tolerated but it is an invasive method, patients have to be hospitalized. Therefore, there is a need of nanocarrier development for the aim of using an easier route [132]. However, for the peripheral nervous system, drugs including siRNA, can be injected systemically [53,133].

6. Conclusion

Since its discovery in 1998, RNAi has been considered as a powerful therapeutic mechanism because of the high specificity and efficiency of siRNA, to silence a targeted gene. However, to achieve therapeutic success, this oligonucleotide molecule has to overcome some delivery barriers. To this end, it has to be modified by conjugation to a molecule or entrapped in a cationic vector. The success story of Onpatro®, the first approved siRNA-based drug encapsulated in cationic vector opens new avenues. However, the actual tendency is more oriented to chemical conjugation of the siRNA and is confirmed by the recent approval

⁴ https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2017/11/Lumasiran-ASN-Capella-Slides_FINAL11032017.pdf, accessed 30 December 2019

⁵ <https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2019/04/Lumasiran-Phase-2-OLE-1SN-2019.pdf>, accessed 30 December 2019

⁶ <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-givosiran-acute-hepatic-porphyrria>, accessed 11 February 2020

⁷ <https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2019/04/Milstein-CSHL-Olgosv6.pdf>, accessed 30 December 2019

of the Givlaari®.

Next years will be crucial. First, to see the very long-term efficiency and safety of siRNA drug and secondly, to develop new safe nano-carriers able to reach other non-liver or non-tumor tissues. RNAi has not yet revealed its full therapeutic potential and new siRNA-based drugs will be soon marketed by the pharmaceutical industry.

Funding

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (Labex NanoSaclay, reference: ANR-10-LABX-0035). Méviedette El Madani is grateful for the Financial support of the National Research Center, Cairo Egypt during her postdoctoral fellowship.

References

- J.K. Lam, M.Y. Chow, Y. Zhang, S.W. Leung, siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4 (2015) e252.
- A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (1998) 806–811.
- S.M. Elbaidi, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes Dev.* 15 (2001) 188–200.
- D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliarsky, D.W. Sah, RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs, *Nat. Chem. Biol.* 2 (2006) 711–719.
- M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature* 464 (2010) 1067–1070.
- D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W.D. O’Riordan, C.C. Yang, M. Ueda, A.V. Kristen, I. Tournebise, H.H. Schmidt, T. Coelho, J.L. Berk, K.P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Plante-Burdeneuve, M.M. Mezei, J.M. Campistol, J. Budes, T.H. Brannagan 3rd, B.J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P.N. Hawkins, S.D. Solomon, M. Polydefkis, P.J. Dyck, P.J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A.L. Strahs, S.V. Nochor, M.T. Sweeter, P.P. Garg, A.K. Vaidnaw, J.A. Gollob, O.B. Suhr, et al., *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 11–21.
- D. Adams, O.B. Suhr, P.J. Dyck, W.J. Litchy, R.G. Leahy, J. Chen, J. Gollob, T. Coelho, Trial design and rationale for AFOLLO, a phase 3, placebo-controlled study of patisiran in patients with hereditary ATTR amyloidosis with polyneuropathy, *BMC Neurol.* 17 (2017) 181.
- L.J. Scott, Givosiran: first approval, *Drugs* 80 (3) (2020) 335–339.
- S.M. Elbaidi, J. Martinez, A. Pañkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *EMBO J.* 20 (2001) 6877–6888.
- K. Tatiparti, S. Sau, S.K. Kashaw, A.K. Iyer, siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments, *Nanomaterials (Basel)* 7 (2017).
- K.A. Whitehead, R. Langer, D.G. Anderson, Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 129–138.
- D.W. Bartlett, M.E. Davis, Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging, *Nucleic Acid Res.* 34 (2006) 322–333.
- B. Ozpolat, A.K. Sood, G. Lopez-Berestein, Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 110–116.
- J.D. Thompson, D.J. Kornbrust, J.W. Foy, E.C. Solano, D.J. Schneider, E. Feinstein, B.A. Molitoris, S. Erlich, Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified siRNAs targeting p53 RNA following intravenous administration, *Nucleic Acid Ther.* 22 (2012) 255–264.
- R. Kanasty, J.R. Durkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery materials for siRNA therapeutics, *Nat. Mater.* 12 (2013) 967.
- R.L. Setten, J.J. Rossi, S.P. Han, The current state and future directions of RNAi-based therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (6) (2019) 421–446.
- R.L. Kanasty, K.A. Whitehead, A.J. Vegas, D.G. Anderson, Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles, *Mol. Ther.* 20 (2012) 513–524.
- D. Haussecker, Current issues of RNAi therapeutics delivery and development, *J. Control. Release* 195 (2014) 49–54.
- Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent *5-fluorouracil*, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387.
- R. Cecchelli, V. Berезowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renfel, M.P. Debouck, L. Penart, Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 650–661.
- S. Peltanen, M. Alame, J. Peltanen, Barriers of the peripheral nerve, *Tissue Barriers* 1 (3) (2013) e24956-1–e24956-6.
- S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (2003) 37–44.
- A. Alhadad, C. Durieu, G. Dantelle, E. Le Cam, C. Mahy, F. Treussart, J.R. Bertrand, Influence of the internalization pathway on the efficacy of siRNA delivery by cationic fluorescent nanodiamonds in the Bwing sarcoma cell model, *PLoS One* 7 (2012) e25207.
- S.F. Dowdy, Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 35 (2017) 222–229.
- K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel, A.J. Hendriks, Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 481–492.
- M. Durymanov, J. Reineke, Non-viral delivery of nucleic acids: insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 971.
- S.M. Moghimi, J. Szekely, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Prog. Lipid Res.* 42 (2003) 463–478.
- T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48.
- J.C. Kraft, J.P. Freeling, Z. Wang, R.J. Ho, Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 29–52.
- S.A. Barros, J.A. Gollob, Safety profile of RNAi nanomedicines, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1730–1737.
- S. Tran, P.J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai, Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery, *Clin. Transl. Med.* 6 (2017) 44.
- Y. Xia, J. Tian, X. Chen, Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery, *Biomaterials* 79 (2016) 56–68.
- S. Antimisiaris, S. Mourtas, K. Papsadia, Targeted si-RNA with liposomes and exosomes (extracellular vesicles): how to unlock the potential, *Int. J. Pharm.* 525 (2017) 293–312.
- J. Heyes, L. Palmer, K. Brenner, I. MacLachlan, Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Control. Release* 107 (2005) 276–287.
- J. Lee, H.J. Ahn, PEGylated DC-Chol/DOPE cationic liposomes containing KSP siRNA as a systemic siRNA delivery carrier for ovarian cancer therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503 (2018) 1716–1722.
- Q. Yu, Y. Qiu, X. Wang, J. Tang, Y. Liu, L. Mei, M. Li, M. Yang, L. Tang, H. Gao, Z. Zhang, W. Xu, Q. He, Efficient siRNA transfer to knockdown a placenta specific lncRNA using RGD-modified nano-liposome: a new preclampsia-like mouse model, *Int. J. Pharm.* 546 (2018) 115–124.
- L. Wei, X.Y. Guo, T. Yang, M.Z. Yu, D.W. Chen, J.C. Wang, Brain tumor-targeted therapy by systemic delivery of siRNA with transferrin receptor-mediated core-shell nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 510 (2016) 394–405.
- Y. Sato, K. Murase, J. Kato, M. Kobune, T. Sato, Y. Kawano, R. Takimoto, K. Takada, K. Miyazaki, T. Matsumoto, T. Takayama, Y. Niitsu, Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 431–442.
- H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J. Control. Release* 114 (2006) 100–109.
- X. Cheng, R.J. Lee, The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 129–137.
- H.Y. Xue, S. Liu, H.L. Wong, Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine, *Nanomedicine (London)* 9 (2014) 295–312.
- K.A. Whitehead, J.R. Durkin, A.J. Vegas, P.H. Chang, O. Vekich, J. Matthews, O.S. Fenton, Y. Zhang, K.T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer, D.G. Anderson, Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4277.
- H.M. Liu, Y.F. Zhang, Y.D. Xie, Y.F. Cai, B.Y. Li, W. Li, L.Y. Zeng, Y.L. Li, R.T. Yu, Hypoxia-responsive ionizable liposome delivery siRNA for glioma therapy, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 1065–1083.
- Z. Chen, B. Luo, T.Q. Cai, A. Tharakan, Y. Xu, W. Wu, J. Dimuzio, T. Lifested, M. DiPietro, J. Dias, B. Ng, K. Leander, S. Clark, L. Hoos, Y. Zhou, N. Jochowitz, C. Jachec, P. Szczepka, M.E. Gindy, W. Strapps, L. Sepp-Lorenzino, D.A. Seiffert, L. Lubbers, M. Tadin-Strapps, Proof-of-concept studies for siRNA-mediated gene silencing for coagulation factors in rat and rabbit, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4 (2015) e224.
- S. David, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery, *Pharmacol. Res.* 62 (2010) 100–114.
- A. George, P.A. Shah, P.S. Shrivastava, Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: a review, *Int. J. Pharm.* 561 (2019) 244–264.
- J.-P. Behr, The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit, *CHIMIA Int. J. Chem.* 51 (1997) 34–36.
- F. Hao, R.J. Lee, C. Yang, L. Zhong, Y. Sun, S. Dong, Z. Cheng, L. Teng, Q. Meng, J. Lu, J. Xie, L. Teng, Targeted co-delivery of siRNA and methotrexate for tumor therapy via mixed micelles, *Pharmaceutics* 11 (2019).
- Q.Y. Zhang, P.Y. Ho, M.J. Tu, J.L. Jilek, Q.X. Chen, S. Zeng, A.M. Yu, Lipidation of polyethyleneimine-based polyplex increases serum stability of bioengineered RNAi agents and offers more consistent tumoral gene knockdown in vivo, *Int. J. Pharm.* 547 (2018) 537–544.
- S.K. Adesina, E.O. Akala, Nanotechnology approaches for the delivery of exogenous siRNA for HIV therapy, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 4175–4187.
- P. Wang, X. Zheng, Q. Guo, P. Yang, X. Pang, K. Qian, W. Lu, Q. Zhang, X. Jiang, Systemic delivery of BACE1 siRNA through neuron-targeted nanocomplexes for treatment of Alzheimer’s disease, *J. Control. Release* 279 (2018) 220–233.
- O. Singer, R.A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N.G. Coufal, F.H. Gage, I.M. Verma, E. Madihah, Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 1343–1349.
- J.S. Lee, E.H. Chang, O.J. Koo, D.H. Jwa, W.M. Mo, G. Kwak, H.W. Moon, H.T. Park, Y.B. Hong, B.O. Choi, Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo, *Neurobiol. Dis.* 100 (2017) 99–107.
- A.K. Reinhold, H.L. Rittner, Barrier function in the peripheral and central nervous systems, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 469 (2017) 123–134.

- [155] B.W. van Raaijen, A.J. van der Kooij, K.Y. van Spendonck-Zwarts, C. Verhamme, F. Baas, M. de Visser, FMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, *Orphanet. J. Rare Dis.* 9 (2014) 38.
- [156] I. Sargiamidou, A. Kagiava, K.A. Kleopa, Gene therapy approaches targeting Schwann cells for demyelinating neuropathies, *Brain Res.* 2020 (1728) 146572.
- [157] J. Morena, A. Gupta, J.C. Hoyle, Charcot-Marie-Tooth: from molecules to therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
- [158] G. Cavallaro, C. Sardo, E.F. Craparo, B. Puriso, G. Giammona, Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: production and applications, *Int. J. Pharm.* 525 (2017) 313–333.
- [159] P. Sun, W. Huang, M. Jin, Q. Wang, B. Fan, L. Kang, Z. Gao, Chitosan-based nanoparticles for survivin targeted siRNA delivery in breast tumor therapy and preventing its metastasis, *Int. J. Nanomedicine* 11 (2016) 4931–4945.
- [160] S.J. Hwang, N.C. Belloq, M.E. Davis, Effects of structure of β -Cyclodextrin-containing polymers on gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 280–290.
- [161] M.E. Davis, S.H. Pun, N.C. Belloq, T.M. Reineke, S.R. Popielanski, S. Mishra, J.D. Heidel, Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 179–197.
- [162] S. Mishra, J.D. Heidel, P. Webster, M.E. Davis, Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes, *J. Control. Release* 116 (2006) 179–191.
- [163] S.H. Pun, M.E. Davis, Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 630–639.
- [164] N.C. Belloq, S.H. Pun, G.S. Jensen, M.E. Davis, Transferrin-containing cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 1122–1132.
- [165] S. Hu-Lieskova, J.D. Heidel, D.W. Bartlett, M.E. Davis, 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 ewings@039> Sarcoma, *Cancer Res.* 65 (2005) 8984.
- [166] T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada, Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes, *J. Control. Release* 112 (2006) 15–25.
- [167] A. Judge, K. McClintock, J.R. Phelps, I. MacLachlan, Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes, *Mol. Ther.* 13 (2006) 328–337.
- [168] J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz, Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1020–1030.
- [169] A.S. Abu Lila, T. Ishida, Anti-PEG IgM production via a PEGylated nanocarrier system for nucleic acid delivery, *Methods Mol. Biol.* 1943 (2019) 333–346.
- [170] S. Akhtar, I. Benter, Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 164–182.
- [171] Y. Weng, H. Xiao, J. Zhang, X.-J. Liang, Y. Huang, RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 801–825.
- [172] S.H. Lee, Y.Y. Kang, H.E. Jang, H. Mok, Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 104 (2016) 78–92.
- [173] O.C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.N. Tran, D.A. Lavan, R. Langer, Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 7668–7672.
- [174] C. Wolfrum, S. Shi, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R.K. Pandey, K.G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charise, E.M. Ndungu, T. Zimmermann, V. Kotliarsky, M. Manoharan, M. Stoffel, Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1149–1157.
- [175] J. Soutchek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charise, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjanska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotliarsky, S. Limmer, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature* 432 (2004) 173–178.
- [176] I.V. Chernikov, D.V. Gladikh, M.I. Meschaninova, A.G. Ven'yaminova, M.A. Zenkova, V.V. Vlasov, E.L. Chernolovskaya, Cholesterol-containing nuclease-resistant siRNA accumulates in tumors in a carrier-free mode and silences MDR1 gene, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 6 (2017) 209–220.
- [177] S.C. Wong, J.J. Klein, H.L. Hamilton, Q. Chu, C.L. Frey, V.S. Trubetskoy, J. Hegge, D. Wakefield, D.B. Rozema, D.L. Lewis, Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo, *Nucleic Acid Ther.* 22 (2012) 380–390.
- [178] C.I. Wooddell, D.B. Rozema, M. Hossbach, M. John, H.L. Hamilton, Q. Chu, J.O. Hegge, J.J. Klein, D.H. Wakefield, C.E. Oropeza, J. Decker, I. Rohl, K. Jahn-Hofmann, P. Hadwiger, H.P. Vornlocher, A. McLachlan, D.L. Lewis, Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, *Mol. Ther.* 21 (2013) 973–985.
- [179] M.G. Sebestyen, S.C. Wong, V. Trubetskoy, D.L. Lewis, C.I. Wooddell, Targeted in vivo delivery of siRNA and an endosome-releasing agent to hepatocytes, *Methods Mol. Biol.* 1218 (2015) 163–186.
- [180] M.M. Janas, C.E. Harbison, V.K. Perry, B. Carito, J.E. Sutherland, A.K. Vaishnav, N.D. Keirstead, G. Warner, The nonclinical safety profile of GalNAc-conjugated RNAi therapeutics in subacute studies, *Toxicol. Pathol.* 46 (2018) 735–745.
- [181] J.K. Nair, H. Attarwala, A. Sehgal, Q. Wang, K. Aluri, X. Zhang, M. Gao, J. Liu, R. Indrakanti, S. Schofield, P. Kretschmer, C.R. Brown, S. Gupta, J.L.S. Willoughby, J.A. Bosbar, V. Jadhav, K. Charise, T. Zimmermann, K. Fitzgerald, M. Manoharan, K.G. Rajeev, A. Akinc, R. Hutabarat, M.A. Maier, Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 10969–10977.
- [182] J.K. Nair, J.L. Willoughby, A. Chan, K. Charise, M.R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandamsey, A.V. Ke'lin, S. Milstein, N. Tamejs, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R.J. van der Sluis, M.E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T.J. van Berkel, M.A. Maier, K.G. Rajeev, M. Manoharan, Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 16958–16961.
- [183] A. Liebow, X. Li, T. Racie, J. Hettinger, B.R. Bettencourt, N. Najjafian, P. Haslett, K. Fitzgerald, R.P. Holmes, D. Erbe, W. Querbes, J. Knight, An investigational RNAi therapeutic targeting glycolate oxidase reduces oxalate production in models of primary hyperoxaluria, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2017) 494–503.
- [184] J.S. Butler, A. Chan, S. Costelha, S. Fishman, J.L.S. Willoughby, T.D. Borland, S. Milstein, D.J. Foster, P. Goncalves, Q. Chen, J. Qin, B.R. Bettencourt, D.W. Sah, R. Alvarez, K.G. Rajeev, M. Manoharan, K. Fitzgerald, R.E. Meyers, S.V. Nochur, M.J. Saraiva, T.S. Zimmermann, Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis, *Amyloid* 23 (2016) 109–118.
- [185] K.D. Wood, R.P. Holmes, J. Knight, RNA interference in the treatment of renal stone disease: Current status and future potentials, *Int. J. Surgery (London, England)* 36 (2016) 713–716.
- [186] S. Krause, P.H. Giangrande, Aptamer-siRNA Chimeras: discovery, progress, and future prospects, *Biomedicine* 5 (2017).
- [187] J.O. McNamara 2nd, E.R. Andrechek, Y. Wang, K.D. Wiles, R.E. Rempel, E. Gilboa, B.A. Sullenger, P.H. Giangrande, Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1005–1015.
- [188] B.L. Davidson, All in the RNA family, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 951–952.
- [189] H.Y. Liu, X. Yu, H. Liu, D. Wu, J.K. She, Co-targeting EGFR and survivin with a bivalent aptamer-dual siRNA chimera effectively suppresses prostate cancer, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30346.
- [190] W. Alshahr, H. Hillaireau, J. Vergnaud, S. Mira, C. Delomenie, F. Sauvage, S. Ismail, E. Fattal, Aptamer-guided siRNA-loaded nanomedicines for systemic gene silencing in CD-44 expressing murine triple-negative breast cancer model, *J. Control. Release* 271 (2018) 98–106.
- [191] I.V. Chernikov, V.V. Vlasov, E.L. Chernolovskaya, Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 444.
- [192] R. Paliwal, R.J. Babu, S. Palakurthi, Nanomedicine scale-up technologies: feasibility and challenges, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 1527–1534.
- [193] M. Aleku, P. Schulz, O. Keil, A. Santel, U. Schaefer, B. Dieckhoff, O. Janke, J. Endruschat, B. Durieux, N. Roder, K. Löffler, C. Lange, M. Fechtner, K. Mopert, G. Fisch, S. Dames, W. Arnold, K. Jochims, K. Giese, B. Wiedemann, A. Scholz, J. Kaufmann, Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression, *Cancer Res.* 68 (2008) 9788–9798.
- [194] A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Löffler, M. Fechtner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium, *Gene Ther.* 13 (2006) 1222–1234.
- [195] B. Schultheis, D. Strumberg, A. Santel, C. Vank, F. Gebhardt, O. Keil, C. Lange, K. Giese, J. Kaufmann, M. Khan, J. Dreves, First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 4141–4148.
- [196] B. Schultheis, D. Strumberg, J. Kuhlmann, M. Wolf, K. Link, T. Seufferlein, J. Kaufmann, F. Gebhardt, N. Bruyniks, U. Pelzer, A phase Ib/IIa study of combination therapy with gemcitabine and Atu027 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma, *J. Clin. Oncol.* 34 (2016) 385.
- [197] A. Akinc, W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, K.G. Rajeev, W.L. Cantley, J.R. Dorkin, J.S. Butler, L. Qin, T. Racie, A. Sprague, E. Fava, A. Zeigerer, M.J. Hope, M. Zerial, D.W. Sah, K. Fitzgerald, M.A. Tracy, M. Manoharan, V. Kotliarsky, A. Fougereles, M.A. Maier, Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms, *Mol. Ther.* 18 (2010) 1357–1364.
- [198] J.S. Butler, A. Chan, S. Costelha, S. Fishman, J.L. Willoughby, T.D. Borland, S. Milstein, D.J. Foster, P. Goncalves, Q. Chen, J. Qin, B.R. Bettencourt, D.W. Sah, R. Alvarez, K.G. Rajeev, M. Manoharan, K. Fitzgerald, R.E. Meyers, S.V. Nochur, M.J. Saraiva, T.S. Zimmermann, Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis, *Amyloid* 23 (2016) 109–118.
- [199] T. Coelho, D. Adams, A. Silva, P. Lozeron, P.N. Hawkins, T. Mant, J. Perez, J. Chiesa, S. Warrington, E. Tranter, M. Munisamy, R. Falzone, J. Harrop, J. Cehelsky, B.R. Bettencourt, M. Geisler, J.S. Butler, A. Sehgal, J.E. Meyers, Q. Chen, T. Borland, R.M. Hutabarat, V.A. Clausen, R. Alvarez, K. Fitzgerald, C. Gamba-Vitalo, S.V. Nochur, A.K. Vaishnav, D.W. Sah, J.A. Gollob, O.B. Suhr, Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 819–829.
- [100] O.B. Suhr, T. Coelho, J. Buaides, J. Pouget, I. Conceciao, J. Berk, H. Schmidt, M. Waddington-Cruz, J.M. Campistol, B.R. Bettencourt, A. Vaishnav, J. Gollob, D. Adams, Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study, *Orphanet. J. Rare Dis.* 10 (2015) 109.
- [101] T.S. Zimmermann, V. Karsten, A. Chan, J. Chiesa, M. Boyce, B.R. Bettencourt, R. Hutabarat, S. Nochur, A. Vaishnav, J. Gollob, Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate, *Mol. Ther.* 25 (2017) 71–78.
- [102] J.D. Gilmore, R.H. Falk, M.S. Maurer, M. Hamu, V. Karsten, J. Vest, J. Gollob, P.N. Hawkins, Phase 2, open-label extension (OLE) study of revusiran, an investigational RNAi therapeutic for the treatment of patients with transthyretin cardiac amyloidosis, *Orphanet. J. Rare Dis.* 10 (2015) 021.
- [103] K. Garber, Alnylam terminates revusiran program, stock plunges, *Nat. Biotechnol.*

- 34 (2016) 1213–1214.
- [104] J.D. Heidel, J.Y. Liu, Y. Yen, B. Zhou, B.S. Heale, J.J. Rossi, D.W. Bartlett, M.E. Davis, Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2207–2215.
- [105] J.D. Heidel, Z. Yu, J.Y. Liu, S.M. Rele, Y. Liang, R.K. Zeidan, D.J. Kornbrust, M.E. Davis, Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5715–5721.
- [106] J.E. Zuckerman, I. Grillo, A. Tolcher, J.D. Heidel, D. Lim, R. Morgan, B. Chmielowski, A. Ribas, M.E. Davis, Y. Yen, Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 11449–11454.
- [107] J.E. Zuckerman, M.E. Davis, Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 843–856.
- [108] C. Seeger, W.S. Mason, Molecular biology of hepatitis B virus infection, *Virology* 479–480 (2015) 672–686.
- [109] T. Schluep, J. Lickliter, J. Hamilton, D.L. Lewis, C.L. Lai, J.Y. Lau, S.A. Locarnini, R.G. Gish, B.D. Given, Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ARO520 injection, an RNA interference-based therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, in healthy volunteers, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 6 (2017) 350–362.
- [110] R.G. Gish, M.F. Yuen, H.L. Chan, B.D. Given, C.L. Lai, S.A. Locarnini, J.Y. Lau, C.L. Wooddell, T. Schluep, D.L. Lewis, Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent, *Antivir. Res.* 121 (2015) 97–108.
- [111] A.D. Springer, S.F. Dowdy, GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics, *Nucleic Acid Ther.* 28 (2018) 109–118.
- [112] C. Wooddell, R. Zhu, H. Hamilton, Q. Chu, H. Sternard, J. Schumacher, T. Schluep, M. Seefeld, Z. Li, B. Given, Development of subcutaneously administered RNAi therapeutic ARO-HBV for chronic hepatitis B virus infection, *J. Hepatol.* 68 (2018) S18–S19.
- [113] C. Wooddell, K. Blumenkamp, H. Chen, J. Griffin, R. Zhu, Q. Chu, H. Hamilton, J. Hegge, D. Christenson, Z. Li, J. Teckman, B. Given, ARO-AAT, a subcutaneous RNAi-based therapeutic for alpha-1 antitrypsin-related liver disease, demonstrates liver exposure-response and efficacy in preclinical studies, *J. Hepatol.* 68 (2018) S82.
- [114] A.M. Turner, J. Stolk, R. Bak, J.D. Lickliter, J. Hamilton, D.R. Christianson, B.D. Given, J.G. Burdon, R. Lomba, J.K. Stoller, J.H. Teckman, Hepatic-targeted RNA interference provides robust and persistent knockdown of alpha-1 antitrypsin levels in ZZ patients, *J. Hepatol.* 69 (2018) 378–384.
- [115] S.-A. Hultin, The primary hyperoxaluria: a practical approach to diagnosis and treatment, *Int. J. Surg.* 36 (2016) 649–654.
- [116] H. Bouzidi, A. Majloub, M. Dandon, M.F. Najjar, Hyperoxalurie primitive : une revue de la littérature, *Néphrologie Thérapeutique* 12 (2016) 431–436.
- [117] D. Haussecker, The business of RNAi therapeutics in 2012, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1 (2012) e8.
- [118] D. Haussecker, M.A. Kay, RNA interference. Drugging RNAi, *Science* 347 (2015) 1069–1070.
- [119] D. Haussecker, RNAi arrives at the bedside after a mere two decades, *Mol. Ther.* 26 (2018) 2533–2534.
- [120] S.G. Darband, M. Mirza-Aghazadeh-Attari, M. Kaviani, A. Mihanfar, S. Sadighparvar, B. Yousefi, M. Majidinia, Exosomes: natural nanoparticles as bio shuttles for RNAi delivery, *J. Control. Release* 289 (2018) 158–170.
- [121] P. Couvreur, L.H. Reddy, S. Mangenot, J.H. Poupart, D. Desmaële, S. Lepetre-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, M. Ollivier, Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenylation of an anticancer nucleoside analogue, *Small* 4 (2008) 247–253.
- [122] P. Couvreur, B. Stella, L.H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepetre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Boasquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J.-M. Renoir, L. Cattel, Squalenylation of nanomedicines as potential therapeutics, *Nano Lett.* 6 (2006) 2544–2548.
- [123] D. Desmaële, R. Gref, P. Couvreur, Squalenylation: a generic platform for nanoparticle drug delivery, *J. Control. Release* 161 (2012) 609–618.
- [124] M. Raouane, D. Desmaële, G. Urbinati, L. Massaad-Massaad, P. Couvreur, Lipid conjugated oligonucleotides: a useful strategy for delivery, *Bioconjug. Chem.* 23 (2012) 1091–1104.
- [125] H.M. Ali, A. Maksimenko, G. Urbinati, H. Chapuis, M. Raouane, D. Desmaële, H. Yasuhiro, H. Harashima, P. Couvreur, L. Massaad-Massaad, Effects of silencing the RET/PTC1 oncogene in papillary thyroid carcinoma by siRNA-squalene nanoparticles with and without fusogenic companion GALA-cholesterol, *Thyroid* 24 (2014) 327–338.
- [126] H.M. Ali, G. Urbinati, H. Chapuis, D. Desmaële, J.R. Bertrand, P. Couvreur, L. Massaad-Massaad, Effects of siRNA on RET/PTC3 junction oncogene in papillary thyroid carcinoma: from molecular and cellular studies to preclinical investigations, *PLoS One* 9 (2014) e95964.
- [127] G. Urbinati, H.M. Ali, Q. Rousseau, H. Chapuis, D. Desmaële, P. Couvreur, L. Massaad-Massaad, Antineoplastic effects of siRNA against TMPRSS2-ERG junction oncogene in prostate cancer, *PLoS One* 10 (2015) e0125277.
- [128] G. Urbinati, I. de Waziers, M. Slammic, T. Fousignière, H.M. Ali, D. Desmaële, P. Couvreur, L. Massaad-Massaad, Knocking down TMPRSS2-ERG fusion oncogene by siRNA could be an alternative treatment to flutamide, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 5 (2016) e301.
- [129] L. Massaad-Massaad, S. Boutary, M. Caillaud, C. Gracia, B. Parola, S.B. Gmouriya, B. Stella, S. Arpicco, E. Buchy, D. Desmaële, P. Couvreur, G. Urbinati, New formulation for the delivery of oligonucleotides using 'clickable' siRNA-polyisoprenoid-conjugated nanoparticles: application to cancers harboring fusion oncogenes, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 1961–1972.
- [130] S. Kamerkar, V.S. Lebleu, H. Sugimoto, S. Yang, C.F. Ruivo, S.A. Melo, J.J. Lee, R. Kalluri, Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, *Nature* 546 (2017) 498–503.
- [131] M. Mendt, S. Kamerkar, H. Sugimoto, K.M. McAndrews, C.C. Wu, M. Gages, S. Yang, E.V.R. Blanco, Q. Peng, X. Ma, J.R. Manszalek, A. Maistra, C. Yee, K. Rezvani, E. Shpall, V.S. Lebleu, R. Kalluri, Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer, *JCI Insight* 3 (2018).
- [132] K.M. Schoch, T.M. Miller, Antisense oligonucleotides: translation from mouse models to human neurodegenerative diseases, *Neuron* 94 (2017) 1056–1070.
- [133] H.T. Zhao, S. Damlé, K. Beedle-Lee, S. Kuntz, J. Li, A. Mohan, A. Kim, G. Hung, M.A. Scheidegger, S.S. Scherer, J. Svaren, E.E. Swayze, H.B. Kordasiewicz, PMF22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 359–368.

Web references

- [1] <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/conducting-clinical-trials>, accessed 26 December 2019.
- [2] <https://www.genengnews.com/news/after-18-deaths-in-phase-iii-a-nylam-halts-revirusan-development/>, accessed 30 December 2019.
- [3] <https://xconomy.com/wisconsin/2016/11/09/arrowhead-stock-falls-after-fda-places-hold-on-clinical-trial/>, accessed 30 December 2019.
- [4] https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2017/11/Lumasiran-ASN_Capella-Slides_FINAL11032017.pdf, accessed 30 December 2019.
- [5] <https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2019/04/Lumasiran-Phase-2-OLE-ASN-2019.pdf>, accessed 30 December 2019.
- [6] <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-givusiran-a-rare-hepatic-porphyrin>, accessed 11 February 2020.
- [7] <https://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2019/04/Miltecin-CSHL-Oligoc6.pdf>, accessed 30 December 2019.

Partie 3 : Interactions nanoparticules – protéines

Les nanoparticules (NPs) encapsulant les siRNA que cela soit par liaisons électrostatiques ou par couplage chimique, ont un ratio surface/volume très important induisant une énergie libre de surface élevée, ce qui va faciliter les interactions avec les molécules contenues dans les milieux biologiques (Monopoli, Åberg et al. 2012). Dans cette nouvelle partie, nous présentons quelles protéines sériques interagissent avec ces nano-éléments et avec quelles techniques nous pouvons les mettre en évidence.

I. Les interactions avec le sérum

Lors de l'injection de nanomatériaux dans le sang circulant, un assemblage va se produire avec des protéines sériques, comme cela a été suggéré dès 2007 par Cedervall et ses collègues. En effet, de façon instantanée, les composants du sérum vont former une couronne autour des NPs, qui est appelé « protein corona » en anglais (PC) (Cedervall, Lynch et al. 2007). La formation de la PC est instantanée et dynamique, il s'agit d'une compétition perpétuelle dans l'organisme entre les différentes protéines avec généralement dans un premier temps les protéines les plus abondantes du sérum puis dans un second temps, des protéines avec une affinité plus importante pour les NPs. Cette évolution dynamique en fonction du temps de circulation dans le sang est appelée « l'effet Vroman » (Vroman 1962, Docter, Strieth et al. 2015, Prozeller, Morsbach et al. 2019).

Ainsi, les protéines présentes dans les milieux biologiques vont de façon compétitive interagir à la surface des NPs pour former une *interface* « *bio-nano* » (Nel, Madler et al. 2009, Mahmoudi, Lynch et al. 2011). Cette interface est décrite en 3 composantes dynamiques évoluant dans la circulation. Tout d'abord, la surface de la nanoparticule (annotée 1 sur la figure 14) représentée par ses caractéristiques physico-chimiques comme sa taille, sa charge, son hydrophobicité ou hydrophilie ainsi que par sa composition chimique (surface fonctionnalisée ou non). Cette première composante est partiellement dépendante (pour la charge notamment) des caractéristiques du milieu biologique (présentes au niveau de l'annotation 2 et 3), à savoir son pH, sa température, force ionique, composition biologique (Nel, Xia et al. 2006).

L'interface bio-nano est donc un élément central puisque c'est à ce niveau que vont interagir les protéines sériques avec les nano-éléments injectés. Ces interactions sont faibles

et peuvent être de différentes natures : hydrodynamiques, électrodynamiques, stériques, électrostatiques et interactions avec le solvant (Figure 14) (Nel, Madler et al. 2009).

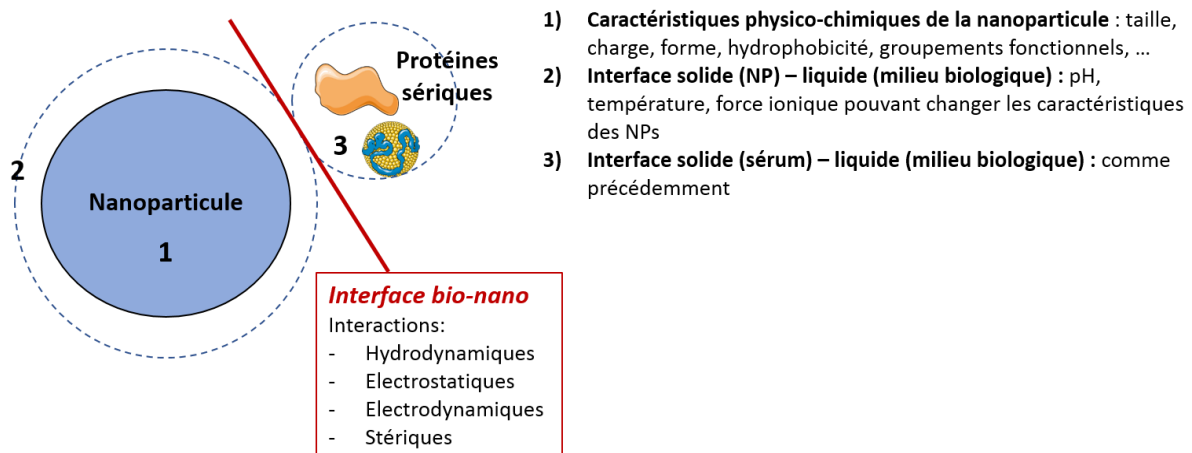


Figure 14 : Représentation de l'interface bio-nano et de ses composantes

Au sein de la PC, deux parties peuvent être différenciées (Figure 15). Tout d'abord, la « hard corona » : correspondant à la couche interne, elle regroupe quelques protéines qui ont une forte affinité pour la NP et dont la composition va peu évoluer au cours du temps (Mahmoudi, Lynch et al. 2011) Certains parlent également d'une « tightly corona », puisque ces protéines sont encore liées aux NPs après plusieurs lavages utilisant des solutions avec différentes forces ioniques (PBS puis 2M KCl) (Sakulkhu, Mahmoudi et al. 2014). La « soft corona » est une couche plus externe avec un taux d'échange protéique important puisque les protéines présentes ont une faible affinité pour la NP (Nguyen and Lee 2017).

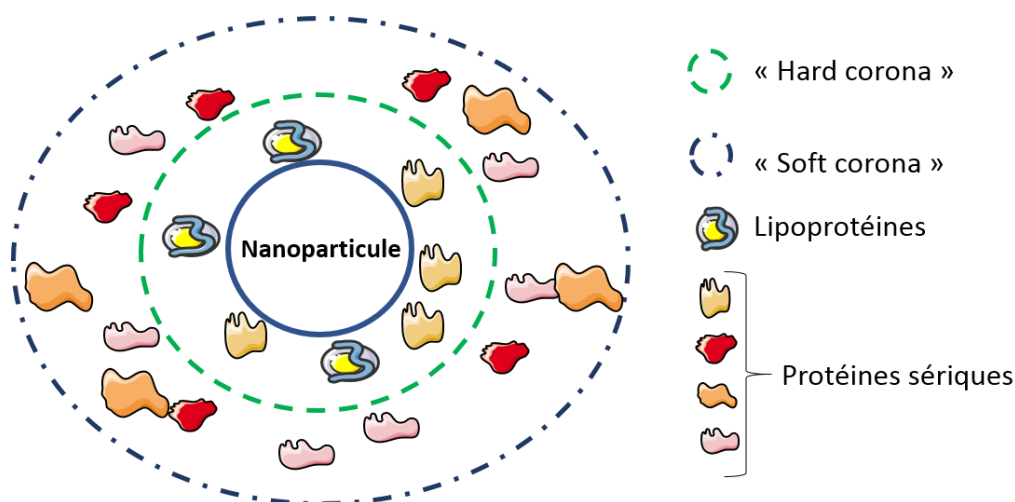


Figure 15 : Représentation schématique de la « protein corona »

A. Les protéines majoritaires du sérum

Il existe dans le sang environ 3700 protéines mais seulement une dizaine va interagir avec les NPs, généralement les plus abondantes du plasma (tableau 4) (Monopoli, Åberg et al. 2012). La partie suivante va s'intéresser à présenter les quatre principales.

Tableau 4 : Présentation des quatre protéines plasmatiques les plus abondantes

	Proportion dans le plasma	Concentration	Rôle
Albumine	>50%	35-44 g/L	Régulation de la pression osmotique Transport de molécules endogènes et exogènes
Immunoglobulines	9-18% (immunoglobulines G principalement)	5-12 g/L	Défense immunitaire
Lipoprotéines	8% (LDL principalement)	1,6-2 g/L	Transport du cholestérol et de molécules lipophiles
Fibrinogène	5%	2 – 4 g/L	Facteur I de la coagulation, se transforme en fibrine Rôle pro-inflammatoire

a) Albumine

L'albumine est la protéine la plus abondante du sérum avec une concentration moyenne de 42 g/L (632 μ M) pour un poids moléculaire de 66,44 kDa et une taille de 7,2 nm (Kratz 2008, Sleep 2015). Elle est synthétisée par le foie et a deux fonctions principales : maintien de la pression oncotique et du pH plasmatique mais aussi de transport de ligands endogènes et exogènes.

Dans la circulation sanguine, l'albumine passe facilement l'endothélium vasculaire pour aller dans les tissus avec une accumulation préférentielle pour les tissus inflammés ou les tumeurs (Hoogenboezem and Duvall 2018). Il existe différents récepteurs à l'albumine. Le principal est le récepteur GP-60, qui permet l'internalisation de la protéine par endocytose médiée par cavéolines. Les récepteurs GP-30 et GP-18 lient l'albumine modifiée afin d'amener à sa dégradation intracellulaire. **L'albumine a une longue demi-vie de 19 jours**, qui est en partie due au récepteur néonatal FcRn, largement distribué dans l'organisme et qui permet le recyclage de la protéine dans la circulation lymphatique. De plus, l'albumine évite la clairance rénale en se liant au complexe cubuline/mégaline, ce qui permet sa réabsorption rénale et son retour dans la circulation sanguine (Sleep 2015, Hoogenboezem and Duvall 2018).

Ces caractéristiques ont amené l'intérêt des chercheurs pour améliorer les paramètres pharmacocinétiques de molécules actives. L'un des exemples marquants est le Levemir®, qui est l'insuline modifiée par conjugaison à un acide gras ce qui permet la liaison *in vivo* avec l'albumine à 98% et ce qui augmente sa fenêtre d'efficacité jusqu'à 24h après l'administration SC (Kratz 2008, Sleep 2015).

Du fait d'une angiogenèse incontrôlée entraînant la formation de pores > 100 nm dans l'endothélium vasculaire et d'un drainage lymphatique non fonctionnel, l'albumine s'accumule préférentiellement dans les tissus tumoraux, expliquant le succès clinique de l'Abraxane® (Ibrahim, Desai et al. 2002, Yardley 2013). La formulation galénique est la suivante : la molécule chimiothérapeutique, paclitaxel, est mixée avec l'albumine et l'ensemble est homogénéisé à haute pression pour former des NPs d'une taille de 130 nm. Ces NPs ont montré une meilleure efficacité *in vitro* et *in vivo*, couplée à une diminution de la toxicité observée avec le paclitaxel seul et une amélioration des paramètres pharmacocinétiques.

b) Lipoprotéines

Les **lipoprotéines** sont les **troisièmes protéines les plus abondantes du sérum** (Schumaker and Adams 1969). Elles sont composées d'une partie lipidique et de protéines spécifiques, les apolipoprotéines (Apo), qui ont pour rôle de stabiliser l'émulsion et sont les ligands des récepteurs aux lipoprotéines (Wasan, Brocks et al. 2008). Le cœur des lipoprotéines (LPs) est constitué de triacylglycérols et de cholestérols estérifiés tandis que des phospholipides sont présents à l'extérieur avec les Apo et le cholestérol non modifié. **Les LPs sont ainsi impliquées dans le transport sanguin des lipides et notamment du cholestérol** (Rensen, de Vrueh et al. 2001).

Il existe quatre LPs distinctes en fonction de leur densité, taille et de l'Apo présente en surface (Figure 16). Après digestion, le cholestérol et les lipides sont véhiculés tout d'abord par les chylomicrons de l'intestin à différentes cellules de l'organisme jusqu'au foie. Les very low density lipoproteins (VLDL) transportent ensuite ces deux constituants, du foie pour les distribuer dans l'organisme. Dans le plasma, les triglycérides sont hydrolysés par les lipases, diminuant la quantité de lipides dans les VLDL ainsi que leur taille et amenant à la formation des low-density lipoproteins (LDL). Les LDL sont responsables du transport de 75% du cholestérol sanguin. A la fin de ce métabolisme, les high density lipoproteins (HDL) apparaissent et sont responsables du transport reverse du cholestérol des tissus périphériques au foie (Mahley, Innerarity et al. 1984). Tout au long de ce métabolisme, les LPs

vont interagir avec différents types cellulaires grâce au récepteur des lipoprotéines, qui va internaliser ces vésicules lipidiques par endocytose médiée par clathrine (Charbonnier 2010).

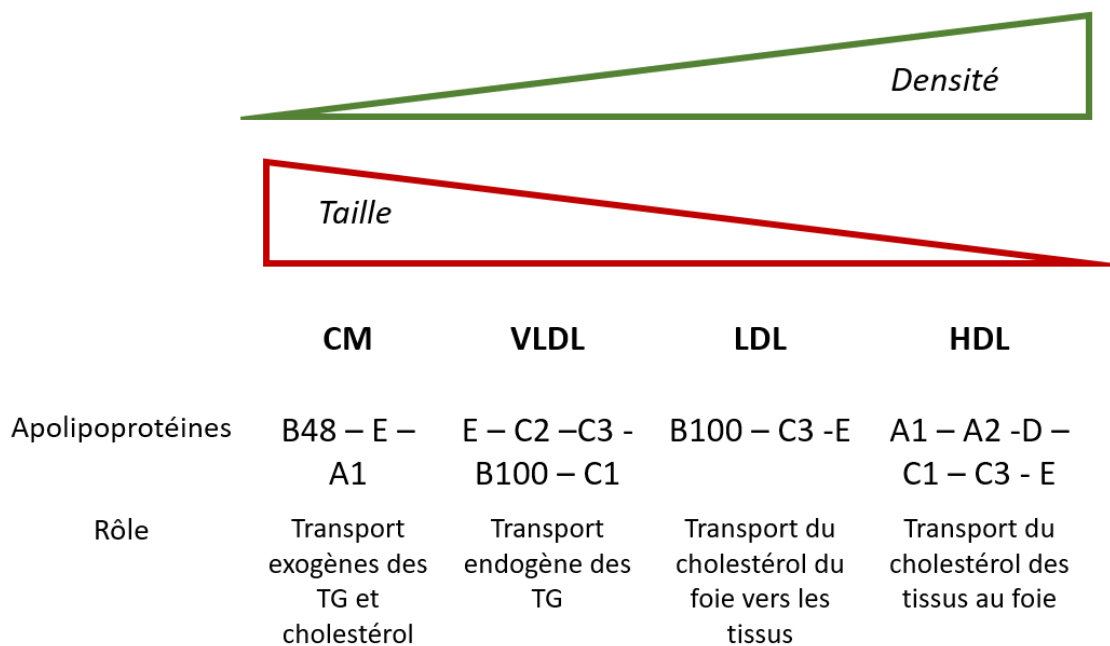


Figure 16 : Les différentes lipoprotéines présentes dans le sang et leurs caractéristiques. Abréviations: CM chylomicrons, VLDL very low density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, HDL high density lipoprotein, TG triglycérides

Le cholestérol étant un constituant essentiel des membranes cellulaires, les lipoprotéines ont des récepteurs dans de nombreux types cellulaires, notamment les hépatocytes, les cellules tumorales et au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) séparant le système nerveux central de la circulation sanguine (Rensen, de Vruhe et al. 2001, Kreuter 2004). C'est pourquoi les LPs ont été, pendant un temps, utilisées pour transporter des molécules actives, néanmoins leur nature endogène empêche une synthèse à haute échelle reproductible, entraînant un abandon de cette idée (Rensen, de Vruhe et al. 2001, Thaxton, Rink et al. 2016). Ces dernières années, l'intérêt s'est porté sur les interactions biologiques des LPs avec les molécules actives.

c) Oponines

Les deux précédentes protéines décrites peuvent être regroupées dans la même catégorie qui est celle des dysopsonines par opposition avec les opsonines (Nguyen and Lee 2017). Ces protéines sériques vont reconnaître un élément étranger de la circulation, le couvrir afin d'amener à sa clairance via la phagocytose par les cellules du système mononucléaire

phagocytaire (MPS). Elles comprennent un ensemble de protéines dont les immunoglobulines, le fibrinogène, certains composants du complément (C3, C4 et C5) ainsi que la protéine C réactive, ... (Yan, Scherphof et al. 2005, Owens and Peppas 2006, Ho, Azman et al. 2018).

Ce phénomène d'opsonisation est connu bien avant l'apparition du concept de « protein corona » et a donc comme conséquence l'élimination rapide des NPs cationiques reconnues par les opsonines (Peltier 1974, Neagu, Piperigkou et al. 2017). Ceci explique que les premières améliorations des nanotechnologies étaient d'éviter tout contact avec les protéines sériques, amenant à la deuxième génération de NPs. La principale stratégie a été de décorer la surface des NPs avec des chaînes hydrophiles de PEG (Suk, Xu et al. 2016). La toute première nanoparticule lipidique approuvée par le FDA est Doxil®, une nanoparticule lipidique PEGylée contenant la doxorubicine. La PEGylation a permis de prolonger la demi-vie de la chimiothérapie en s'opposant à la fixation des opsonines et donc à la clairance rapide des NPs (Owens and Peppas 2006, Barenholz 2012). L'ajout de PEG peut aussi aboutir à un effet appelé « clairance sanguine accélérée » (Ishida, Ichihara et al. 2006, Abu Lila and Ishida 2019). En effet, après des injections répétées de liposomes PEGylés, des anticorps anti-PEG sont apparus, ce qui a entraîné une élimination accrue des NPs PEGylées. De plus, certaines réactions d'hypersensibilité liées à l'activation du complément ont également été observées après l'injection répétée d'une formulation liposomale PEGylée (Semple, Harasym et al. 2005, Ishida, Ichihara et al. 2006, Judge, McClintock et al. 2006, Szebeni, Muggia et al. 2011, Abu Lila and Ishida 2019).

D'autres moyens d'échapper à la fixation des opsonines ont été recherchés. Dernièrement, un polymère Poly(2-méthyl-2-oxazoline) (PMOXA) est apparu comme prometteur avec une absence d'activation du complément chez la souris mais malheureusement pas chez l'homme (Tavano, Gabrielli et al. 2018). Le silicone peut également être utilisé en tant qu'agent couvrant la surface des NPs et a montré le même bénéfice que les chaînes de PEG (Neagu, Piperigkou et al. 2017).

- Immunoglobulines

Il existe différentes classes d'immunoglobulines mais la principale sont les immunoglobulines G (IgG) qui représentent 75 à 80% des anticorps circulants et sont la deuxième protéine la plus abondante du plasma (Cukalevski, Ferreira et al. 2015). Leur rôle physiologique est de protéger l'organisme contre des pathogènes extérieurs, comme les bactéries, virus et toxines, en se fixant dessus permettant l'activation ultérieure du complément et l'activation du système immunitaire (Yan, Scherphof et al. 2005).

- Fibrinogène

Le fibrinogène est un premier facteur de la coagulation, qui représente environ 5% des protéines plasmatiques. Lors de la coagulation il se transforme en fibrine par la thrombine, permettant ainsi la formation du caillot sanguin². C'est également un facteur pro-inflammatoire dans de nombreux cancers, maladies auto-immunes et inflammatoires (Davalos and Akassoglou 2012).

B. Effets des interactions nanoparticules – protéines

Dès 2007, Cedervall *et al.*, ont décrit l'assemblage de protéines sériques autour des NPs comme leur « identité biologique » (Cedervall, Lynch *et al.* 2007). Ce terme est important car il signifie que les NPs sont différentes avant et après injection. Ainsi, nous pouvons définir deux types d'identité (figure 17) : celle qui est dite « **synthétique** », correspondant aux NPs après leur formation dans leurs solvants de solubilisation. Ces NPs se distinguent par leurs caractéristiques physico-chimiques décrites précédemment (taille, charge, forme, ...), qui vont influencer sur la future « **identité biologique** » quand elles seront injectées *in vivo* (Monopoli, Åberg *et al.* 2012, Docter, Strieth *et al.* 2015, Cai and Chen 2019).

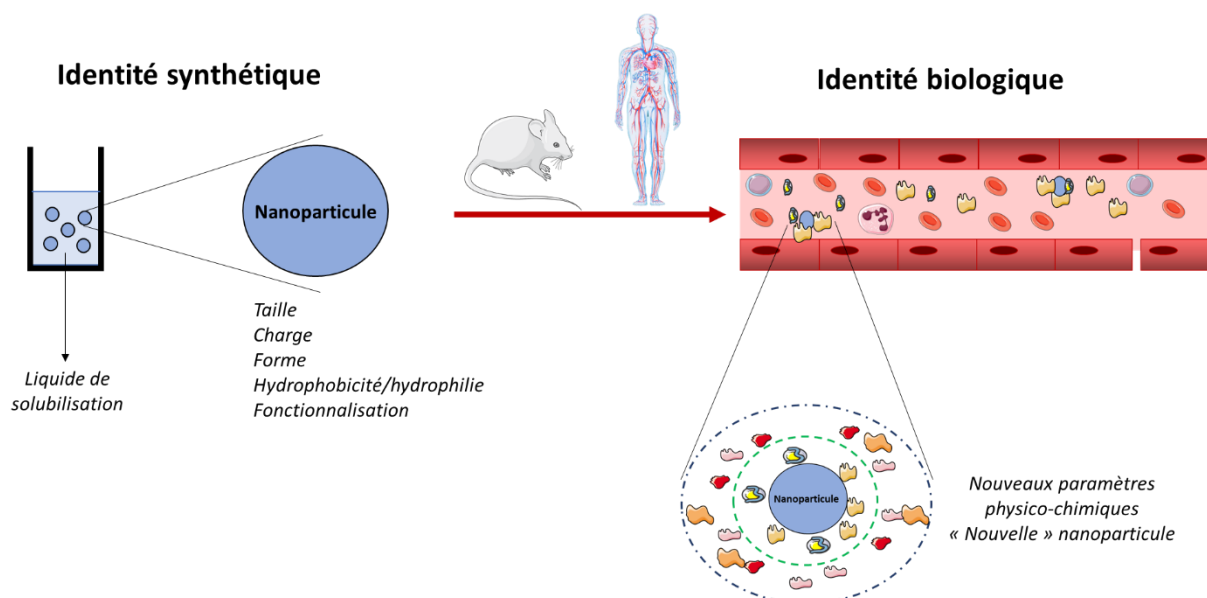


Figure 17 : Les deux identités des nanoparticules avant et après injection *in vivo*

² <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/FIBRINOGENE.pdf>, visualisé le 28/09/20

Cette « **identité biologique** » va correspondre à ce que l'organisme va « réellement voir ». En effet, lorsque les NPs vont circuler dans l'organisme, les premiers éléments en contact avec les cellules circulantes ou endocytaires vont être les protéines de la PC. Les effets biologiques du complexe NPs-protéines sont reliés à la nature et conformation des protéines présentes (Azhdarzadeh, Saei et al. 2015). Par exemple, si les protéines majoritaires sont les opsonines, ces NPs vont être rapidement reconnues par les cellules du MPS et éliminées. *A contrario*, si on y retrouve l'albumine ou les lipoprotéines, la phagocytose par le MPS est diminuée et le temps de circulation augmenté (Peng and Mu 2016). La conformation de ces protéines au sein de la PC joue également un rôle non négligeable. Par exemple, l'albumine de sérum bovin (BSA) ne va pas se fixer sur le même récepteur en fonction de la charge de NPs polystyrènes. En effet, si la charge est négative, la fixation se fera sur le récepteur natif de la BSA et permettra son internalisation. Alors que pour la charge positive, le complexe NPs-BSA se fixera sur un récepteur scavenger entraînant un autre devenir cellulaire (Fleischer and Payne 2014, Fleischer and Payne 2014). Cette différence est due à un changement de conformation de la structure secondaire de la BSA en fonction de la charge des NPs, cette dernière est altérée quand elle se fixe sur les NPs polystyrènes cationiques. Il en est de même pour l'adsorption de la transferrine sur ces NPs, peu vont présenter leurs motifs fonctionnels de liaison ce qui empêche une internalisation ciblée par les cellules exprimant le récepteur à la transferrine (Kelly, Åberg et al. 2015). Néanmoins, l'adsorption des protéines à la surface entraîne également à une fonctionnalisation naturelle pouvant amener à un ciblage actif d'un type tissulaire ou cellulaire. L'exemple le plus parlant est celui de l'Onpattro® où l'apolipoprotéine E se fixe dans la circulation sur cette SNALP permettant une internalisation spécifique par le foie (Akinc, Querbes et al. 2010, Setten, Rossi et al. 2019).

Seulement 0,7% d'une dose administrée de chimiothérapie atteint son tissu cible, ce très faible taux a amené à l'apparition des NPs de troisième génération où un ligand ciblant un récepteur spécifique est ajouté à la surface (Cai and Chen 2019). Malheureusement aucune de ces nanoformulations n'a connu de succès clinique. Dawson et ses collègues ont étudié l'effet de la PC sur le ciblage actif des NPs (Salvati, Pitek et al. 2013). Ils ont montré que les NPs fonctionnalisées avec la transferrine perdaient leur capacité de ciblage des cellules cancéreuses lorsque les protéines sériques s'adsorbaient autour de ces NPs. D'autres équipes de recherche ont voulu utiliser cette PC comme agents de ciblage en modifiant la surface des NPs pour qu'elle interagisse de façon spécifique avec certaines protéines sériques (Zanganeh, Spitler et al. 2016). La BHE est une barrière imperméable qui protège le SNC. Heureusement, il existe des récepteurs présents à la surface luminale de l'endothélium de la BHE pour laisser passer des molécules physiologiques utiles pour le métabolisme cérébral comme le cholestérol (Cecchelli, Berezowski et al. 2007, Patel and Patel 2017). L'ApoE est

notamment connue pour se lier aux récepteurs des lipoprotéines de la BHE et permettre le transport à travers la barrière cérébrale (Neagu, Piperigkou et al. 2017). La stratégie développée par l'équipe du Dr. Zhan est de mettre au point des liposomes « bio-inspirés » qui vont interagir spécifiquement dans le plasma avec les Apo A1, E et J afin de permettre le passage cérébral de la molécule chimiothérapeutique doxorubicine (Zhang, Guan et al. 2019). La surface du liposome a donc été modifiée avec un peptide A β 25-35, préalablement étudié dans la maladie d'Alzheimer et dont on sait qu'il est capable de traverser la BHE par interaction avec les Apo préalablement citées.

La présence de la PC va également avoir un effet sur le profil de libération des molécules actives contenues dans les NPs, en réduisant notamment le risque de libération rapide que l'on peut retrouver avec les NPs cationiques polymériques ou lipidiques (Behzadi, Serpooshan et al. 2014, Docter, Bantz et al. 2014, Docter, Strieth et al. 2015). En dehors de ces effets sur la pharmacocinétique et biodistribution des nanoéléments, il semblerait que ces interactions avec le sérum rendent plus biocompatibles les nanomatériaux en réduisant leur activité hémolytique et les rendant moins toxiques pour les cellules (Docter, Bantz et al. 2014, Docter, Strieth et al. 2015, Cai and Chen 2019).

Les effets toxiques des NPs peuvent se produire après activation d'une réponse immunitaire par reconnaissance d'un élément étranger. En effet en plus de lui donner une identité biologique, l'adsorption de protéines sériques autour des NPs leur confère également une nouvelle identité immunologique (Fadeel 2012). Les complexes NPs-protéines présentant des portions hydrophobiques, peuvent être perçue comme des signaux de danger et entraîner l'activation du système immunitaire. De même, l'interaction avec les protéines sériques amènent à leur changement de conformation et la présentation dans le sang d'épitopes non reconnus par le système immunitaire et activant la réponse adaptative (Neagu, Piperigkou et al. 2017). L'interaction du fibrinogène à la surface de NPs d'acide poly(acrylique) chargées négativement, induit une mauvaise conformation de cette protéine, qui se lie alors au récepteur des intégrines Mac-1 et induit l'activation de la voie de signalisation de l'inflammation NF- κ B (Deng, Liang et al. 2011). Cet effet n'est pas observé avec toutes les NPs qui interagissent avec le fibrinogène, cela dépend de leurs tailles, charge, hydrophobicité, ...

La transformation imprévisible de la surface des NPs par l'interaction avec les protéines sériques modifie leurs profils pharmacologiques et toxicologiques et est la cause de l'échec de nombreuses nanomédecines en phases cliniques (Cai and Chen 2019). C'est pourquoi une compréhension approfondie des interactions et de leurs conséquences biologiques est importante et dans ce but, il existe différentes techniques.

II. Techniques analytiques pour mettre en évidence les interactions sérum-nanomatériaux

A. Méthodes spectroscopiques

La spectroscopie est l'étude expérimentale du spectre résultant de l'interaction de la matière avec un rayonnement électromagnétique. Elle permet de fournir des informations sur l'identité et la structure. On différencie trois types de spectroscopie en fonction de la valeur de la longueur d'onde du rayonnement électromagnétique (tableau 5).

Tableau 5 : Les différents méthodes spectroscopiques

Domaine	Longueur d'onde	Type	Effets sur la matière
UV-visible	10-800 nm - 10-400 UV - 400-800 visible	- Spectroscopie par fluorescence - Dichroïsme circulaire	Saut des électrons de valence
Infrarouge	1-50 μm	<i>Spectroscopie vibrationnelle</i> - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - Spectroscopie Raman	Rotation et vibration moléculaire
Radio	>100 μm	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	Transition de spins nucléaires

a) *UV-visible*

- Spectroscopie par fluorescence

Le marquage d'une protéine ou des NPs par un fluorochrome peut permettre d'étudier l'interaction de l'un avec l'autre par spectroscopie par fluorescence. L'échantillon est excité à une longueur d'onde appartenant aux domaines UV et visible et son spectre d'émission est enregistré. Cette technique est sensible, le changement du spectre de fluorescence émise après interaction intervient instantanément (Mahmoudi, Lynch et al. 2011). Néanmoins, l'ajout d'un fluorochrome à la surface de la protéine ou de la NP peut modifier sa conformation native ou même intervenir dans la liaison entre ces deux entités et donc biaiser les résultats obtenus.

Heureusement les protéines contiennent des acides aminés aromatiques qui sont des chromophores intrinsèques fluorescents : tryptophane > tyrosine > phénylalanine, rangés selon leur rendement quantique. Ainsi, le tryptophane qui a le rendement le plus élevé, a une absorbance maximale à 280 nm et une émission maximale à 340 ou 320 nm en fonction de sa position dans la protéine (exposé ou non au solvant respectivement). Il est donc possible

d'étudier les interactions de l'albumine par spectroscopie par fluorescence (Legrand 2009). En effet, le spectre d'émission de fluorescence sera modifié par la liaison de deux molécules.

- Spectroscopie de corrélation de fluorescence

La spectroscopie de corrélation de fluorescence mesure l'intensité de fluorescence de molécules contenues dans un très petit volume de l'ordre du femtolitre. Les particules marquées par un fluorophore sont excitées par un laser. Les fluctuations d'intensité de la fluorescence émise vont être enregistrées et le coefficient de diffusion ainsi que le diamètre hydrodynamique pourront être déterminés selon la loi de Stokes-Einstein (Ries and Schwille 2012, Troiber, Kasper et al. 2013). L'interaction avec des composants du sérum va modifier la diffusion des NPs, qui sera plus lente et par conséquent leur taille va augmenter. Cette technique permet également d'étudier les interactions avec les membranes cellulaires (Martinez-Moro, Di Silvio et al. 2019).

- Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) repose sur la capacité d'un échantillon chiral (molécule optiquement active) d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite et gauche. Le spectre obtenu correspond à la différence d'absorbance pour chacune des longueurs d'onde entre ces deux polarisations, ce qu'on peut également exprimer sous le nom d'ellipticité en degrés (Kelly, Jess et al. 2005). Si l'on se place dans l'UV lointain (180-240 nm, correspondant à la zone d'absorption de la liaison peptidique), ce spectre permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire des protéines. Par exemple, les domaines hélices α vont avoir deux bandes négatives à 222 et 208 nm (courbe noir, numérotées 1 sur la figure 18) ainsi qu'une bande positive à 192 nm (numérotée 1'). Les feuillets β ont une bande négative à 218 nm (courbe rouge, numérotée 2) et une positive à 192 nm (numérotée 2'), tandis que les protéines désordonnées ont une ellipticité très faible au-dessus de 210 nm (courbe verte, pic n°3) et des bandes négatives près de 195 nm (pic n°3') (Greenfield 2006, Yao, Wynendaele et al. 2018). L'interaction des protéines entre elles peut entraîner un changement structural, qui sera détecté par DC (Kihara, van der Heijden et al. 2019). Il est également possible de déterminer la conformation en hélice des acides nucléiques par cette technique avec une bande positive à 265 nm et une négative à 210 nm (Cho, Kim et al. 2008).

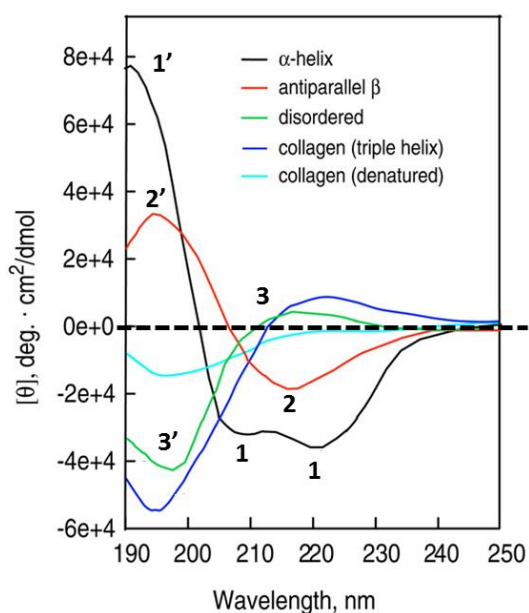


Figure 18 : Spectres de dichroïsme circulaire de polypeptides et de protéines avec des structures secondaires représentatives. La poly-L-lysine à pH 11,1 a une conformation en hélice α (courbe noir) et feuillets β antiparallèle (courbe rouge) et à pH 5,7 a une conformation désordonnée (courbe verte). Le collagène placentaire a une conformation native (courbe bleue) et une autre lorsqu'il est dénaturé (courbe bleu cyan). Adapté d'après Greenfield (Greenfield 2006)

b) *Infrarouge : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et de Raman*

La spectroscopie infrarouge (IR) ou spectroscopie vibrationnelle étudie les vibrations des atomes après excitation des molécules par un rayonnement électromagnétique compris dans le domaine de l'IR allant de 1 à 50 μm . Les vibrations moléculaires dépendent de la formule chimique de la molécule, c'est-à-dire de sa géométrie, ses liaisons et atomes (Taleb 2013).

Tout d'abord, l'IRTF repose sur l'absorption d'un échantillon à différentes fréquences de la lumière infrarouge grâce à un élément essentiel, l'interféromètre (le plus connu est celui de Michelson). Brièvement, son rôle est de produire des interférences de la lumière IR en la divisant en deux et l'amenant vers deux miroirs différents : l'un est fixe et l'autre mobile oscillant. Ils se rejoignent ensuite mais comprennent des différences de chemin optique créant des interférences constructives et destructives. Ainsi, le faisceau final recombinaison traverse l'échantillon qui absorbe à différentes longueurs d'onde³. Une mesure est convertie en spectre IR par une transformation mathématique et informatisée, la transformée de Fourier (Taleb 2013). Le spectre final donne des informations qualitatives sur les structures chimiques de la molécule et quantitatives sur sa concentration qui est proportionnelle à l'aire sous la courbe des pics caractéristiques. Cette technique permet de caractériser les groupements chimiques

³ <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/videos/smis-la-spectroscopie-infrarouge-transformee-de-fourier>, visualisé le 28/09/20

et leurs liaisons afin d'obtenir des informations sur leurs conformations et potentielles interactions (Jung 2000, Taleb 2013).

La *spectroscopie Raman* est complémentaire de l'IRTF mais repose sur la diffusion des photons et non sur leur absorption comme précédemment. Brièvement, un faisceau de lumière monochromatique IR est focalisé sur l'échantillon à analyser et la diffusion de la lumière est recueillie à l'aide d'une autre lentille pour être ensuite analysée par un spectromètre (Hammoum 2008). Les photons diffusés vont avoir une différence d'énergie par rapport aux photons incidents (écart énergétique entre les niveaux vibrationnels de la molécule analysée), ce qui correspond aux bandes Raman⁴.

Ces deux techniques vont fournir des indications sur les changements de conformations des protéines observées mais peuvent également confirmer l'interaction des protéines à la surface des NPs grâce à l'apparition de bandes additionnelles caractéristiques (Mahmoudi, Lynch et al. 2011).

c) *Radio : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire*

La *spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)* est une technique reposant sur le magnétisme du noyau. Elle est basée sur l'aptitude de certains noyaux atomiques avec un spin nucléaire à émettre une fréquence dite de résonance lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique du domaine de fréquence radio (longueurs d'onde supérieures à 100 μm). Elle permet d'obtenir des informations multiples précises, de la formule brute des protéines à leur structure (Legrand 2009). Ces fréquences de résonance vont avoir pour valeur numérique, le déplacement chimique en ppm. Leurs valeurs vont dépendre de l'environnement autour de chaque atome. Ainsi un atome d'hydrogène contenu dans un cycle aromatique n'aura pas le même déplacement chimique qu'un autre impliqué dans une chaîne carbone aliphatique. Pour définir les domaines possibles d'interaction, la « chemical shift mapping » a été mise au point. En effet, la présence d'une interaction entre deux entités chimiques va entraîner des variations dans les déplacements chimiques (Schumann, Riepl et al. 2007, Legrand 2009).

⁴ <https://www.lise.upmc.fr/Raman>, visualisé le 28/09/20

B. Méthodes chromatographiques

Les procédés chromatographiques permettent de séparer les protéines en fonction de leur comportement entre deux phases, une mobile et une fixe. La « fixe », également appelée phase stationnaire, est présente dans une colonne, dans laquelle la phase mobile va passer pour éluer les substances chimiques en fonction de propriétés physiques spécifiques.

a) *Chromatographie par filtration sur gel*

L'une des techniques les plus utilisées est la chromatographie d'exclusion stérique, aussi communément appelé chromatographie par filtration sur gel. La séparation se fait à partir de la taille des molécules à l'aide d'un tamisage moléculaire formé par la phase fixe constituée d'agarose, dextrane ou polyacrylamide (Wakkel 2015, Ó'Fágáin, Cummins et al. 2017). En effet, l'élution des grosses molécules se fera en premier puisqu'elles ne vont pas pénétrer dans le gel, contrairement aux petites molécules qui vont être retenues plus longtemps (Cedervall, Lynch et al. 2007). Cette méthode d'isolation permet de séparer les protéines libres et les protéines présentes autour des NPs afin de les identifier dans un second temps par spectrométrie de masse (Pederzoli, Tosi et al. 2017).

D'autres types de chromatographies peuvent être réalisés pour mettre en évidence l'interaction de protéines sériques avec des nanomatériaux comme la chromatographie en phase inverse ou la chromatographie échangeuse d'ions.

b) *Electrophorèse*

Il s'agit d'une méthode communément utilisée pour séparer et identifier un complexe de protéines. Il en existe différents types mais le principe est le même : des molécules chargées contenues dans un liquide vont migrer sous un courant électrique (Mahmoudi, Lynch et al. 2011). L'identification se fait ultérieurement par spectrométrie de masse. On peut distinguer les électrophorèses par capillaire et par gel.

Tout d'abord, l'*électrophorèse par capillaire* est une technique analytique robuste pour séparer et caractériser les NPs interagissant avec les protéines du sérum (Zarei and Aalaie 2019). Un capillaire de silice est situé entre deux électrodes contenues dans deux récipients contenant l'électrolyte de séparation. La détection est réalisée à la fin à l'aide d'un détecteur spectroscopique (en général UV-visible, parfois fluorescence en fonction de l'échantillon), les échantillons vont être différenciés en fonction de leur mobilité électrophorétique. Cette dernière

est proportionnelle à sa charge ionique, seules les macromolécules et NPs chargées peuvent être séparées par cette technique (Chetwynd, Guggenheim et al. 2018, Zarei and Aalaie 2019)

Les *électrophorèses gel* sont une méthode communément utilisée en laboratoire et permet la séparation d'un complexe protéique en fonction de leur poids moléculaire. L'incubation des NPs en présence de sérum ou d'une protéine sérique spécifique va modifier leurs mobilités électrophorétiques s'il y a une interaction et les rendre « plus lourdes » entraînant un retard de migration, qui sera visualisable par détection UV ou fluorescence (Zarei and Aalaie 2019). Elles peuvent être effectuées en une ou deux dimensions en fonction de ce que l'expérimentateur veut mettre en évidence. Les gels SDS-PAGE sont probablement les plus utilisés. Les protéines vont migrer à travers un gel vertical d'acrylamide. Elles sont préalablement dénaturées et chargées négativement en les chauffant en présence d'un agent réducteur (dithiothréitol ou béta-mercaptoéthanol). Un détergent anionique (dodécylsulfate de sodium SDS) peut être utilisé pour détacher les protéines adsorbées à la surface des NPs (Mahmoudi, Lynch et al. 2011). Les protéines sont mises en évidence par coloration au bleu de Coomassie ou nitrate d'argent et la quantification se fait par analyse densitométrique. L'agarose peut aussi être utilisé en gel d'électrophorèse horizontal pour mettre en évidence des complexes NPs-protéines (Welsher, McManus et al. 2015, Zarei and Aalaie 2019). Ces gels peuvent également être en deux dimensions : la première correspond à une séparation par la charge selon le focus isoélectrique puis la deuxième sépare selon le poids moléculaire (SDS-PAGE) (Mahmoudi, Lynch et al. 2011).

c) *Spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse (MS) est une technique physique d'analyse permettant d'identifier des molécules d'intérêt, de caractériser leur structure chimique en les fragmentant et de les quantifier. L'appareil, le spectromètre de masse, est constitué de plusieurs éléments : tout d'abord une source d'ions qui va ioniser les protéines, puis un analyseur qui les sépare sous l'effet d'un champ électromagnétique selon leur rapport masse/charge, le détecteur arrive ensuite et collecte les ions sortants en les exprimant selon leur abondance, enfin les données sont informatisées pour être analysées par l'expérimentateur. Pour caractériser les interactions, les protéines assemblées en couronne autour des NPs doivent passer par une étape préalable de digestion enzymatique par trypsine afin de réduire la taille d'analyse de l'échantillon (Mahmoudi, Lynch et al. 2011, Menet 2011). Il est possible, avec cette méthode, d'obtenir des informations structurales. (Mahmoudi, Lynch et al. 2011, Gossmann, Fahrländer et al. 2015). Les données recueillies par MS permettent de qualifier les protéines. En effet en comparant le spectre de masse obtenu avec celui de protéines connues provenant de bases

de données, la composition de la PC peut être déterminée (Fernández-Iglesias and Bettmer 2015).

d) Surface plasmon resonance

La résonance des plasmons de surface est une méthode d'analyse physique d'interaction lumière-matière basée sur le changement de l'index de réfraction lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique (Mahmoudi, Lynch et al. 2011). Le ligand est injecté successivement. L'utilisation d'algorithmes spécifiques qui vont comparer les données brutes avec des courbes typiques de modèles de liaison moléculaires bien connues, permet de déterminer la valeur des constantes thermodynamiques, dont les constantes d'association et de dissociation, ainsi que de la constante d'équilibre⁵.

C. Méthodes physiques

Une nouvelle méthode qui a fait ses preuves dans l'étude des interfaces, a récemment été utilisée. Il s'agit de la diffusion aux petits angles de neutrons (small angle neutron scattering ou SANS) (Ang, Lin et al. 2010, Monopoli, Åberg et al. 2012). C'est une méthode puissante pour accéder aux dimensions des protéines, obtenir leur taille réelle et leurs propriétés conformationnelles. Les NPs sont sondées par un rayonnement de neutrons. L'intensité diffusée est détectée sur la surface d'un détecteur et analysée à différents angles. Ce qui intéresse l'expérimentateur, ce sont les hétérogénéités électroniques de répartition de la matière sur des échelles allant de 1 à 1000 nm environ (Peuvrel-Disdier, Manneville et al. 2012). Les neutrons vont interagir avec les atomes nucléaires (Sapsford, Tyner et al. 2011).

D. Autres méthodes

a) Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering DLS)

Les particules en solution ont un mouvement aléatoire dû à l'agitation thermique, appelé mouvement Brownien. Lorsqu'une onde électromagnétique atteint une NP, la lumière sera diffusée dans toutes les directions (diffusion Rayleigh). L'intensité diffusée est enregistrée par un détecteur, qui va la relier à une fonction d'autocorrélation en fonction du temps (Figure 19A). Des particules de petites tailles vont avoir un mouvement Brownien plus rapide

⁵ <http://www.afmb.univ-mrs.fr/resonance-plasmonique-de-surface>, visualisé le 28/09/20

et une fonction d'autocorrélation qui décroît rapidement (Figure 19B haut). A l'inverse, cette fonction décroît plus lentement si les particules sont plus grosses (Figure 19B bas) (Carvalho, Felício et al. 2018). En fonction de la rapidité des fluctuations d'intensité des NPs dans l'eau, l'auto-corrélateur va déterminer le coefficient de diffusion. Ce coefficient permet de calculer le diamètre hydrodynamique (Figure 19C) des particules en solution selon la loi de Stokes–Einstein (Szatanek, Baj-Krzyworzeka et al. 2017, Carvalho, Felício et al. 2018). L'interaction des protéines sériques va augmenter la taille des NPs, changeant leur vitesse de fluctuation du mouvement Brownien et par conséquent être détectée par DLS (Mahmoudi, Lynch et al. 2011, Carvalho, Felício et al. 2018).

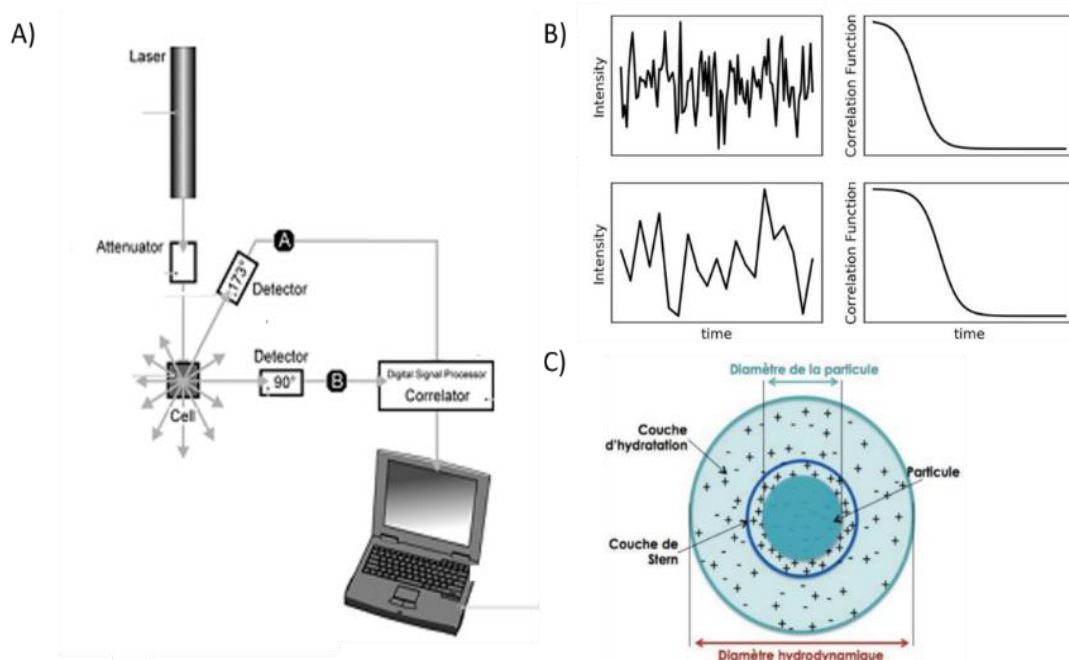


Figure 19 : La diffusion dynamique de la lumière. A) Schéma de la technique, B) La fonction d'autocorrélation, C) Le diamètre hydrodynamique. Adapté d'après Mainard and Jacob et Carvalho et al., (Mainard and Jacob 2016, Carvalho, Felício et al. 2018)

b) Potentiel ζ

Le potentiel ζ (ou potentiel zêta) représente la charge électrique des NPs en solution. Il existe, autour des particules en solution, différentes couches d'ions du solvant (figure 20) : la plus interne est la couche de Stern constituée d'ions opposés par rapport à la charge de la NP, ensuite une deuxième couche séparée des ions en solution, par le plan en glissement (slip plane). C'est au niveau de ce plan (ligne imaginaire séparant les ions immobiles autour de la NP des ions mobiles en solution) qu'est déterminé le potentiel zêta. Ainsi, il s'agit de la différence entre le potentiel électrique sur la surface de cisaillement de la particule et le

potentiel électrique de la solution (Manaia, Abucafy et al. 2017, Carvalho, Felício et al. 2018). Les valeurs obtenues peuvent être utilisées pour prédire la stabilité des formulations nanoparticulaires. En effet, leur instabilité peut résulter de l'interaction et de l'agrégation entre des NPs peu chargées ou neutres. La valeur théorique de ± 30 mV a été fixée pour déduire la stabilité des nanoparticules. Au-delà (positif ou négatif), elles sont considérées comme stable. Les techniques de diffusion de la lumière sont actuellement utilisées pour la détermination du potentiel zêta (Manaia, Abucafy et al. 2017). C'est pourquoi il peut être mesuré rapidement à l'aide du même appareil que pour la DLS (Zetasizer® de Malvern par exemple). L'interaction de protéines autour des NPs va modifier la charge autour des NPs et leur présence pourra être déterminée par la mesure du potentiel ζ (Mahmoudi, Lynch et al. 2011).

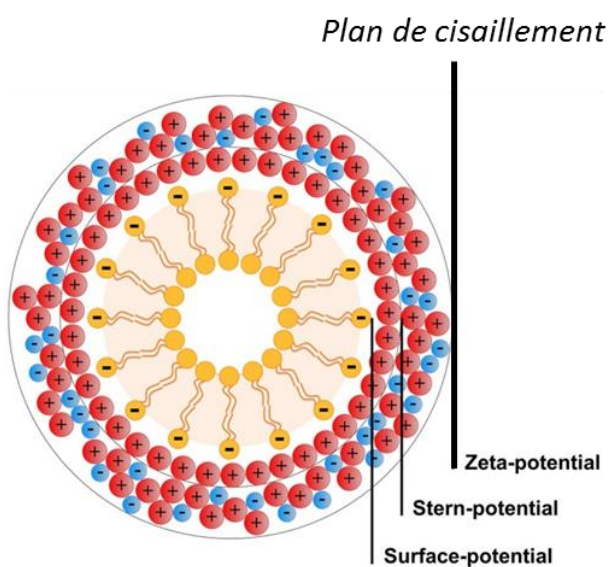


Figure 20 : Représentation schématique des couches ioniques autour d'une nanoparticule anionique. Adapté d'après Carvalho et al. (Carvalho, Felício et al. 2018)

c) Calorimétrie

La réaction de deux molécules interagissant ensemble va forcément induire une production ou une absorption de chaleur (Mahmoudi, Lynch et al. 2011). La titration calorimétrique isotherme est une méthode non-destructive, utilisée pour caractériser les propriétés physico-chimiques des interactions NPs-protéines (Prozeller, Morsbach et al. 2019). Brièvement, le calorimètre comporte deux cellules à même température : l'une sert de référence, l'autre va contenir l'échantillon (Figure 21A). Dans cette deuxième cellule, est titrée la deuxième molécule d'intérêt. L'interaction de ces deux molécules va entraîner une augmentation ou diminution de la température en comparaison avec la cellule de référence. Le suivi de la différence de chaleur mesurée en fonction du ratio de la molécule titrée permet le calcul direct

de l'ensemble des paramètres de liaisons après ajustement avec des modèles connus (Figure 21B) (Ward and Holdgate 2001, Prozeller, Morsbach et al. 2019).

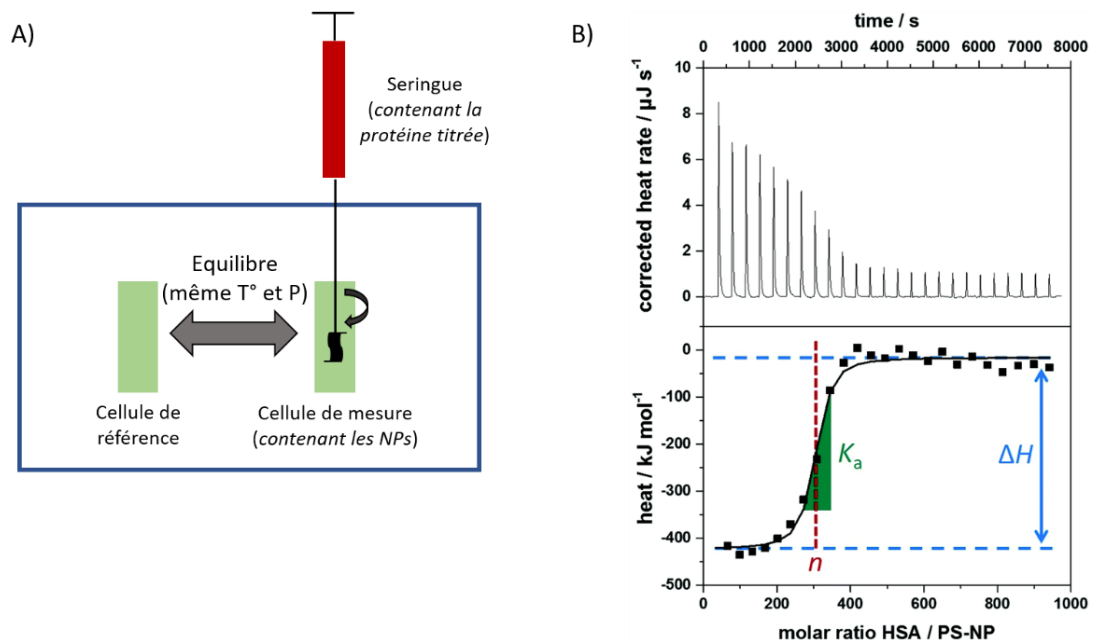


Figure 21 : La calorimétrie isotherme A) Représentation schématique d'un calorimètre isotherme (T° pour température et P pour pression), B) Représentation typique des données obtenues par ITC (haut : rendement thermique corrigé obtenu lors de la titration et bas : visuel des paramètres obtenus par l'ITC sur la courbe de l'intégration des pics en fonction du ratio molaire de la titration. Adapté d'après Prozeller et al. (Prozeller, Morsbach et al. 2019)

d) Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (ou TEM pour transmission electronic microscopy) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est focalisé sur l'échantillon. L'interaction de ces deux éléments va donner une image contrastée après analyse des électrons transmis par un détecteur. En comparaison avec un microscope optique, la résolution est augmentée et permet d'obtenir des images précises de structures nanométriques. Par le biais de cette technique, il est possible de visualiser le diamètre réel des NPs et les interactions après incubation avec le sérum ou des protéines spécifiques (Yang, Wang et al. 2019).

E. Avantages et inconvénients des techniques analytiques

Toutes ces techniques décrites ont pour but de déterminer et caractériser l'assemblage protéique autour des NPs, elles ont toutes des avantages et inconvénients (Tableau 6). C'est pourquoi une combinaison de différentes approches de caractérisation doit être utilisée pour couvrir leurs limites respectives.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de différentes techniques analytiques utilisées pour caractériser les interactions nanoparticules – protéines sériques. *Les techniques encadrées en rouge ont été utilisées au cours de cette étude.*

	Avantages	Inconvénients
Spectroscopie par fluorescence	Très sensible	Risque de surestimation des constantes à cause d'une fluorescence interne
Dichroïsme circulaire	S'intéresse aux changements conformationnels induits par la formation du complexe NP-protéine Faible volume d'échantillon	Ne peut se faire qu'avec une protéine spécifique, pas avec un mix
IRTF	Technique polyvalente et sensible Pas de contrainte de taille d'échantillon Identification des groupes fonctionnels	Caractérisation difficile dans un milieu complexe Réutilisation de l'échantillon impossible Préparation longue de l'échantillon
Raman	Préparation rapide de l'échantillon Faible volume d'échantillon Obtention rapide du spectre d'analyse	Moins sensible que IRTF Echantillon doit être pur Risque de spectre gâché à cause d'impuretés ou de fluorescence intrinsèque de l'échantillon
RMN	Informations sur la structure des protéines et leurs dynamismes Informations qualitatives et quantitatives	Peu sensible, cher et prend du temps L'échantillon doit avoir une bonne qualité Limite de taille d'échantillon (30 kDa environ)
DLS	Rapide	Ne donne pas le diamètre réel mais hydrodynamique Pas d'informations sur la forme, faible résolution Peu applicable pour des NPs de taille > 100nm et polydisperses
Potentiel ζ	Méthode directe de mesure de la charge de surface des NPs et de ses changements Indication sur la stabilité des NPs en solution	Précision dépend de la monodispersité de la formulation
TEM	Visualisation directe de la PC autour des NPs	Prétraitement avant obtention de l'image
ITC	Informations quantitatives sur la thermodynamie des complexes NP-protéines Pas besoin de marquer les NP ou protéines	Ne peut se faire qu'avec une protéine spécifique, pas avec un mix
Chromatographie liquide	Méthode sensible et fiable Permet de séparer les protéines des NPs pour une identification future	Prend du temps Il faut faire attention au risque de contamination qui va fausser les résultats
Electrophorèse capillaire	Technique robuste et fiable	Détection peu sensible Les protéines peuvent s'adsorber à l'intérieur du capillaire
Electrophorèse gel	Facile, peu cher Analyse simultanée de différentes PC autour des NPs	Technique seulement qualitative
MS	Permet d'obtenir l'identité des protéines de la PC Haute-résolution	Coûteux Digestion enzymatique préalable pouvant enlever des protéines Nécessite expériences dans le domaine pour analyser les données
SANS	Technique de haute performance Permet d'étudier des milieux complexes	Coûteux Nécessite expériences dans le domaine pour analyser les données

Partie 4 : Internalisation des nanoparticules

Une fois dans la circulation sanguine, les NPs encapsulant le siRNA vont donc interagir avec les composants du sérum. Leur but est d'atteindre le tissu cible et plus précisément le cytoplasme des cellules ciblées. Plusieurs étapes doivent ainsi être encore franchies : l'extravasation des NPs, l'internalisation dans les cellules cibles et le relargage du contenant dans le cytoplasme. Dans cette dernière partie de l'introduction, nous présentons brièvement ces différents obstacles.

I. L'extravasation : la sortie de la circulation sanguine

La première étape pour atteindre le tissu cible correspond à la sortie de la circulation sanguine, qu'on appelle l'extravasation. La connaissance et l'exploitation des caractéristiques vasculaires du tissu ciblé sont fondamentales dans la conception et le développement du vecteur qui va véhiculer le siRNA. En effet, le diamètre final et la charge de surface des NPs jouent un rôle important dans l'accumulation dans les tissus (Ozpolat, Sood et al. 2014).

Tous les organes n'ont pas la même accessibilité en fonction notamment de l'endothélium les entourant. Le foie est, par exemple, considéré comme un organe « ouvert », car il est entouré de capillaires sinusoides à cellules endothéliales disjointes et lame basale discontinue, laissant diffuser passivement les molécules d'une taille comprise entre 100 et 200 nm. C'est l'un des principaux organes ciblés pour les thérapies d'ARNi, du fait de son rôle physiologique central dans l'organisme (synthèse protéique et métabolisme des médicaments). Les autres organes « ouverts » sont la rate, les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse et les glandes surrénales (Kanasty, Whitehead et al. 2012, Haussecker 2014).

Les tumeurs solides sont un autre type de tissu « ouverts ». En effet, grâce à une angiogenèse incontrôlée et une forte réaction inflammatoire, des capillaires similaires à ceux du foie se trouvent autour de la tumeur. De plus, le drainage lymphatique est non fonctionnel, permettant l'accumulation des vecteurs transportant les siRNA. Ce phénomène est appelé effet EPR pour " perméabilité et rétention augmentées " (enhanced permeability and retention effect). Cette vascularisation anormale entraîne une accumulation passive de nanoparticules de taille > 100nm (Ozpolat, Sood et al. 2014, Tatiparti, Sau et al. 2017).

Pour les autres tissus/organes, la sortie passive de la circulation sanguine est très limitée du fait de capillaires continus à cellules endothéliales et lame basale continues ou de capillaires fenêtrés avec des cellules endothéliales disjointes avec des pores de 60 à 80nm et

une lame basale continue. L'eau et les petites molécules peuvent facilement diffuser et dans le second cas (endothélium disjoint), de plus grosses molécules également (Kanasty, Whitehead et al. 2012, Haussecker 2014). Le cerveau est un organe à part dans le corps humain. Il est protégé par la BHE, composée d'un endothélium continu imperméable grâce à la présence de jonctions serrées, d'une lame basale continue et de cellules (péricytes et astrocytes) ayant un rôle protecteur. L'endothélium cérébral a de nombreux transporteurs qui régulent le trafic de part et d'autre de la BHE (Cecchelli, Berezowski et al. 2007).

II. Entrée cellulaire des nanoparticules

Une fois dans le tissu cible, les NPs doivent pénétrer à l'intérieur des cellules cibles. Tout d'abord, elles doivent diffuser au sein de la matrice extracellulaire, composée notamment de collagène, qui peut créer une résistance et un nouvel obstacle à franchir (Whitehead, Langer et al. 2009).

Ensuite, se dresse la membrane cellulaire, qui est une bicouche lipidique constituée de phospholipides avec des domaines protéiques spécifiques. Les caractéristiques structurales et biomoléculaires de cette barrière se traduisent par une charge globale négative et une perméabilité sélective aux ions et à quelques molécules (Donahue, Acar et al. 2019). L'entrée cellulaire des NPs est un challenge de plus à surmonter. Deux voies d'entrées peuvent être distinguées : l'endocytose ou l'entrée cellulaire par contact direct (Donahue, Acar et al. 2019).

A. Les différentes voies d'endocytose

Il existe deux principaux types d'endocytose : phagocytose ou pinocytose (Figure 22) (Conner and Schmid 2003). Lors de l'entrée par endocytose, les nano-éléments n'ont pas d'accès direct et immédiat au cytoplasme ou aux organites cellulaires, ils doivent passer par une étape préalable dans une vésicule intracellulaire : le phagosome ou l'endosome (Donahue, Acar et al. 2019).

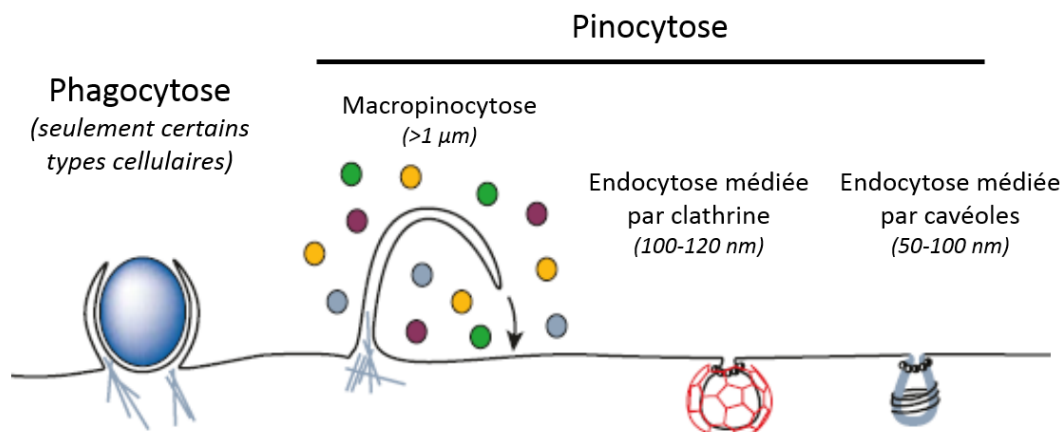


Figure 22 : Les principaux mécanismes d'endocytose. *Adapté d'après Conner and Schmid, (Conner and Schmid 2003)*

a) La phagocytose

La phagocytose est réservée pour les cellules immunitaires comme les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, qui sont responsables de la défense de l'organisme et l'élimination des cellules mortes par apoptose. Lorsqu'un élément étranger est recouvert d'opsonines, il est identifié comme « néfaste » par des récepteurs à la surface des cellules phagocytaires et absorbé par elles pour être éliminé (Charbonnier 2010).

b) La pinocytose

La pinocytose est l'absorption spécifique ou non de molécules et fluides contenues dans le milieu extracellulaire. Il en existe différents sous-types, le choix de la voie dépendant des cellules visées et des caractéristiques physico-chimiques de la molécule (nature chimique, présence d'un ligand, taille et charge) (Alhaddad, Durieu et al. 2012). Les principaux mécanismes d'endocytose sont présentés brièvement ci-après.

La *macropinocytose* est un mécanisme d'internalisation non spécifique (c'est-à-dire non médié par un récepteur). Les vésicules d'internalisation d'une taille allant 100 nm à 5 µm se caractérisent par des extensions de la membrane plasmique stabilisées par l'actine permettant l'absorption de volumes importants de milieu extracellulaire (Donahue, Acar et al. 2019). Ce mécanisme est similaire à la phagocytose, à l'exception qu'il peut avoir lieu dans toutes les cellules. Les vésicules d'internalisation fusionnent ensuite avec le lysosome pour dégrader le matériel absorbé (Conner and Schmid 2003, Kanasty, Whitehead et al. 2012). Cette voie

d'internalisation constitue un important mécanisme de protection cellulaire contre les virus, qui réussissent parfois à s'en échapper (Kafshgari, Harding et al. 2015).

L'*endocytose par clathrine* et l'*endocytose par cavéole* sont toutes deux médiées par récepteurs et sont définies par des vésicules d'internalisation de tailles respectives de 100-120 et 50-100 nm.

La voie endocytaire par cavéole est notamment utilisée par l'albumine. Cette voie est l'une des principales des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules musculaires (Kafshgari, Harding et al. 2015). Les cavéoles sont des zones enrichies en cholestérol et sphingomyéline, qui représentent environ 10% de la membrane plasmique. Les protéines de la famille des cavéolines sont aussi retrouvées, principalement la cavéoline 1, dont l'extrémité N-ter cytosolique permet la liaison au cholestérol (Kiss and Botos 2009). Après liaison du ligand sur son récepteur et détachement des cavéoles de la membrane grâce à l'intervention de la GTPase dynamine, deux voies sont possibles. Les vésicules d'internalisation, les cavéosomes, peuvent garder leur pH neutre et se diriger vers l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique. Cette route a notamment été mise en évidence pour la première fois pour le simian virus 40 (Pelkmans, Kartenbeck et al. 2001). La seconde résulte de la fusion avec un endosome et suit la voie endocytaire « classique » qui est détaillée ci-après (Kiss and Botos 2009). Il a été constaté que la charge négative des NPs pouvait déclencher une internalisation cellulaire *via* les cavéoles (Yameen, Choi et al. 2014).

La voie endocytaire par clathrine est l'une des plus étudiées et est utilisée par de nombreuses molécules physiologiques telles que les lipoprotéines ou la transferrine, qui peuvent être des marqueurs de cette voie. C'est une voie d'internalisation complexe impliquant des signaux intracellulaires, un recyclage de la membrane et une capture de nutriments (Yameen, Choi et al. 2014). Le ligand se fixe sur son récepteur au niveau de zones membranaires recouvertes de clathrine et comprenant plusieurs types de protéines. Cette liaison déstabilise la membrane qui s'enfonce à l'intérieur du cytoplasme formant une goutte, qui va être détachée après intervention de la dynamine. Lorsque les vésicules sont libérées de la membrane, le manteau de clathrine présent à l'extérieur est désassemblé afin de favoriser le trafic intracellulaire (Alhaddad, Durieu et al. 2012, Juliano, Ming et al. 2012, Juliano, Ming et al. 2014).

c) Passage par l'endosome

Cette voie endocytaire mène à la formation d'endosome, à leur maturation et à la fusion avec les lysosomes. Dans un premier temps, ces vésicules d'internalisation perdent leur structure tubulaire membranaire ainsi que les protéines qui ont permis leur formation comme les clathrines (Yameen, Choi et al. 2014). Puis, la maturation de l'endosome le transforme en corps multi-vésiculaire, caractérisé par un pH acide libérant les molécules liées. Les récepteurs sont alors recyclés vers la membrane. L'endosome tardif fusionne ensuite avec un lysosome, ce qui a pour conséquence une diminution encore plus importante du pH et une activation des enzymes hydrolases, qui peuvent dégrader entièrement les siRNA (Kettler, Veltman et al. 2014, Dowdy 2017, Durymanov and Reineke 2018).

Pour que les molécules actives puissent avoir une efficacité, elles doivent s'échapper de l'endosome avant la fusion avec le lysosome (cela s'appelle l'échappement endosomal) afin d'atteindre le cytoplasme (Durymanov and Reineke 2018).

B. Entrée cellulaire par contact direct

Pour accéder directement au cytoplasme, les NPs peuvent emprunter d'autres voies de libération comme le montre la figure 23.

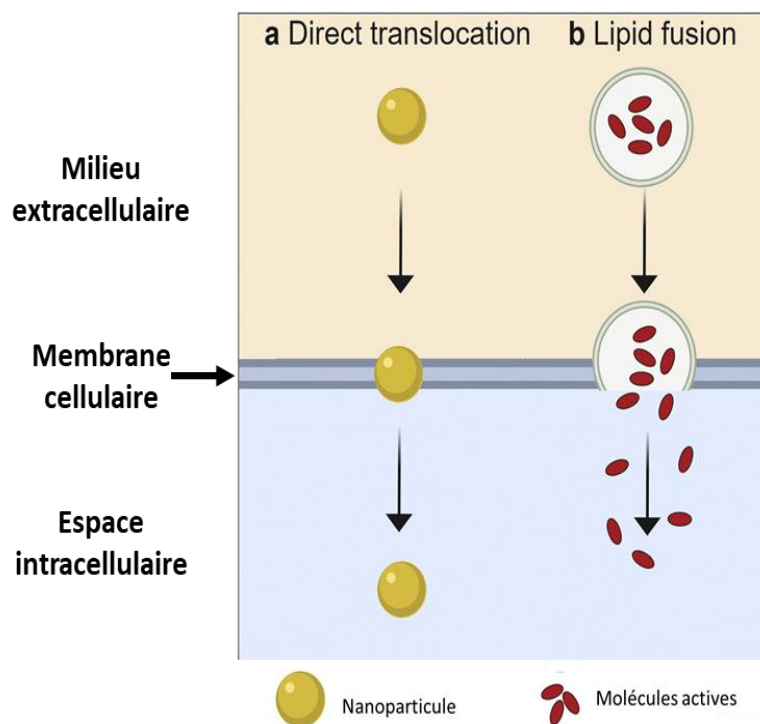


Figure 23 : Représentation schématique des voies d'entrée cellulaire direct des NPs.

Les principales voies et stratégies permettant aux NPs de traverser la membrane plasmique cellulaire pour pénétrer directement dans le cytoplasme sont les suivantes (a) la translocation directe ; (b) la fusion des lipides Adapté d'après Donahue et al., (Donahue, Acar et al. 2019)

a) Translocation directe dans le cytoplasme

Les NPs peuvent perturber la membrane cellulaire en interagissant avec la bicouche lipidique pour entrer directement dans le cytoplasme. L'utilisation de cette voie permet d'éviter les mécanismes de transport actif demandant de l'énergie et le passage par l'endosome pouvant amener à la dégradation des molécules contenues dans les NPs (Donahue, Acar et al. 2019). Cette voie est notamment empruntée par des petites NPs d'or zwitterionique d'une taille de 2 à 4 nm, cela n'est plus le cas lorsque les NPs font 6 nm démontrant un possible effet taille pour ce type d'internalisation (Jiang, Huo et al. 2015). Les « cell penetrating peptides » sont des petits ligands de moins de 40 acides aminés qui sont capables de traverser la membrane plasmique par translocation directe (Copolovici, Langel et al. 2014).

b) Fusion lipidique

La fusion des lipides est le processus par lequel certaines bicouches lipidiques fusionnent avec la membrane plasmique d'une cellule. Après la fusion de la membrane, les molécules encapsulées sont directement libérées dans le cytoplasme (Donahue, Acar et al. 2019).

Le caractère fusogène est défini par la capacité d'un lipide de passer d'une phase lamellaire stable à une phase hexagonale inverse instable en présence de lipides de charge inverse (Kanasty, Dorkin et al. 2013). Ce changement de phase induit la fusion des membranes. Dans les lipoplexes, le lipide fusogénique DOPE est souvent présent et dans les SNALP les lipides ionisables ont été construits pour avoir une température de transition $< 7^{\circ}\text{C}$ dans ce but (Semple, Akinc et al. 2010).

Il a fréquemment été observé que les NPs cationiques avaient un taux d'internalisation supérieur aux NPs neutres et négatives. Cette différence s'explique tout d'abord par la loi de Coulomb, qui explique que des charges inverses sont attirées l'une vers l'autre. Ainsi, les NPs cationiques vont avoir une attraction électrostatique avec les membranes cellulaires chargées négativement. L'internalisation ultérieure des NPs d'une taille < 100 nm pourrait se faire ensuite par une endocytose médiée par clathrine, ou bien grâce à la présence des lipides fusogènes à l'intérieur de ces NPs qui pourrait permettre la fusion avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire et le relargage des molécules contenues dans la nanoparticule lipidique (Yameen, Choi et al. 2014, Forest, Cottier et al. 2015, Forest and Pourchez 2017, Donahue, Acar et al. 2019).

Objectifs de la thèse

Les nanoformulations siRNA-SQ développées par l'équipe d'accueil ont montré leur efficacité biologique et thérapeutique dans différents modèles pathologiques : cancer à oncogène de fusion et maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A. Récemment, la méthode de couplage chimique du siRNA au SQ a été améliorée et testée avec différents siRNA et polyterpènes (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018).

La première partie de ce travail a consisté à **optimiser la dernière étape de la synthèse, à savoir la nanopréciipitation et à caractériser les propriétés physico-chimiques des NPs siRNA-SQ résultantes**. En collaboration avec l'équipe Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS) du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), nous avons également **étudié la structure interne de ces NPs**.

L'inhibition de l'expression du gène ciblé *in vivo* est la preuve de l'efficacité du siRNA et signifie que les NPs siRNA-SQ ont réussi à s'accumuler dans le tissu cible et à être internalisée dans les cellules. Néanmoins, le mécanisme de transport à l'intérieur des tissus et de capture cellulaire demeure inconnu. *In vivo*, les nanomatériaux vont interagir instantanément avec des protéines sériques. **La deuxième partie** de ce travail a été de mettre en évidence **les interactions des NPs siRNA-SQ avec le sérum**. Nous nous sommes principalement intéressés aux deux protéines majeures, l'albumine et les lipoprotéines, et avons cherché à caractériser l'interaction avec les NPs.

La troisième et dernière partie de cette étude s'est intéressée à **comprendre pourquoi les NPs siRNA-SQ ne sont pas internalisées sans agent transfectant *in vitro* ?** En effet, les NPs siRNA-SQ obtenues *via* les deux méthodes de couplage ne sont pas capturées par les cellules cibles dans les modèles d'étude *in vitro*. Nous avons développé trois hypothèses pour essayer de répondre à cette question.

Matériels et méthodes

I. Les siRNA utilisés et leurs modifications chimiques

Tous les siRNA utilisés durant cette étude respectent les règles éditées par Reynolds *et al.* (Reynolds, Leake *et al.* 2004). Leur spécificité pour inhiber le gène ciblé a été vérifiée préalablement dans d'autres études (Raouane, Desmaele *et al.* 2011, Ali, Maksimenko *et al.* 2014, Massaad-Massade, Boutary *et al.* 2018) (Brevet n°WO2020064749A1 ; Boutary, Caillaud *et al.*, 2020 soumis). Leurs séquences sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Séquence des siRNA utilisés. Le « dA/C/T » correspond à des désoxynucléotides insérés en 3'- des séquences pour limiter la reconnaissance par les RNases sériques.

	Séquence 5' → 3'
Brin sens RET/PTC1	CGU-UAC-CAU-CGA-GGA-UCC-AdAdA
Brin antisens RET/PTC1	UGG-AUC-CUC-GAU-GGU-AAC-GdCdT
Brin sens PMP22	AUA-CCA-ACU-GUG-UGG-ACU-AdTdT
Brin antisens PMP22	UAG-UCC-ACA-CAG-UUG-GUA-UdTdT

Les siRNA sont synthétisés en simple brin par Eurogentec (France). Ils sont caractérisés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Les siRNA simple brin ont une taille de 19 nucléotides avec en 3'- deux résidus de désoxynucléotides pour assurer la stabilisation contre les nucléases comme décrit par Tuschl *et al.* (Tuschl 2002). Pour permettre la conjugaison avec le squalène, le brin sens des siRNA est modifié en 5'- par l'ajout d'un groupement réactif dibenzocyclooctyne (DBCO) suivie un espaceur N-(hexaméthylényl)-6-oxohexanamide (C6).

Pour hybrider le siRNA « nu » (siRNA non couplé au SQ), des quantités équimolaires de brins sens et antisens sont ajoutées dans le tampon d'hybridation [30 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 2 mM Mg acétate, 100 mM K acétate]. Le mélange est incubé pendant 3 min à 95°C, puis pendant 45 min à température ambiante avant d'être stocké à -80°C.

II. Synthèse des nanoparticules siRNA-SQ

Avant chaque synthèse, le plan de travail est nettoyé au RNase zap (Sigma, réf R2020) pour éviter toute dégradation des brins du siRNA par les RNases.

A. Bioconjugaison du brin sens du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre

Le couplage par chimie clic sans cuivre s'effectue entre un alcyne inclus dans un cyclooctyne et un azide. Ainsi le brin sens du siRNA est modifié en 5' par l'ajout d'une fonction DBCO et le SQ par un groupement azide N_3 . L'azido-squalène (SQ- N_3) a été obtenu par méthylation séquentielle et déplacement S_N2 avec l'azide de sodium de l'alcool connu disponible à partir du SQ (Othman, Desmaële et al. 2011). Les deux fonctions chimiques étant très réactives, une liaison triazole va se former entre ces deux entités pour **lier un brin sens de siRNA à un SQ**. Cette réaction chimique de liaison équimolaire a été décrite précédemment par Massaad-Massade *et al.*, (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018).

Brièvement, dix nanomoles du brin sens modifié DBCO-C6 du siRNA (solubilisés dans l'eau exempte de RNases à la concentration de 1 mg/mL) sont mélangées à 500 nanomoles de SQ- N_3 (1 mg/mL dans du DMSO) selon un ratio molaire 1 [siRNA] : 50 [SQ]. Les solvants organiques, DMSO (901 μ L) et acétone (256 μ L), sont ensuite ajoutés et la solution est mise sous agitation pendant 12h à température ambiante pour obtenir les bioconjugués brin sens du siRNA lié par une liaison triazole au SQ (Figure 24). Le lendemain, l'acétone est éliminée par évaporation sous le flux d'azote pendant 30 min et le DMSO par lyophilisation pendant 24h.

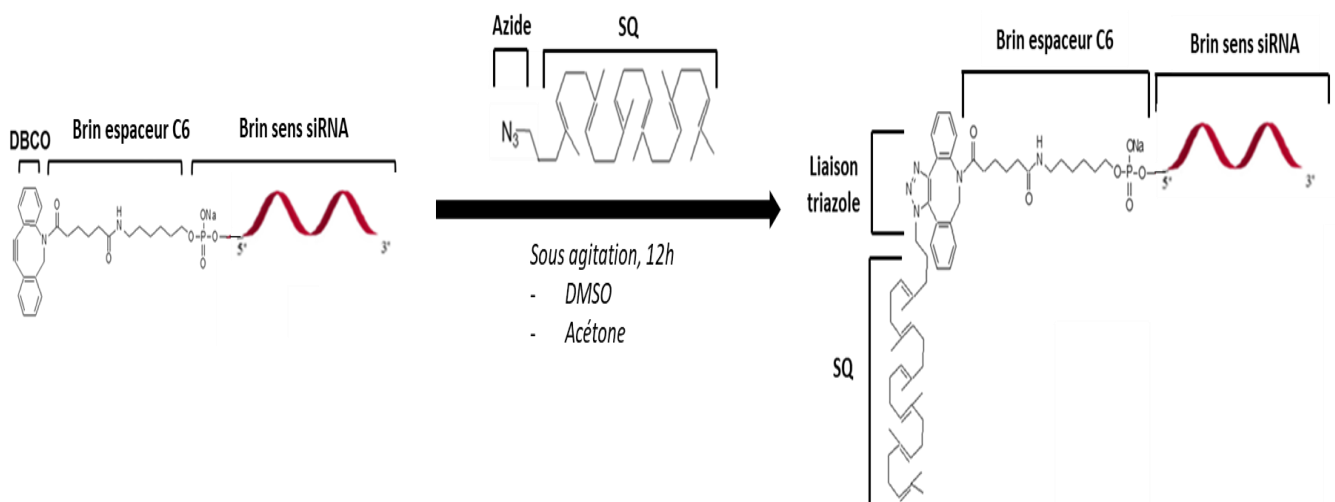


Figure 24 : Couplage chimique du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre

B. Purification du bioconjugué brin sens siRNA-SQ par RP-HPLC

La deuxième étape importante du protocole de synthèse est la purification par HPLC du bioconjugué brin sens siRNA-SQ de l'excès de SQ utilisé pour la chimie clic sans cuivre. Il y a en effet 490 nmol en excès de SQ non conjugué au siRNA.

Cette étape se réalise par chromatographie liquide haute performance (Thermo Scientific, UHPLC-3000), équipé d'un détecteur à réseau de photodiodes (DAD-3000) dont la longueur d'onde est comprise entre 190 et 800 nm, et d'une pompe (HPG-3400RS). La phase stationnaire est composée d'une colonne de divinylbenzène polystyrène alkylé non poreux (Hamilton 10 μ m, 4,6 mm, 250 mm, PEEK) protégée par une pré-colonne (Hamilton). Un gradient des phases mobiles A et B a été appliqué avec un débit de 1,2 mL/min. La phase mobile A est composée de : 90% eau Milli-Q filtrée, 5% acétonitrile et 5% 0,2 M acétate de triéthylamine (TEAA) (5%) à pH 7. La phase B a une composition inverse : 90% d'acétonitrile avec 5% de TEAA, 5% eau Milli-Q filtrée. Le gradient appliqué pour la purification est le suivant : 0 - 8 min de gradient linéaire de 0% à 24% de la phase B ; 8 - 16 min de gradient linéaire de 24% à 90% de la phase B ; 16 - 18 min de gradient linéaire de 90% à 100% de la phase B ; 18 - 30 min de 100% de la phase B ; 30 - 32 min de gradient linéaire de 100% de la phase B à 100% de la phase A et 32 - 42 min de rééquilibrage avec 100% de la phase A. Le logiciel Chromoleon 7 a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données.

Le bioconjugué brin sens-SQ lyophilisé est repris dans 600 μ L de DMSO et 200 μ L sont injectés manuellement. La purification se fait par collecte manuelle de la fraction contenant le bioconjugué brin sens du siRNA-SQ. Son temps d'élution est fixe à 16 min. La fraction est collectée à partir de la montée du pic (à partir de 15 min) puis deux min après son maximum, ce qui correspond à un volume de fraction de 3,6 ml environ. La collecte se fait dans un Falcon 50 mL, qui peut contenir en tout 3 fractions qui sont ensuite lyophilisées pendant 24h. La reconstitution post-lyophilisation se fait dans l'eau exempte de RNase (ThermoFisher Scientific).

C. Hybridation des bioconjugués siRNA-SQ

Après purification par HPLC et lyophilisation, le bioconjugué brin sens du siRNA-SQ est solubilisé dans de l'eau exempte de RNase à la concentration molaire souhaitée pour l'hybridation (Figure 25). Des quantités équimolaires de brins sens conjugués au SQ et antisens sont hybridées dans un tampon spécifique d'hybridation [30 mM HEPES-KOH (pH

7,4), 2 mM Mg acétate, 100 mM K acétate] pendant 3 min à 95°C, puis laissées au repos pendant 45 min à température ambiante.

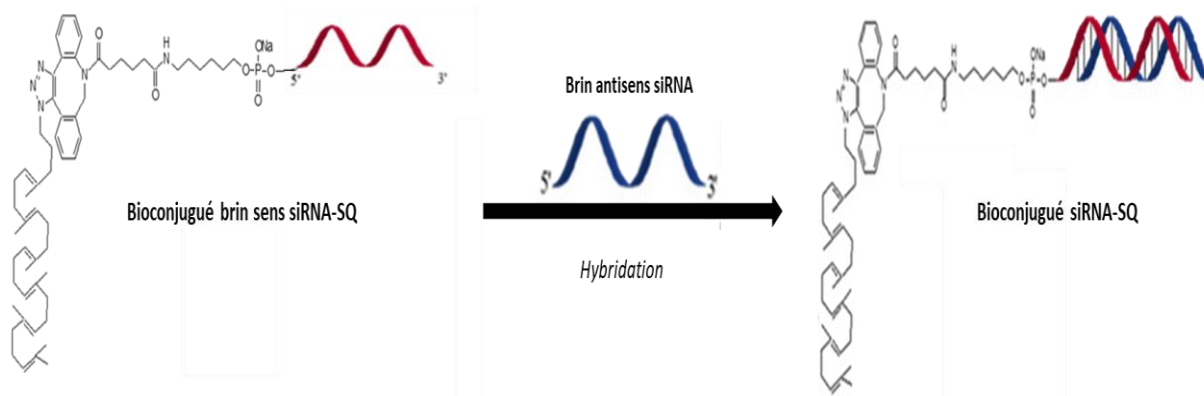


Figure 25 : Hybridation du bioconjugué brin sens siRNA avec le brin antisens complémentaire

D. Nanoprécipitation des bioconjugés siRNA-SQ

Au début de cette étude, la nanoprécipitation des bioconjugés siRNA hybridés-SQ a été optimisée. Pour cela, différents solvants organiques avec différents ratios volume/volume ont été testés (tableau 8). Après hybridation et une dernière étape de lyophilisation, les bioconjugés siRNA-SQ sont solubilisés dans différents solvants organiques. Une fois l'obtention d'une solution la plus homogène possible, celle-ci est ajoutée goutte-à-goutte sous agitation dans une solution aqueuse contenant ou non du dextrose 5%. Les solvants organiques sont ensuite évaporés à l'aide du flux d'azote ou d'un Rotavapor.

Tableau 8 : Optimisation de la nanoprécipitation. Différents solvants et ratios volume/volume ont été testés. THF est l'abréviation de tétrahydrofurane, EtOH de l'éthanol

Solvant organique	Ratio V/V Org:aq
EtOH 96%	1 : 2
EtOH 70%	1 : 2
	1 : 4
EtOH 90%/THF* 10%	1 : 2
Acétone	1 : 2

Le protocole pour le dernier solvant, l'acétone, a été modifié par rapport au précédent décrit. Le siRNA étant une molécule très hydrophile, il est difficilement soluble dans les solvants organiques. Le bioconjugué hybridé siRNA-SQ a donc été repris dans l'eau exempte de RNase et ajouté goutte-à-goutte au solvant organique selon un ratio volume/volume de 1 [phase organique] : 2 [phase aqueuse contenant le siRNA hybridé-SQ]. L'acétone est ensuite évaporée en utilisant le flux d'azote sous agitation pendant trente minutes pour obtenir une suspension aqueuse de NPs siRNA-SQ pure à une concentration souhaitée pour les expériences ultérieures (Figure 26).

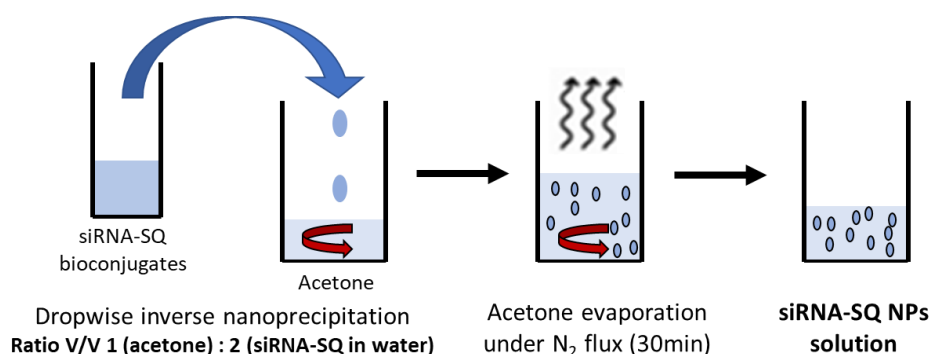


Figure 26 : Représentation schématique de la nanoprécipitation inverse utilisée pour former les nanoparticules siRNA-SQ

Le protocole décrit précédemment et schématisé sur la figure 27 a permis d'obtenir de façon reproductible des NPs siRNA-SQ de taille homogène.

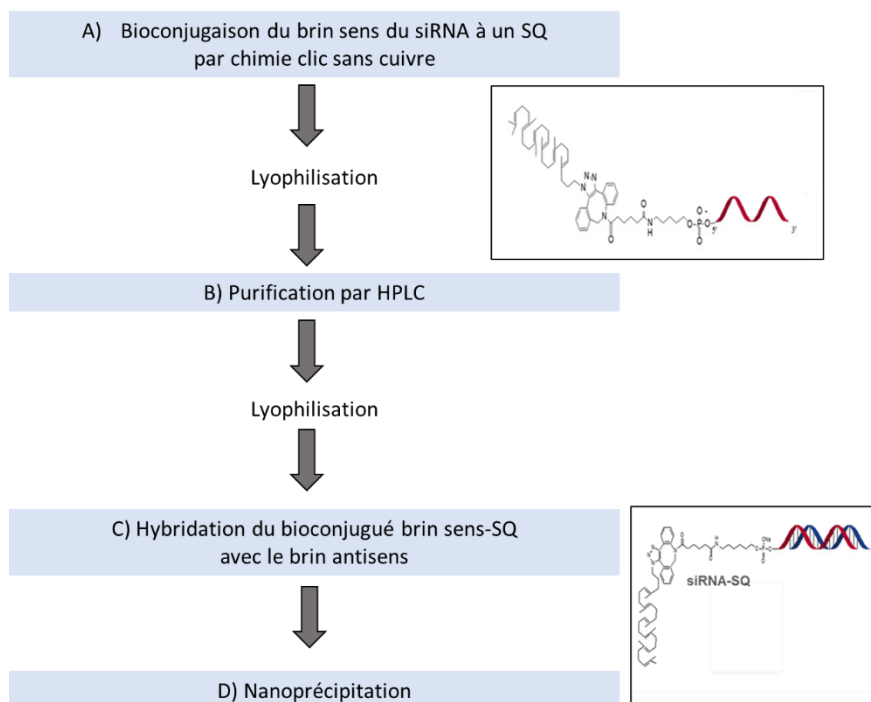


Figure 27 : De la bioconjugaison à la nanoprécipitation des NPs siRNA-SQ. Représentation du protocole de synthèse.

III. Caractérisation des NPs siRNA-SQ

A. Détermination de la taille et de la charge

Après nanoprecipitation, les échantillons NPs siRNA-SQ sont dilués à la concentration finale de 10 μM et leur taille est mesurée par DLS à l'aide du Zétasizer NanoZSP® (Malvern Instrument). Trois mesures sont prises à la suite et les résultats sont présentés sous la forme moyenne d'au moins 3 formulations \pm SEM. Les données présentées sont le diamètre hydrodynamique, correspondant au diamètre réel + couches ioniques, et l'index de polydispersité (PDI) indiquant l'homogénéité de la distribution de la taille des NPs.

La charge de surface, représentée par le potentiel ζ , a également été mesurée par Zétasizer NanoZSP® (Malvern Instrument). Les mesures sont effectuées à l'aide de la cuve DippCell de Malvern (réf ZEN1002), permettant une réutilisation de l'échantillon. Comme précédemment, trois mesures sont effectuées à la suite et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. Des mesures ont également été effectuées en présence de sérum et LDL. Pour cela, les NPs siRNA-SQ ont été incubées préalablement avec des quantités précises de sérum ou LDL et le potentiel ζ a été mesuré.

B. Observation des NPs siRNA-SQ au cryo-TEM

Les analyses de cryo-microscopie ont été effectuées au "Service de Microscopie Electronique" (IBPS / Institut de Biologie Paris-Seine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) grâce à l'aide précieuse de Madame G. Frebourg. Une goutte (5 μL) d'une suspension concentrée de NPs siRNA-SQ (2,2 mg/mL) est déposée sur une grille à trous en cuivre recouverte de carbone. L'excès de liquide est adsorbé à l'aide d'un papier filtre, puis la grille est plongée rapidement dans l'éthane liquide (congélation flash). L'échantillon est transféré dans le porte-objet puis introduit dans le cryo-microscope à transmission électronique (cryoTEM), un JEOL 2100 haut contraste fonctionnant à 200 kV avec un grandissement caméra X 20000. Les images obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel « Image J » pour mesurer la taille des NPs observées.

IV. Caractérisation des NPs siRNA-SQ par diffusion aux petits angles

A. Diffusion de neutrons aux petits angles (Small Angle Neutron Scattering ; SANS)

Pour les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), les solutions ont été préparées dans du D₂O (99,85% D, Euriso-top). Les NPs siRNA-SQ ont été nanoprécipitées dans du D₂O pour atteindre une concentration finale de 0,7 mg/mL. Pour l'étude des interactions entre les NPs siRNA-SQ et l'albumine de sérum bovin (bovine serum albumin ou BSA) ou le sérum de veau bovin (fetal bovine serum ou FBS), les solutions ont été préparées dans du D₂O en utilisant une étape de dialyse. Le FBS a été dialysé pendant une nuit contre du PBS/D₂O à 0,2M juste après l'ouverture du flacon. La poudre lyophilisée de BSA a été solubilisée à une concentration de 13 g/L⁻¹ dans des solutions salines tampons de phosphate (PBS) 0,2 M. Puis la solution a été dialysée pendant une nuit contre une solution de PBS/D₂O à 0,2M d'un volume au moins 10 fois supérieur. La solution finale est ensuite stockée à 4°C pendant une semaine maximum.

Les expériences SANS ont été réalisées sur le spectromètre D33 à l'ILL (doi : 10.5291/ILL-DATA.9-13-781) par les Dr Fabienne Testard et Frédéric Gobeaux de l'UMR CEA-CNRS NIMBE. Trois configurations ont été utilisées pour couvrir une gamme de q allant de 0,0013 à 0,27 Å⁻¹ (longueur d'onde : $\lambda = 13$ Å, distance D du détecteur d'échantillon = 12 m, collimation : $\Phi = 12,8$), ($\lambda = 4,6$ Å, D = 12 m, collimation : $\Phi = 7,8$) et ($\lambda = 4,6$ Å, D = 2 m, collimation $\Phi = 7,8$) pour respectivement les petits, moyens et grands angles.

Les échantillons préparés dans le D₂O sont analysés dans des cellules de quartz Hellma de 1 mm dans un porte-échantillon thermostaté à 20°C. Les données brutes sont regroupées radialement et corrigées pour tenir compte du bruit de fond électronique, de la cellule vide, et normalisées par la diffusion de l'eau à l'aide du logiciel LAMP (Richard, Ferrand et al. 1996).

B. Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering ; SAXS)

Les diagrammes de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été obtenus sur la ligne de faisceaux SWING du synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France).

La gamme de vecteurs de diffusion q de 2x10⁻³ Å⁻¹ à 2,5 Å⁻¹ a été obtenue avec une énergie de 16 keV et deux distances échantillon-détecteur (6 et 0,50 m pour la gamme SAXS)

et WAXS, respectivement). Les données ont été enregistrées par un détecteur bi-dimensionnel Eiger 4M (Dectris). La réduction des données a été effectuée avec le logiciel Foxtrotet. L'échantillon (NPs siRNA-SQ à la concentration de 3,5 mg/mL) a été inséré dans un capillaire de quartz de 1,5 mm de diamètre scellés avec de la cire de paraffine.

C. Modélisation de la structure interne des NPs siRNA-SQ

Les courbes de diffusion ont été ajustées avec le logiciel SASview (www.sasview.org/) selon un modèle de distribution lognormale de sphères pour les particules de siRNA-SQ et un modèle de cylindre pour le groupe siRNA. L'analyse des spectres SANS et SAXS des NPs siRNA-SQ en solution aqueuse permet de dessiner une première esquisse de la forme des NPs.

L'ajustement des courbes expérimentales de siRNA conduit à une forme cylindrique dont le volume est donné par la formule suivante : $V(\text{siRNA}) = \pi \times \text{rayon}^2 \times \text{hauteur}$. L'ajustement des courbes de NPs siRNA-SQ donne une distribution de sphère dont le volume correspond à : $V(\text{sphère/nanoparticule}) = (4/3) \times \pi \times \text{rayon}^3$.

Ainsi, le rapport entre le volume de la sphère de la NPs siRNA-SQ et du volume du siRNA permet de déterminer le nombre de siRNA dans une petite sphère (équation 1) et dans une nanoparticule (équation 2).

$$\frac{V(\text{sphère})}{V(\text{siRNA})} = \text{nombre de siRNA dans une petite sphère} \quad \text{Equation 1}$$

$$\frac{V(\text{nanoparticule})}{V(\text{siRNA})} = \text{nombre de siRNA dans une nanoparticule} \quad \text{Equation 2}$$

V. Électrophorèse des NPs siRNA-SQ

L'étude des interactions entre les NPs siRNA-SQ et le FBS ou avec son composant (BSA ou LDL) a été réalisée par électrophorèse. Ainsi, des quantités croissantes de FBS, BSA (selon le ratio molaire) et LDL (selon le ratio massique) ont été incubées avec 5 μ M de NPs siRNA-SQ et siRNA « nu » pendant 30 min à 37°C. Après ce temps d'incubation, les échantillons sont stockés au -80°C avant dépôt sur le gel d'agarose à 4 % coloré au Midori Green Advance (Nippon Genetic Europe, Allemagne). La migration s'effectue en deux temps, d'abord 15 min à 50 volts puis 30 min à 90 volts. La révélation est réalisée à l'aide d'une caméra UV Vision Capt.

Pour l'étude de la stabilité biologique, une solution stock de NPs siRNA-SQ à 5 μM est incubée à 37°C avec 50% de FBS. A chaque temps (30 min, 1h-6h) prédéterminé, des aliquotes sont collectées et stockées à -80°C avant d'être déposées sur gel d'agarose à 4%.

VI. Spectroscopie de fluorescence

Pour caractériser l'interaction des NPs siRNA-SQ avec l'albumine, deux approches de spectroscopie de fluorescence ont été réalisées.

A. Capture de la fluorescence : BSA fluorescence quenching

La première approche a été réalisée au sein de l'équipe LIONS du CEA avec la collaboration des Dr Fabienne Testard et Frédéric Gobeaux.

Une concentration fixe de BSA (5 μM) a été incubée avec une concentration croissante de NPs siRNA-SQ (de 0 à 10 μM). Les différentes solutions ont été remplies dans des cellules de quartz Hellma Ultra-Micro et insérées dans le fluorimètre Cary Eclipse (Varian, Oxford, UK) pour les mesures. Les échantillons sont excités à 280 nm et la fluorescence émise a été recueillie entre 300 et 550 nm. L'excitation et les fentes d'émission sont réglées à 5 nm. Les taux de balayage ont été réglés à 120 nm/min avec un intervalle de données de 1 nm et un temps de calcul de la moyenne de 0,5 secondes. La moyenne des spectres a été calculée sur 5 mesures. Les expériences d'extinction peuvent être affectées par l'effet de filtre interne, où l'échantillon peut atténuer à la fois le faisceau d'excitation et le spectre d'émission. Ayant travaillé avec des concentrations faibles de BSA et de NPs siRNA-SQ, et la densité optique des solutions était inférieure à 0,1, cet effet a pu être exclu.

L'analyse des données brutes du pic maximum d'émission de la fluorescence permet de déterminer certaines constantes de liaison. L'équation de Stern-Volmer (équation 3) permet de classer la capture de la fluorescence en deux catégories en fonction de la valeur de la constante de quenching K_q (Lakowicz 2013). Le « quenching » statique ($K_q > 10^{10}$ mol/L) se produit lors de la formation d'un complexe, il est associé à un changement du spectre d'absorption (changement de l'intensité). *A contrario*, le « quenching » dynamique ($K_q < 10^{10}$ mol/L) résulte d'un transfert d'énergie entre les NPs et l'albumine. Le spectre de fluorescence n'est alors pas modifié, seul l'état d'excitation l'est (Sangrà, Estelrich et al. 2017). L'équation 3 permet également de calculer la constante d'affinité qui est équivalente à la constante de Stern-Volmer K_{sv} , ainsi que la constante de dissociation correspondant à la réciproque.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} * [siRNA - SQ NPs] = 1 + K_q * \tau_0 * [siRNA - SQ NPs]$$

Equation 3 : Equation de Stern-Volmer. F_0 et F sont l'intensité de fluorescence de la BSA en l'absence et en présence des NPs siRNA-SQ, K_{sv} est la constante de Stern-Volmer calculé à partir de K_q et τ_0 (10^{-8} s) la durée de vie moyenne de la fluorescence du tryptophane en l'absence de quencher

Cette équation peut être modifiée pour déterminer le nombre de sites de liaisons, n , présents sur l'albumine selon l'équation 4.

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + n * \log([siRNA - SQ NPs])$$

Equation 4 : Equation de Stern-Volmer modifiée. K_b est la constante de liaison et n le nombre de site de liaisons présents.

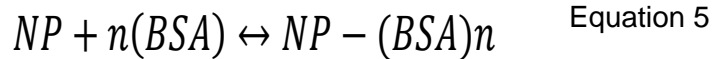
B. Fluorescence d'état stable

La deuxième approche a été réalisée au sein de l'équipe Interface Traitements Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS) de l'université de Paris en collaboration avec le Dr Miryana Hémadi.

a) Etude avec la BSA

A une concentration fixe de NPs siRNA-SQ ($5\mu\text{M}$), a été ajoutée progressivement la BSA (solution mère $100\mu\text{M}$) pour arriver à un ratio molaire finale de 1 [NPs siRNA-SQ $5\mu\text{M}$] : 1 [BSA $5\mu\text{M}$]. Brièvement, un millilitre d'une solution à $5\mu\text{M}$ de NPs siRNA-SQ est remplie dans une cellule de quartz Hellma Ultra-Micro et $2\mu\text{L}$ d'une solution mère à $100\mu\text{M}$ de BSA sont ajoutés progressivement. A chaque ajout, l'échantillon est excité à 280 nm et le spectre d'émission de la fluorescence est enregistré de 300 à 400 nm à l'aide d'un spectromètre Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.

Par cette approche, le complexe NPs siRNA-SQ – BSA va se former progressivement. L'équation de ce complexe s'écrit de la façon suivante :



Les concentrations analytiques en NPs et BSA, dénommées c_0 et c_1 respectivement, sont définies par les formules suivantes :

$$c_0 = [NP]_{libre} + [NP - (BSA)n]_{complexe} \quad \text{Equations 6}$$

$$c_1 = [BSA]_{libre} + n[NP - (BSA)n]_{complexe}$$

L'intensité de fluorescence intrinsèque, F , du mélange NPs siRNA-SQ et BSA s'exprime en fonction des concentrations de toutes les espèces en solutions, pondérées par des facteurs expérimentaux f_1 , f_2 et f_3 selon l'équation 7.

$$F = f_1[NP] + f_2[BSA] + f_3[NP - (BSA)n] \quad \text{Equation 7}$$

En l'absence d'albumine, l'intensité de fluorescence F_0 s'exprime en fonction de c_0 , ce qui permet de déterminer la valeur de f_1 (équation 8).

$$F_0 = f_1 c_0 \longleftrightarrow f_1 = \frac{F_0}{c_0} \quad \text{Equation 8}$$

Nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales, où à la fin de l'expérience le ratio BSA/NPs siRNA-SQ < 1. Ainsi, l'intensité de fluorescence émise F_∞ par le mélange provient seulement de la BSA fixée aux NPs siRNA-SQ et donc l'intensité de la BSA seule est négligeable. L'équation 7 se transforme donc en équation 9 :

$$F_\infty = f_1[NP] + f_3[NP - (BSA)n] \quad \text{Equation 9}$$

Le facteur f_3 pondérant la fluorescence du mélange est déterminé selon la formule suivante :

$$f_3 = \frac{F - f_1(c_0 - c_1)}{c_1} \quad \text{Equation 10}$$

Au fur et à mesure que la BSA va être ajoutée, l'intensité de fluorescence varie :

$$\Delta F = F - F_0 = (f_3 - f_1)[NP-(BSA)n] \quad \text{Equation 11}$$

De cette formule, nous déterminons la concentration du complexe [NPs siRNA-SQ - BSA] :

$$[NP - (BSA)n] = \frac{\Delta F}{f_3 - f_1} \quad \text{Equation 12}$$

La constante apparente de dissociation à 25°C et pH 7, K_{obs} , est déterminée à partir de la concentration des réactifs et produits de l'équation 5

$$K_{obs} = \frac{[NP]_{libre}[BSA]_{libre}}{[NP-(BSA)]_{complexe}} = \frac{\left(c_0 - \frac{\Delta F}{f_3 - f_1}\right)\left(c_1 - \frac{\Delta F}{f_3 - f_1}\right)}{\frac{\Delta F}{f_3 - f_1}} \quad \text{Equation 13}$$

Cette constante est déterminée à partir de la valeur de l'ordonnée à l'origine et de la pente de régression linéaire selon la courbe tracée suivant l'équation suivante :

$$\frac{f_3 - f_1}{\Delta F} = \frac{1}{c_0} + \frac{K_{obs}}{c_0\left(c_1 - \frac{\Delta F}{f_3 - f_1}\right)} \quad \text{Equation 14}$$

b) Etude avec les LDL

Les lipoprotéines de basse densité du plasma humain (LDL) ont été achetées chez Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, réf L3486). Ils sont contenus dans un tampon contenant 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,3 mM EDTA pH 8,3 et 2 mM d'azide de sodium.

A une concentration fixe de NPs siRNA-SQ (5µM – 0,065 µg/µL), a été ajoutée progressivement les LDL (solution mère 2,5 mg/mL) pour arriver à un ratio massique finale de 1 [NPs siRNA-SQ] : 2 [LDL]. Comme précédemment, la solution de NPs siRNA-SQ est remplie dans une cellule de quartz Hellma Ultra-Micro et 2µL de la solution mère des LDL est ajoutée progressivement. A chaque ajout, le spectre d'émission de la fluorescence est enregistré. Ne connaissant pas la masse molaire exacte des LDL, nous ne pouvons pas déterminer leurs

concentrations molaires et ainsi résoudre les équations précédentes. Ainsi, seul l'étude qualitative du changement de la fluorescence a pu être réalisée.

VII. Dichroïsme circulaire du rayonnement synchrotron (Synchrotron radiation circular dichroism ; SRCD)

Des expériences de SRCD ont été réalisées sur la ligne de faisceaux DISCO au synchrotron SOLEIL (Saint Aubin, France). Les échantillons ont été préparés la veille et stockés à 4°C pour les NPs siRNA-SQ ou -20°C pour le siRNA « nu ». Les concentrations du siRNA sous forme « nu » ou lié au SQ avant et après nanopréciptation sont présentées dans le tableau 9. La solution mère de BSA a été préparée par solubilisation de la poudre lyophilisée à 8 mg/ml dans de l'eau distillée.

Tableau 9 : Concentration des échantillons siRNA utilisés pour l'étude par dichroïsme circulaire

Echantillons	Concentration (mg/mL)
siRNA « nu » hybridé	1,3
Bioconjugués hybridés siRNA-SQ (avant nanopréciptation)	1,7
Nanoparticules siRNA-SQ (après nanopréciptation)	1,8

L'étude de la conformation du siRNA à deux étapes de la synthèse a été réalisée ainsi que l'étude de l'interaction avec la BSA par mélange entre les NPs siRNA-SQ et la BSA selon un ratio volume/volume 1 [NPs siRNA-SQ] / 1 [BSA]. Des gouttelettes de 4 µL des échantillons ont été insérées dans des cellules de CaF2 (Hellma) avec une longueur de parcours de 3,7 µm. Les spectres bruts ont été acquis avec une résolution spectrale de 1 nm. Les spectres présentés dans cette étude ont été traités avec le logiciel CDTTool.12. Ils sont chacun la moyenne de trois spectres. Un bruit de fond (spectre d'eau ou spectre tampon correspondant acquis dans les mêmes conditions) leur a été soustrait. L'étalonnage de l'intensité a été obtenu avec un échantillon standard de l'échelle CSA à l'acide sulfonique de camphre. Les intensités ont été converties de milligrammes (θ unités machine) en $\Delta\epsilon$ en utilisant la formule $\Delta\epsilon = \theta * (0.1 * MRW) / (3298 * l * C * 3298)$, où MRW est le poids moyen des résidus de la BSA (poids de la protéine / nombre de résidus = 114 Da), l est la longueur du trajet de la cellule CaF2 en

cm et C est la concentration de la protéine en mg/ml. Nous avons occasionnellement ajouté une fonction de lissage.

VIII. Calorimétrie par titrage isotherme (ITC)

L'étude de la différence de chaleur produite par l'interaction entre les NPs et l'albumine par calorimétrie isotherme a été réalisée au sein du laboratoire ITODYS avec le Dr Miryana Hémadi (Université de Paris, ITODYS, CNRS-UMR 7086, 15 rue J.-A. de Baïf, F-75013 Paris).

Les calorimétries de titrage isotherme ont été effectuées à 25°C dans de l'eau exempte de RNase avec un calorimètre Nano-ITC à faible volume (Instruments TA). La concentration de NPs siRNA-SQ a été fixée à 5 µM et l'albumine dans la seringue d'injection est plus concentrée à 100µM. Une première injection de 1µL a été suivie de 25 injections de 2µL toutes les 1200s. Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Les constantes thermodynamiques et de dissociation de l'interaction entre les NPs siRNA-SQ et l'albumine ont été calculées à l'aide du logiciel des instruments TA, NanoAnalyze.

IX. Lignées cellulaires et culture

Deux lignées cellulaires ont été utilisées au cours de cette étude. La lignée BHP 10-3 est issue de carcinome papillaire de la thyroïde et exprime l'oncogène de fusion RET/PTC1. Les cellules MSC80 sont une lignée cellulaire de cellules de Schwann murines exprimant la glycoprotéine PMP22. Ces deux types cellulaires ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂ et de 95% d'humidité dans un milieu complet Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose GlutaMAX™ 1X (réf 31966021) complété par 10% de FBS heat inactivated (Gibco Life technologies, réf 11550356) 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco Life Technologies, réf 15070-063).

X. Transfection cellulaire *in vitro*

Une des caractéristiques des NPs siRNA-SQ est qu'elles ne peuvent pas entrer spontanément à l'intérieur des cellules *in vitro* sans l'aide d'un agent transfectant cationique (Raouane, Desmaele et al. 2011, Ali, Maksimenko et al. 2014, Urbinati, de Waziers et al. 2016, Massaad-Massade, Boutary et al. 2018). L'un des buts de cette étude a été de comprendre

cette différence d'efficacité thérapeutique observée *in vivo* et *in vitro* en vérifiant différentes hypothèses. La Lipofectamine® (Invitrogen, réf 11668) utilisée a servi de contrôle positif pour les prochaines expériences.

A. Etude de l'effet de la charge sur l'internalisation *in vitro* des NPs siRNA-SQ

a) Inversion de la charge négative des NPs siRNA-SQ

Pour vérifier le rôle de la charge dans l'internalisation des NPs, un guanidyl-hydrazone SQ a été synthétisé par le Dr Didier Desmaële à l'Institut Galien (UMR CNRS 8612) selon Bertrand *et al.*, (Bertrand, Lucas *et al.* 2015). Ce dérivé cationique est solubilisé dans l'acétone à la concentration de 1 mg/mL et ajouté goutte-à-goutte aux NPs siRNA-SQ déjà formées selon un ratio molaire 1 [NPs] : 100 [SQ⁺] (figure 28). Le solvant organique est ensuite évaporé pendant 30 min sous agitation sous le flux d'azote afin d'obtenir des NPs siRNA-SQ : SQ⁺ en solution aqueuse. La taille et le potentiel ζ sont mesurés à l'aide du Zétasizer NanoZSP (Malvern).

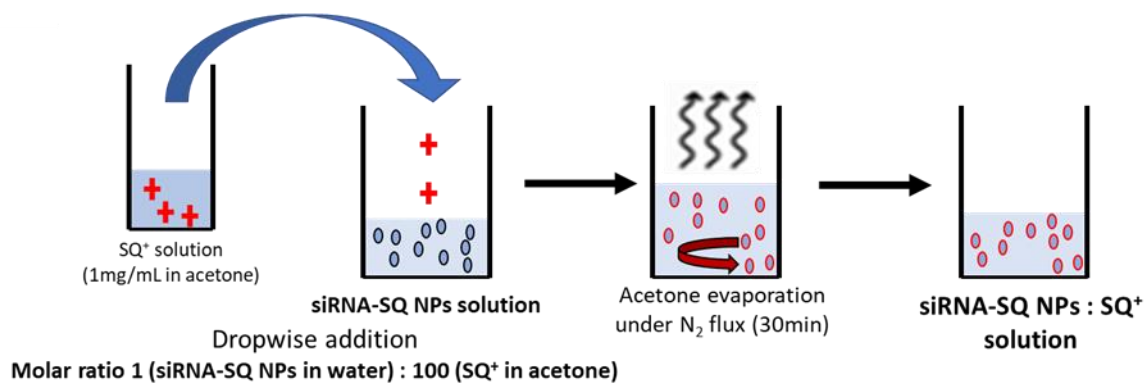


Figure 28 : Représentation schématique de l'ajout de SQ⁺ sur les NPs siRNA-SQ

b) Effet de la charge positive sur l'internalisation *in vitro*

L'activité inhibitrice de ces NPs néo-cationiques a été évaluée par transfection. Dans ce but 24h avant la transfection, 3×10^5 cellules de BHP 10-3 et MSC80 ont étéensemencées, dans des plaques six puits dans un milieu DMEM complet avec 10% de FBS, de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (10 µg/mL). Le lendemain, le milieu des cellules a été remplacé par 2mL de milieu Opti-MEM (Gibco life technologies, réf11058021). Les NPs

siRNA-SQ et le siRNA « nu » ont été transfectés avec la Lipofectamine 2000 selon les recommandations du fournisseur dans ce milieu réduit Opti-MEM pour une concentration finale 50 nM/puits. De même, les NPs siRNA-SQ : SQ⁺ et les NPs siRNA-SQ seules (en tant que contrôle négatif) ont été ajoutées dans l'Opti-MEM et mis en présence des cellules. Après quatre heures, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu DMEM complet. Après 48 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, la transfection est arrêtée par trypsinisation et centrifugation des cellules. L'ARN est extrait pour analyser l'expression des gènes ciblés (RET/PTC1 et PMP22).

B. Rôle de la disponibilité de la surface cellulaire

La deuxième hypothèse concerne la disponibilité de la surface cellulaire. Dans ce but, des transfections inverses ont été réalisées. Ce mode de transfection permet une plus grande disponibilité de la surface cellulaire par l'élimination partielle des protéines de surface après trypsinisation (Amarzguioui 2004). Ceci faciliterait l'internalisation cellulaire des NPs siRNA-SQ sans l'aide d'un agent transfectant cationique. Dans la transfection inverse, l'ensemencement des cellules et la transfection se passent au même moment, ce qui signifie qu'aucun changement de milieu n'est réalisé et que les NPs siRNA-SQ et le siRNA « nu » restent en contact avec les cellules tout le temps d'incubation.

Ainsi, 3 x 10⁵ cellules BHP 10-3 et 4 x 10⁵ cellules MSC80 par puit ont été centrifugées (2500 rpm pendant 5min) dans un Falcon 15 mL. Le surnageant est aspiré et le culot est directement repris par pipetage avec la solution de transfection Opti-MEM contenant les NPs siRNA-SQ (50 nM/puits) avec ou sans Lipofectamine® ainsi que le siRNA « nu » transfecté avec la Lipofectamine®. Puis le milieu DMEM supplémenté avec du 10% FBS, de la pénicilline (100U/mL) et streptomycine (10µg/mL), est ajouté au Falcon qsp 2 mL/puit. L'ensemble cellules+NPs+milieu est ensemencé dans une plaque 6 puits. Après 48 et 72 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les cellules sont récoltées et l'expression des gènes a été analysée par RT-qPCR après extraction de l'ARNm.

C. Effet du LDLR et de la pré-incubation

a) Augmentation de l'expression du récepteur des LDL (LDLR)

Pour voir s'il est possible d'augmenter l'expression du LDLR, 3 x 10⁵ cellules de chaque lignée cellulaire, BHP 10-3 et MSC80, ont été ensemencées dans des plaques 6 puits contenant du DMEM complété par 1% de FBS, de la pénicilline (100 U/mL) et de la

streptomycine (10 µg/mL) pendant 48h. Les cellules sont ensuite récoltées et les protéines extraites pour étudier l'expression du récepteur des LDL.

b) Etude de l'effet de l'augmentation du LDLR et de l'incubation des NPs avec le sérum

Après avoir montré que l'expression du LDLR était augmentée, 3×10^5 cellules de chaque lignée cellulaire ont étéensemencées dans des plaques six puits contenant du DMEM complété par 1% de FBS, de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (10 µg/mL) pendant 48h. Après ce temps d'incubation à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, le milieu des cellules a été remplacé par 2mL de milieu Opti-MEM (Life Technologies). Les NPs siRNA-SQ et le siRNA « nu » sont pré-incubés à 37°C pendant 30 min avec 50% de FBS ou des LDL selon un ratio massique 1 [NPs siRNA-SQ ou siRNA « nu »] : 1 ou 8 [LDL]. Ils sont ensuite ajoutés aux cellules pour une concentration finale de 50 nM dans le puit. Dans le même temps, les contrôles positifs, NPs siRNA-SQ et siRNA « nu », sont transfectés avec la Lipofectamine®. Pendant 4h, les cellules MSC80 et BHP 10-3 sont ainsi en présence des différentes conditions suivantes :

- Non traité
- siRNA « nu » anti-RET/PTC1 pour la lignée BHP 10-3 et anti-PMP22 pour la lignée MSC80, transfectés avec la Lipofectamine
- NPs siRNA anti-RET/PTC1-SQ ou PMP22-SQ pour les lignées BHP 10-3 et MSC80 respectivement, transfectées avec la Lipofectamine
- NPs siRNA anti-RET/PTC1-SQ ou PMP22-SQ pour les lignées BHP 10-3 et MSC80 respectivement, pré-incubées avec 50% FBS ou LDL selon deux ratios massiques
- siRNA « nu » anti-RET/PTC1 pour la lignée BHP 10-3 et anti-PMP22 pour la lignée MSC80, pré-incubés avec 50% FBS ou LDL selon deux ratios massiques

A la fin de ces quatre heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu DMEM complet. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont collectées et recueillies. L'ARNm va être extrait pour analyser l'expression du gène ciblé (RET/PTC1 et PMP22).

XI. Extraction de l'ARNm et PCR quantitative en temps réel (Real Time PCR ; RT-qPCR)

Après chacune des transfections, l'expérience est arrêtée par trypsinisation des cellules, suivie par centrifugation. Le culot cellulaire est conservé à -80°C et repris le jour de l'extraction avec 200 µL du tampon spécifique RLT (Qiagen, réf 79216). L'ARN total a été extrait à partir de ce culot cellulaire de cellules BHP 10-3 et MSC80 à l'aide du mini-kit RNeasy (Qiagen, réf 74106). Ensuite, la transcription inverse a été effectuée en plusieurs étapes selon le protocole du fabricant FisherScientific à l'aide du tampon RT M-MLV (FisherScientific, France, réf 10512703).

Enfin, une PCR en temps réel (qPCR) a été réalisée avec CFX96™ Real-time system (Biorad) en utilisant le mélange Maxima Syber Green Rox qPCR (FisherScientific, réf 11893913) selon les instructions du fabricant. La séquence des primers utilisés (Eurofins Genomics) est présentée dans le tableau 10. L'expression relative d'ARNm des gènes ciblés (RET/PTC1 et PMP22) a été comparée à celle des cellules non traitées après normalisation sur l'expression du gène contrôle GAPDH selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 10 : Séquence des primers reverse (R) et forward (F) des gènes RET/PTC1, PMP22 et GAPDH

	Séquence 5' → 3'
RET/PTC1 F	AGA-TAG-AGC-TGG-AGA-CCT-AC
RET/PTC1 R	CTG-CTT-CAG-GAC-GTT-GAAT
PMP22 F	AAT-GGA-CAC-ACG-ACT-GAT-C
PMP22 R	CCT-TTG-GGT-GAG-AGT-GAA-GAG
GAPDH F	ATC-CCA-TCA-CCA-TCT-TCC-AG
GAPDH R	CCA-TCA-CGC-CAC-AGT-TTC-C

XII. Western Blot

A. Etude de l'expression de LDLR dans différentes lignées cellulaires

L'expression du récepteur des LDL a été analysée dans les différentes lignées cellulaires de l'équipe. Ainsi 20µg de protéines extraites des lignées issues de carcinomes papillaires de la thyroïde (TCP1, BHP 10-3 et RP3), de cancer de la prostate (VCaP), de sarcome d'Ewing,

(A673) et de cellules de Schwann murines (MSC80) ont été déposées sur un gel à gradient 4-12% (NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 4-12%, Life technologies, Saint-Aubin, France).

Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du iBlotDry 2 (Invitrogen, France). Après une heure de blocage dans du lait à 5 %, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire suivant : le LDLR monoclonal de lapin (anticorps recombinant anti-LDL Receptor [EP1553Y] (ab52818) 1:1000 ; Abcam Biochemicals, Paris, France) et la tubuline monoclonale de souris (mAb#3873 - 1 : 10 000 ; Cell signalling Technology, Schuttersveld, Pays-Bas) comme contrôle interne. Les membranes ont ensuite été lavées et incubées avec l'anticorps anti-lapin secondaire correspondant, conjugué à l'HRP pour le LDLR (peroxydase de raifort, 1:3000. Cell Signaling Technology) et l'anticorps anti-souris conjugué à l'HRP pour la tubuline (peroxydase de raifort, 1:3000. Cell Signaling Technology). Les bandes ont été visualisées par un réactif de chimiluminescence amélioré SuperSignal™ West Femto (ThermoScientific, France).

B. Augmentation de l'expression du LDLR

A partir des extraits protéiques obtenus après culture des cellules BHP 10-3 et MSC80 pendant 48h dans un milieu avec 1% de FBS, les protéines cytosoliques et membranaires ont été extraites à l'aide d'un kit spécifique acheté chez ThermoScientific, Mem-PER™ Plus Kit (réf 89842). Les protéines sont titrées par la méthode Bradford (BioRad) selon les instructions du fabricant.

Les extraits de protéines membranaires ont ensuite été chargés sur un gel à gradient 4-12% (NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 4-12%, Life technologies, Saint-Aubin, France) et les protéines ont été transférées à l'aide du iBlotDry 2 (Invitrogen, France). Après une heure de blocage dans du lait à 5 %, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire suivant : le LDLR monoclonal de lapin (anticorps recombinant anti-LDL Receptor [EP1553Y] (ab52818) - 1:1000 ; Abcam Biochemicals, Paris, France) et la β -Actine monoclonale de souris (13E5 - 1 :10000, Cell Signaling Technology, Schuttersveld, Pays-Bas) comme contrôle interne. Les membranes ont ensuite été lavées et incubées avec l'anticorps anti-lapin secondaire correspondant, conjugué à l'HRP pour le LDLR (peroxydase de raifort, 1:3000. Cell Signaling Technology) et l'anticorps anti-souris conjugué à l'HRP pour la β -Actine (peroxydase de raifort, 1:3000. Cell Signaling Technology). Les bandes ont été visualisées par un réactif de chimiluminescence amélioré SuperSignal™ West Femto (ThermoScientific, France).

XIII. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM.

Pour comparer les mesures de tailles et potentiel ζ , un test de Mann-Whitney a été réalisé.

Sauf indication contraire, toutes les études *in vitro* ont été répétées deux fois et chaque expérience a été réalisée en duplicata. En utilisant le logiciel GraphPad Prism 5, un test Anova a été utilisé suivi d'un test Bonferroni pour comparer les différents groupes entre eux. $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Résultats

I. Synthèse, bioconjugaison et nanopréciipitation des siRNA-SQ

A. Synthèse et bioconjugaison

Pour pallier la faible demi-vie du siRNA « nu » et d'améliorer ses paramètres pharmacocinétiques, nous l'avons conjugué à une molécule lipophile, le SQ par chimie clic sans cuivre. Le brin sens du siRNA est modifié en 5' par une fonction DBCO et un brin espaceur dénommé C6 (Figure 29A) et le SQ par une fonction azide (Figure 29B). La forte réactivité entre ces deux molécules permet de former en une étape un bioconjugué (BC) brin sens siRNA-SQ lié par une fonction triazole (Figure 29C).

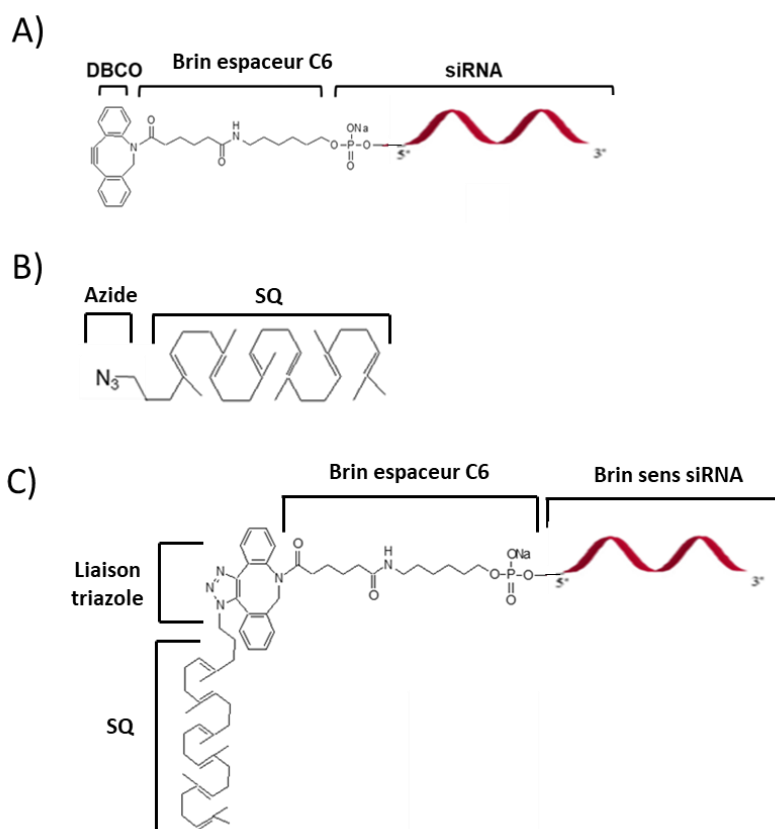


Figure 29 : Modifications chimiques et bioconjugaison du siRNA au SQ par chimie clic sans cuivre. A) Le brin sens du siRNA modifié par la fonction chimique DBCO et ajout d'un brin espaceur C6. B) Le SQ est modifié par une fonction azide N₃. C) Le BC résultant lie le brin sens du siRNA au SQ par une fonction triazole

Le bioconjugué synthétisé est purifié par HPLC, de l'excès de SQ utilisé pour la chimie clic sans cuivre. Deux séquences ont été utilisées au cours de cette étude. La première cible l'oncogène de fusion RET/PTC1 retrouvé dans plus de 50% des carcinomes papillaires de la thyroïde et la deuxième, celle du gène PMP22 codant pour une glycoprotéine dont la surexpression est responsable de la maladie CMT1A.

La figure 30 est une superposition des chromatogrammes représentant le brin sens des siRNA PMP22 et RET/PTC1 (en bleu sur la figure) et les BC brin sens des siRNA PMP22 et RET/PTC1 lié au SQ (en noir). Les **BC formés brin sens-SQ** sont **plus lipophiles et ont donc plus d'interactions avec le greffage apolaire de la colonne HPLC ce qui retarde son temps d'élution** (16 min contre 9 min pour les brins sens seuls). Ce temps d'élution est **identique quel que soit la séquence du brin sens** (PMP22 ou RET/PTC1). De plus, lorsque le bioconjugué est analysé par HPLC (chromatogramme noir), il n'y a aucun signal à 9 min confirmant que **la réaction de bioconjugaison par chimie clic sans cuivre est quasi-complète**.

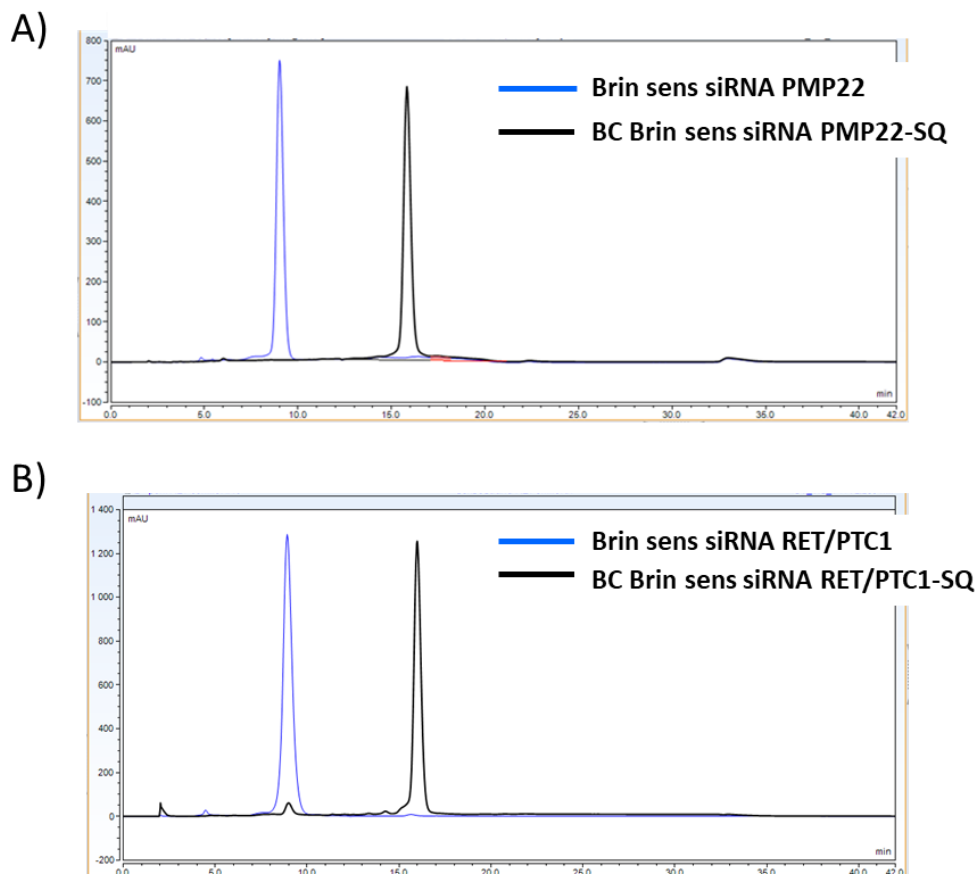


Figure 30: La conjugaison au SQ augmente la lipophilie du brin sens des siRNA. Superposition des chromatogrammes HPLC du brin sens des siRNA PMP22 (en A spectre bleu) et RET/PTC1 (en B spectre bleu) et des BC brin sens PMP22-SQ (en A spectre noir) et RET/PTC1-SQ (en B spectre noir). Le temps d'élution des BC est de 16 min, supérieur à celui du brin sens.

B. Mise au point de la nanoprécipitation

Le changement de la méthode de bioconjugaison a entraîné des modifications dans la taille finale des NPs et un besoin d'optimiser la méthode de nanoprécipitation. Pour cela, différents solvants organiques et ratios volume/volume ont été testés (Tableau 11).

Tableau 11 : Optimisation de la méthode de nanoprécipitation. *Est encadré en rouge les conditions actuelles de nanoprécipitation.*

Solvant organique	Eau ± dextrose 5%	Ratio V/V Org:aq	Concentration	Diamètre par DLS
EtOH 96%	+ dextrose	1 : 2	20 µM	554 nm ± 39
EtOH 70%	+ dextrose	1 : 2	10 µM	345 nm ± 81
	+ dextrose	1 : 4	10 µM	344 nm ± 89
	-	1 : 2	10 µM	287 nm ± 38
	-	1 : 4	10 µM	434 nm ± 75
EtOH 90%/THF* 10%	-	1 : 2	10 µM	189 nm ± 41
	-	1 : 2	20 µM	457 nm ± 115
Acétone	-	1:2	10 µM	206 nm ± 22

Nos résultats montrent que l'**acétone** est le solvant organique permettant d'obtenir une **taille de NPs siRNA-SQ < 300nm donc injectable sans risque dans la circulation sanguine.**

II. Etude de l'identité synthétique des nanoparticules siRNA-SQ

Après nanopréciipitation, les NPs vont avoir des paramètres physico-chimiques (taille, charge et forme) spécifiques dans leur liquide de solubilisation (eau pour les NPs siRNA-SQ). Ces paramètres définissent l'identité synthétique de la nanoparticule. Sa connaissance nous permet de savoir si notre nanoformulation est injectable sans risque *in vivo*.

A. Les NPs siRNA-SQ ont une taille ~200 nm et un potentiel ζ ~-35 mv

Après bioconjugaison et nanopréciipitation, les NPs résultantes n'ont pas une taille et un index de polydispersité (PDI) significativement différents : 180 nm \pm 7 nm (PDI 0,143 \pm 0,019) et 218 \pm 15 nm (PDI 0,163 \pm 0,018) pour les NPs siRNA RET/PTC1-SQ et PMP22-SQ respectivement (Figure 31A et B). Le potentiel ζ correspondant à la charge à la surface des NPs a également été déterminé (Figure 31C). Il est négatif, -35mV, favorisant les répulsions électrostatiques entre les NPs, limitant ainsi les risques d'agrégations entre elles. Aucune différence significative n'a également été mise en évidence entre les deux nanoformulations, NPs siRNA RET/PTC1-SQ et NPs siRNA PMP22-SQ, pour la charge.

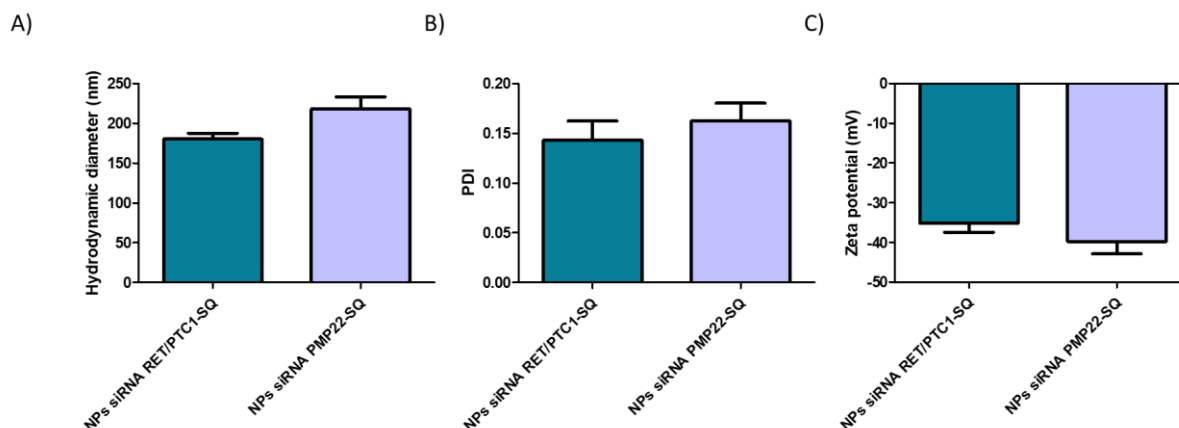


Figure 31 : Caractéristiques physico-chimiques des NPs RE/PTC1-SQ (n = 9) et PMP22-SQ (n = 6). A) Diamètre hydrodynamique de deux formulations de NPs siRNA-SQ. B) Index de polydispersité PDI. C) Potentiel ζ . (Mann-Whitney test)

B. Les NPs ont une forme sphérique en solution aqueuse

Pour déterminer la forme et le diamètre réel des NPs siRNA-SQ, une observation au cryo-TEM a été effectuée au “Service de Microscopie Electronique” (IBPS / Institut de Biologie Paris-Seine, Université P. et M. Curie, Paris, FRANCE) grâce à l’aide précieuse de Madame G. Frebourg. Les images obtenues montrent des **nano-objets d’une taille inférieure à 200 nm** et de forme **sphérique** (Figure 32). En revanche, nous n’avons pas pu mettre en évidence d’organisation supramoléculaire à l’intérieur d’une nanoparticule.

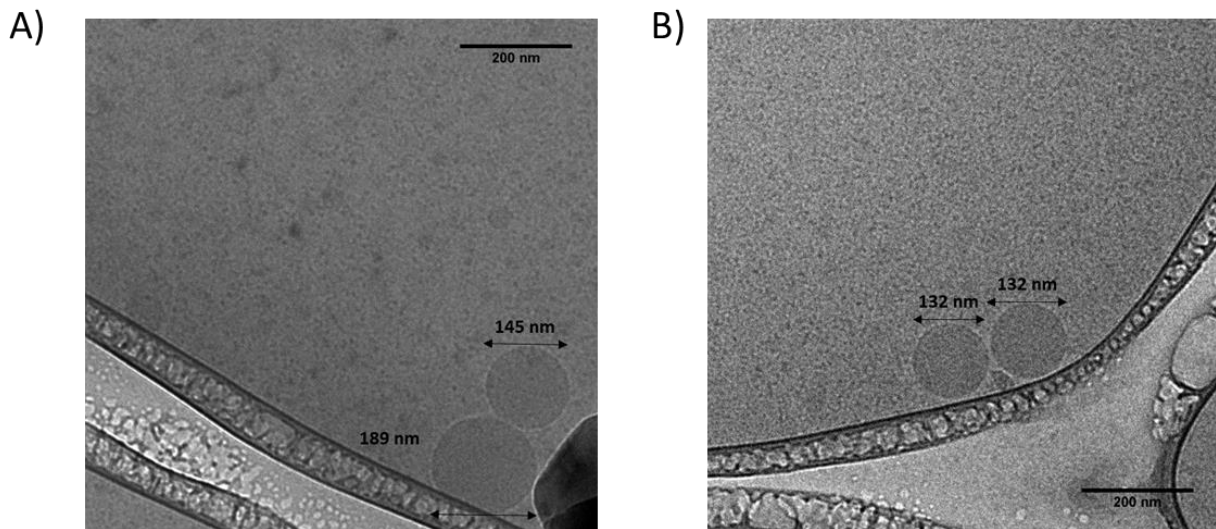


Figure 32 : Les NPs siRNA-SQ ont une forme sphérique. Observation des NPs siRNA TPMRSS2-ERG-SQ (A) et PMP22-SQ (B) au cryoTEM

L’ensemble des résultats montre que les paramètres physicochimiques des NPs siRNA-SQ sont quasi semblables (taille < 300 nm, PDI < 0.2, potentiel ζ légèrement négatif ~ -35 mV) et ceci quel que soit la séquence du siRNA utilisé (TPMRSS2-ERG (Massaad-massade et al., 2018), RET/PTC1 ou PMP22). Par conséquent, les études structurales peuvent se faire sur les NPs siRNA-SQ quelles que soit la séquence encapsulée dans la nanoparticule.

C. Article de recherche

Le développement de la méthode chimie clic sans cuivre ainsi que l'optimisation des paramètres sont décrits dans l'article de recherche ci-après (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018). Cette nouvelle méthode de couplage a été réalisée avec deux polyterpènes différents, le SQ et le solanésol, et deux protocoles différents (hybridation avant ou après le couplage chimique). Seule la formulation du siRNA lié au SQ et hybridé après le couplage a montré une activité antinéoplasique significative et ce travail de thèse a porté sur cette nanoformulation.

New Formulation for the Delivery of Oligonucleotides Using “Clickable” siRNA-Polyisoprenoid-Conjugated Nanoparticles: Application to Cancers Harboring Fusion Oncogenes

Liliane Massaad-Massade,^{*,†,‡,§} Suzan Boutary,^{†,‡,§} Marie Caillaud,^{†,‡,§} Celine Gracia,^{†,‡,§} Beatrice Parola,[‡] Soukaina Bel Gnaouiya,[‡] Barbara Stella,[‡] Silvia Arpico,[‡] Eric Buchy,^{||} Didier Desmaële,^{||} Patrick Couvreur,^{||} and Giorgia Urbinati^{†,‡,§}

[†]Université Paris-Saclay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France-94805

[‡]CNRS, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France-94805

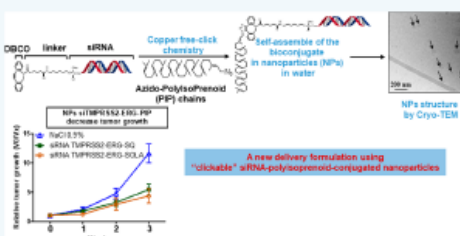
[§]Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France-94805

^{||}Institut Galien, UMR CNRS 8612, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 5 rue J. B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

[‡]Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Via Pietro Giuria 9, 10125 Torino, Italy

Supporting Information

ABSTRACT: The aim of the present study is to take advantage of the unique property of polyisoprenoid chains to adopt a compact molecular conformation and to use these natural and biocompatible lipids as nanocarriers of drugs to deliver siRNA. A new chemical strategy is applied here to conjugate squalene (SQ) and solanesol (SOLA) to siRNA consisting of an activated variant of the azide–alkyne Huisgen cycloaddition also known as copper-free (Cu-free) click chemistry. We conjugated siRNA against TMPRSS2-ERG, a fusion oncogene found in more than 50% of prostate cancers to SQ or SOLA. First, several parameters such as molar ratio, solvents, temperature, incubation time, and the annealing schedule between both siRNA strands were investigated to bioconjugate the SQ or SOLA via Cu-free click chemistry. The best parameters of the new bioconjugation approach allowed us to (i) increase the synthesis yield up to 95%, (ii) avoid the formation of byproducts during the synthesis, and (iii) improve the reproducibility of the bioconjugation. Then, the biological activity of the resulting nanoparticles was assessed. In vitro, all four formulations were able to decrease the corresponding oncogene and oncoprotein expression. In vivo, only two of the four nanoformulations showed anti-neoplastic activity that seems to be tightly related to their dissimilar biodistribution behavior. In conclusion, we performed a new approach easily transposable for pharmaceutical development to synthesize siRNA-SQ and siRNA-SOLA and to obtain efficient siRNA-nanoparticles. The robustness of the process could be extended to several other polyterpenes and likely applied to other siRNA targeting genes whose overexpression results in the development of cancers or other genetic diseases.



INTRODUCTION

Over the past two decades, the antisense oligonucleotides and in particular the small interfering RNAs (siRNA) have been extensively studied. They represent a potential powerful therapy for gene-specific diseases and, consequently, an efficient tool for gene modulation. The use of siRNA as a therapeutic approach is still under investigation for cancer treatment, in early and advanced clinical phases, as well as for noncancer diseases (i.e., macular degenerative disease, infections, and genetic disorders such congenital Pachyonychia) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=siRNA&Search=Search>).^{1,2} However, despite the strong potential of siRNAs as therapeutic agents, none of them has been approved yet by the “Food and Drug Administration”.

In fact, in vivo delivery of siRNAs is a key challenge because their biological efficacy is hampered by short plasmatic half-life due to poor stability in biological fluids and by low intracellular penetration due to their highly hydrophilic characteristics.³ Thus, extensive research has been carried out to overcome those hurdles and to establish platforms for siRNA delivery. So far, a wide variety of delivery systems including viral-vectors and nonviral approaches have been developed.^{4,5} However, the cytotoxic effects of some of these vectors, often due to the use of cationic transporter materials, are now well documented.^{6,7}

Received: March 21, 2018

Revised: April 26, 2018

Published: May 4, 2018

There is, therefore, an urgent need to establish new strategies for delivering siRNA using new and safer nanocarriers. Hence, neutral lipid–oligonucleotide conjugates have become a subject of considerable interest to improve the half-life of siRNA and their delivery.⁸

Polyisoprenoids, a part of a large class of natural, flexible, and biocompatible biopolymers, have been described as being able to adapt to a wide variety of biologically active compounds due to their physicochemical characteristics.⁹ For example, siRNAs were conjugated to squalene, an acyclic triterpene, to target various fusion oncogenes, including RET/PTC frequently expressed in papillary thyroid carcinoma and TMPRSS2-ERG found in more than 50% of prostate cancer biopsies.^{10–15} The siRNA RET/PTC1 has been covalently linked to the acyclic isoprenoid chain of squalene, and the resulting bioconjugate was found to be able to self-assemble in water into nanoparticles ($\sim 165 \pm 10$ nm).¹³ Moreover, the resulting siRNA-squalene nanoparticles (siRNA-SQ NPs) were capable of extensively inhibiting the growth of papillary thyroid carcinoma xenografts in mice. Similar results were observed when siRNA TMPRSS2-ERG was conjugated to squalene (i.e., “squalenoylated”), nanoprecipitated, and the resulting nanoparticles were injected into mice bearing prostate cancer xenografts. Thus, the squalenoylation method may represent a new noncationic siRNA delivery system. Indeed, recent studies demonstrated the interaction of squalene derivatives with lipoproteins which suggest the role of low-density proteins as a Trojan horse to deliver squalene based nanoparticles within the tumor.^{16,17}

Nevertheless, the vectorization method mentioned above involving the hetero-Michael addition reaction of 3'-thiol-siRNA with squalene maleimide suffered from a moderate conversion that led to a laborious and low-yielding HPLC purification. With the objective of improving the overall yield and to shorten the synthetic scheme, we decided to explore the copper-free (Cu-free) click chemistry synthesis. This reaction is a mild and fast Huisgen cycloaddition between a strained alkyne and an azide, enabling the selective formation of a triazol product.^{18,19} In this process, the use of highly strained alkynes abolishes the need for copper catalyst in the reaction that could degrade the siRNA and thus circumvents the difficulties of final purification of oligonucleotides.

Furthermore, with the aim of modulating the amphiphilic balance of the conjugate we used solanesol (SOLA), a natural nonaprenol isolated from tobacco leaves. SOLA is widely used for the synthesis of coenzyme Q10 and vitamin K2 and possesses many pharmacological activities.^{20,21} Recently, solanesol has also been described to have an inhibitory effect on the focal adhesion kinase protein, thus presenting anticancer properties.²² With a regular polyisoprenoid chain of 45 carbons, SOLA was expected to increase the hydrophobic characteristics of the conjugate with respect to SQ (C₃₂ chain). This increased lipophilicity was meant to increase the stability of the nanoparticles as well as provide a spontaneous uptake by tumor cells in vitro which is not observed for siRNA-SQ NPs except with the use of a cationic compound. Moreover, the presence of a terminal hydroxyl group makes it easy to introduce the required azide anchoring group.

This article describes the conjugation of the highly hydrophilic and fragile siRNA to the lipophilic SQ or SOLA by Cu-free click chemistry. In fact, this new type of chemistry applied conjugation of the SQ to siRNA allowing a much greater yield of the desired bioconjugate compared to the

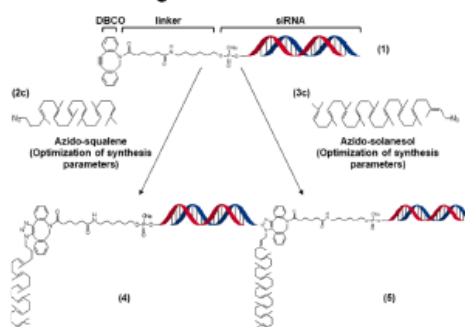
Michael addition employed before, and is a one-step reaction. In addition, the process is much faster and more reproducible. The high yield, the absence of byproducts, and the reproducibility of the synthesis allowed the application of this approach to two different siRNA sequences. Moreover, the Solanesol has never been conjugated before to siRNA and never studied as vector for oligonucleotides in vitro and in vivo. In conclusion, extensive characterization of the resulting nanoparticles and the biodistribution studies allowed, for the first time, one to highlight the importance of the structure and organization of the nanoassemblies to preserve the efficacy of the siRNA-SQ NPs in vivo.

RESULTS

Cu-Free Click Chemistry Strikingly Increases the Yield of the siRNA TMPRSS2-ERG Bioconjugates. In order to increase the yield of the bioconjugation previously obtained by a Hetero-Michael addition reaction,^{10,11,13–15} a new strategy based on the Cu-free click chemistry was investigated to conjugate the siRNA to polyisoprenoids. Thus, the siRNA TMPRSS2-ERG bioconjugates were synthesized according to the 1,3-dipolar cycloaddition of azides (squalene/solanesol) and dibenzocyclooctyne-modified siRNA as shown in Scheme 1 and Figure SI 1.

The *N*-(hexamethylenyl)-6-oxo-hexanamide spacer was introduced between the 5'-end of the sense strand of the siRNA and the reactive group dibenzocyclooctyne (DBCO) (Scheme 1 (1)) to allow functionalization and bioconjugation to azido-squalene (Scheme 1 (2c) and Figure SI 1) or azido-solanesol

Scheme 1. Cu-Free Click Chemistry to Synthesize siRNA TMPRSS2-ERG-SQ/SOLA^{4a}



^a(1) The sense strand was modified by a DBCO residue at the 5'-end of the siRNA TMPRSS2-ERG. To avoid a steric hindrance, a linker was used. (2c) Squalene was modified by an azide (SQ-N₃) to react with the DBCO residue of the siRNA TMPRSS2-ERG. (2e) Solanesol was modified by an azide (SOLA-N₃) to react with the DBCO residue of the siRNA TMPRSS2-ERG. (4) The bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ was obtained by applying the following parameters: (i) molar ratio of 1:50 of siRNA TMPRSS2-ERG and SQ-N₃ respectively; (ii) in the presence of DMSO/acetone/H₂O; (iii) at room temperature; (iv) incubating for 12 h under stirring. (5) The bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA was obtained by applying the following parameters: (i) molar ratio of 1:50 of siRNA TMPRSS2-ERG and SOLA-N₃ respectively; (ii) in the presence of DMSO/acetone/H₂O; (iii) at room temperature; (iv) incubating for 18 h under stirring.

B

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

(Scheme 1 (3c) and Figure SI 1). The best parameters of the click chemistry reaction were investigated to conjugate the SQ and then applied to SOLA.

We observed that by modifying the parameters solvents, molar ratio, temperature, and time of incubation, it was possible to substantially increase the yield of the bioconjugates siRNA TMPRSS2-ERG-SQ (Scheme 1 (4)) and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA (Scheme 1 (5)) and to avoid the formation of byproducts. The different conditions tested for the Cu-free click chemistry reaction are listed in Figure SI 2.

H₂O/DMSO/Acetone Combination Improves the Bioconjugation of the siRNA TMPRSS2-ERG to SQ. To provide the best interaction between siRNA (highly hydrophilic) and SQ (highly hydrophobic), several solvents (H₂O, DMF, DMSO, methanol, acetone) were tested (Figure 1A and B).

When the DBCO-modified siRNA TMPRSS2-ERG (Figure 1A) was dissolved in water and then added to DMSO containing the azido-squalene, 87% of the starting product (Figure 1B, red chromatogram, siRNA elution time ~10–12

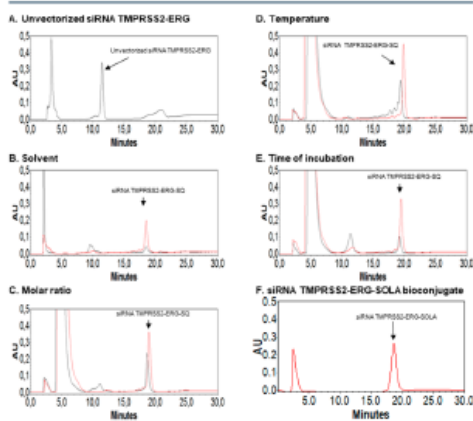


Figure 1. HPLC chromatograms of the bioconjugates after optimization of the Cu-free click chemistry. (A) Chromatograms of the unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG showing that the elution time is around 12 min. (B) The siRNA TMPRSS2-ERG was dissolved in water; the squalene was added in the presence of DMF/MeOH (black chromatogram) or in DMSO/acetone (red chromatogram). For both solvents, the elution time of the bioconjugate is around 18 min but the yield is higher with the DMSO/acetone mixture (solvent used for further synthesis). (C) The siRNA TMPRSS2-ERG was added to squalene in a molar ratio of 1:5 (black chromatogram) or 1:50 (red chromatogram), respectively. For both molar ratios, the elution time of the bioconjugate is around 18 min, but the yield is higher when the molar ratio of 1:50 is applied. (D) The siRNA TMPRSS2-ERG was incubated with the squalene at 37 °C (black chromatogram) or at room temperature overnight (red chromatogram). The formation of byproducts was observed at 37 °C whereas they are quasi absent at room temperature. (E) The siRNA TMPRSS2-ERG was incubated with squalene for 4 h (black chromatogram) or overnight (red chromatogram). The elution time of the bioconjugate is around 18 min and the yield increased when the reaction held overnight. (F) The same parameters of the reaction were applied to bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG to SOLA and the elution time of the resulting bioconjugate was found to be around 18 min.

min) was converted into a more lipophilic compound (elution time ~18–20 min). The latter compound was then identified as the bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ by MALDI TOF MS analysis (7655 Da, Figure SI 3).

When the same modified siRNA was dissolved in H₂O and then added to a DMF/methanol solution of the azido-squalene, only 28% of the starting product (Figure 1B, black chromatogram, siRNA elution time ~10–12 min) was converted into the same lipophilic bioconjugate (elution time ~18–20 min) previously identified (please refer to Table 1, section A).

Moreover, the addition of acetone to the mixture H₂O/DMSO produced a bioconjugate free of byproducts when compared to the mixture H₂O/DMSO/ethanol (data not shown). Thus, all the conjugations were next routinely performed in the H₂O/DMSO/acetone solvent mixture.

Molar Ratio of 1:50 siRNA TMPRSS2-ERG:SQ Improves the Bioconjugation Yield. To improve the yield of the bioconjugation, several molar ratios ranging from 1:1 to 1:350 between the siRNA TMPRSS2-ERG and the squalene azide were assessed (Figure SI 4).

As shown in Figure 1C, the yield of the bioconjugation started to be affected when the molar ratio of the reagents drops from 1:50 to 1:5. Indeed, the 1:50 ratio (siRNA TMPRSS2-ERG:SQ, respectively) converted more than 95% of the starting siRNA TMPRSS2-ERG into the desired siRNA TMPRSS2-ERG-SQ bioconjugate (red chromatogram of Figure 1C). Below this threshold, a progressive decrease of the reaction yield was observed beginning from the 1:5 molar ratio and below (Figure 1C, black chromatogram, Table 1, section B and Figure SI 4).

Room Temperature Avoids the Degradation of the Bioconjugate. In order to prevent the formation of byproducts during the synthesis of the bioconjugate, the influence of the temperature was investigated. Two temperatures were tested, 37 °C and room temperature; those lower than 20 °C were not assessed as DMSO freezes below 18.5 °C.

We found that 37 °C strikingly increased the formation of byproducts, compared to the same synthesis performed at room temperature which reduced the yield of the desired bioconjugate (compare Figure 1D, black to red chromatograms, respectively, and Table 1, section C). Moreover, this was confirmed by MALDI-TOF-MS analysis showing that by-products were found in the reaction carried out at 37 °C (data not shown).

Twelve Hour Incubation Is Necessary for a Total Conversion of the Reaction. Finally, the reaction time of the bioconjugation was investigated. Figure 1E represents the conversion rate of the siRNA into the siRNA-SQ bioconjugate after 4 h (black chromatogram) and 12 h incubation (red chromatogram). Only ~60% of the initial siRNA TMPRSS2-ERG was conjugated to SQ after 4 h incubation, while a complete conversion into the desired bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ (>97%) was obtained after an overnight incubation (Table 1, section D).

Thus, for further studies the optimized conditions were as follows: incubation of the siRNA TMPRSS2-ERG with squalene at 1:50 molar ratio into a mixture of H₂O/DMSO/acetone, under stirring overnight at room temperature. This allowed the conversion of more than 95% of the siRNA TMPRSS2-ERG into the bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ.

Conjugation of siRNA TMPRSS2-ERG Can Be Extended to Solanesol by Cu-Free Click Chemistry. With the intent

C

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 1. Comparison of Areas under the Curve (AUC) of Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG vs Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Applying Different Cu-Free Click Chemistry Conditions^a

chromatogram	solvent of reaction	peaks	retention time	AUC	% area
A. Black chromatogram	H ₂ O/DMF/MeOH	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	9.5	2540093	72.0
A. Black chromatogram	H ₂ O/DMF/MeOH	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	18.5	987935	28.0
A. Red chromatogram	H ₂ O/DMSO/Acetone	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	10.0	631597	10.1
A. Red chromatogram	H ₂ O/DMSO/Acetone	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	18.5	5438762	87.4
	molar ratio of the reaction siRNA:SQ				
B. Black chromatogram	1:5	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	11.1	2197501	27.0
B. Black chromatogram	1:5	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	18.7	5952826	73.0
B. Red chromatogram	1:50	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	12.6	347874	3.2
B. Red chromatogram:	1:50	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	19.00	10249683	95.5
	temperature of the reaction				
C. Black chromatogram	37 °C	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	11.0	228551	4.8
C. Black chromatogram	37 °C	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	19.4	3516956	73.6
C. Red chromatogram	Room temperature	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	10.4	193924	1.7
C. Red chromatogram	Room temperature	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	19.8	10942393	96.0
	incubation time of the reaction				
D. Black chromatogram	4 h	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	19.2	2386118	33.5
D. Black chromatogram	4 h	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	11.3	4742813	66.5
D. Red chromatogram	12 h	Unconjugated siRNA TMPRSS2-ERG	12.6	165802	1.6
D. Red chromatogram	12 h	Bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	19.0	10108474	97.3

^aThe AUC of the chromatograms represented in Figure 1 has been calculated and the % of these areas is directly correlated to the yield of the reaction. Black chromatograms represent the not-yet-optimized reaction and red chromatograms represent the conditions where the desired bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ show a yield of $\sim \geq 90\%$.

to broaden the conjugation of siRNA to other polyisoprenoids, the SOLA, a more lipophilic compound, was chemically linked to the siRNA TMPRSS2-ERG by the Cu-free click chemistry approach. The bioconjugation of the siRNA TMPRSS2-ERG to SOLA was performed with the parameters previously described. The only difference is that the incubation time was extended to 18 h (vs 12 h for SQ) to obtain the complete conversion of siRNA TMPRSS2-ERG into the siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA bioconjugate (Figure 1F). MALDI-TOF MS analysis confirmed the molecular weight of the expected bioconjugate (7830 Da, Figure SI 5).

Polyisoprenoid Conjugated siRNA TMPRSS2-ERG Self-Assemble into Stable Nanoobjects over Time with Different Shapes. The bioconjugates, whether annealed with the antisense strand of the siRNA TMPRSS2-ERG before or after the click chemistry step, were nanoprecipitated and the size of each nanoformulation was investigated by dynamic light scattering (DLS). Table 2 shows the data concerning the size, the polydispersity Index (PDI), as well as the zeta potential.

Interestingly, the bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA was able to form nanoobjects similarly to siRNA TMPRSS2-ERG-SQ, whether the annealing with the antisense strand occurred before (Hb) or after (Ha) the bioconjugation. Herein, we observed that the size of the nanoparticles was stable over 3 weeks for all the studied nanoformulations. The PDI between 0.2 and 0.32 reflected the heterogeneity of the formulations which was observed also by others for macromolecules such as oligonucleotides.^{23,24}

Cryo-TEM analysis was performed on the same day of the nanoprecipitation and showed that the shape differs from one formulation to another (Figure 2). For squalene, when the annealing of both siRNA strands was performed before the conjugation (Hb), the cryo-TEM images showed spherical nanoobjects of about 100 nm surrounded by poorly defined objects, which may suggest that the siRNA could be exposed

outside of the nanoparticle (Figure 2A, dashed arrows). However, round and compact nanostructures were observed when the annealing was done after the bioconjugation (Ha) (Figure 2B). The formulation of the NPs siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA for which the hybridization occurs before the conjugation (Hb) presented a well-defined object (Figure 2C). In contrast, when the formulation of the NPs siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA was hybridized after the bioconjugation (Ha) a poorly defined nanoobject was observed evoking, for this formulation, the presence of micelles or aggregates (Figure 2D, dashed arrows).

Vectorized siRNA Is as Efficient as the Unvectorized siRNA in VCaP Cell Line for TMPRSS2-ERG Inhibition. The annealing of both strands of the siRNA TMPRSS2-ERG was performed before (Hb) or after (Ha) the bioconjugation of the sense strand to SQ or SOLA; then, the bioconjugate was nanoprecipitated. Consequently, 4 nanoformulations (siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs) were tested for their ability to inhibit the TMPRSS2-ERG fusion oncogene transcriptional products in VCaP prostate cancer cell line over time (48, 72, and 96 h). Previously, we showed that the squalene based siRNA nanoparticles were not able to enter spontaneously into the cells without any cationic compound;^{11,14,25} thus, SQ/SOLA based siRNA TMPRSS2-ERG nanoparticles as well as the unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG were transfected into VCaP cells by using lipofectamine iMAX. After 48 and 96 h, all nanoformulations were able to inhibit TMPRSS2-ERG products at both the mRNA and protein levels, similarly to the free siRNA TMPRSS2-ERG (Figure 3A,C for mRNA levels and Figure 3D,F for protein levels). Of note, at 72 h, when annealing of both strands occurred before the conjugation either to SQ or to SOLA, the inhibitory efficacy at mRNA level was slightly decreased, but this was not reflected at the protein

D

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 2. Physicochemical Characterization of siRNA TMPRSS2-ERG-SQ/SOLA NPs by DLS Analysis^a

nanoparticle formulations	day	size (nm) ± SD	PDI ± SD	zeta potential (mV) ± SD
A. siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs	0	337 nm ± 71	0.27 ± 0.00	-51 mV ± 6
	7	358 nm ± 12	0.26 ± 0.04	
	14	342 nm ± 41	0.25 ± 0.01	
	21	331 nm ± 2	0.25 ± 0.01	
B. siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs	0	244 nm ± 34	0.23 ± 0.02	-48 mV ± 1
	7	236 nm ± 32	0.24 ± 0.02	
	14	247 nm ± 31	0.22 ± 0.02	
	21	295 nm ± 84	0.24 ± 0.00	
C. siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs	0	318 nm ± 20	0.22 ± 0.04	-61 mV ± 3
	7	296 nm ± 2	0.23 ± 0.00	
	14	267 nm ± 21	0.20 ± 0.02	
	21	333 nm ± 47	0.25 ± 0.03	
D. siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs	0	377 nm ± 64	0.29 ± 0.01	-51 mV ± 2
	7	379 nm ± 21	0.32 ± 0.04	
	14	399 nm ± 49	0.33 ± 0.01	
	21	405 nm ± 43	0.30 ± 0.01	

^aSize, polydispersity index, and zeta potential of the four different nanoparticles formulations monitored over time (3 weeks). Samples were analyzed at 10 μM in H₂O. Three measurements of 5 min for each sample were performed and the average diameter ± S.D. of three independent samples was calculated.

levels (Figure 3B for mRNA levels and Figure 3E for protein levels). Noteworthy, the inhibitory activity of the siRNA NPs annealed with the antisense strand before or after the bioconjugation was comparable among all the different formulations regardless the incubation time of the transfection (Figure 3).

Moreover, siRNA Control nanoformulated or unvectorized did not affect TMPRSS2-ERG mRNA and protein expression when cells were transfected for 72 h (Figure SI 6 A and Figure SI 6 B for mRNA levels and Figure SI 6 C and Figure SI 6 D for protein levels).

Influence of the siRNA Annealing and the Length of the Isoprenoid Chain on the Antineoplastic Activity. As shown in Figure 4, two out of the four nanoformulations injected into mice bearing xenografted VCaP tumors showed significant antineoplastic activity. Especially, siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs significantly inhibited tumor growth of ~60% compared to mice treated with saline solution ($p < 0.001$). In contrast, a nonsignificant difference was observed after treatment with siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs. In addition, when mice were treated with nanoformulated siRNA Control-SQ Hb NPs, siRNA Control-SQ Ha NPs, siRNA Control-SOLA Hb NPs, siRNA Control-

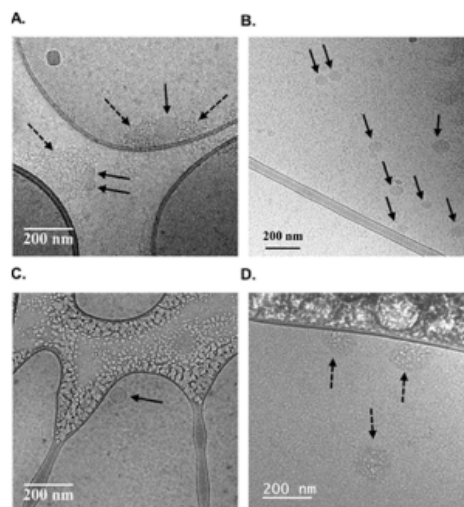


Figure 2. CryoTEM analysis of the siRNA TMPRSS2-ERG-SQ/SOLA NPs. CryoTEM images of (A) siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs; (B) siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs; (C) siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs; (D) siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs. Black arrows indicate the nanoobjects detected, dashed arrows indicate the nonwell-defined objects. The scale bar used is 200 nm. Ha: hybridization after the bioconjugation, Hb: hybridization before the bioconjugation.

SOLA Ha NPs, or unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG, tumor growth was not significantly affected (Figure SI 6 E).

Biodistribution Study Reveals the Preferential Uptake of siRNA-SQ Ha NPs in Tumor. To explain the different antineoplastic effect of the nanoformulations obtained by the same method of hybridization (Ha), a biodistribution study was performed on two formulations, one efficient for tumor inhibition (siRNA-SQ Ha NPs) and the other lacking antitumor activity (siRNA-SOLA Ha NPs). When total radioactivity was counted, all treatment accumulated similarly mainly in the liver, then in kidney, urine, blood and tumors, and to even less extent in feces (Figure SI 7).

Interestingly, after RNA extraction that reflects the ³²P probe linked to the siRNA, the biodistribution changes within the organs and mainly in the tumor. An accumulation of the siRNA within the prostate tumor was observed when the siRNA NP was formulated with the squalene, whereas when formulated with SOLA it accumulated similarly to the unvectorized siRNA (Figure 5A). Moreover, these results were confirmed by electrophoresis gel performed on the extracted RNA where only the signal of the ³²P-siRNA-SQ Ha NPs was detectable at short time (3 h, Figure 5B, lane 3) and also at a longer time (16 h, Figure 5B, lane 7).

A major fraction of ³²P present in the extracted RNA was recovered in blood and in two organs of the excretory system: the liver and kidney. Notably, after 3 h we observed an excretion of siRNA through the feces and urine especially for the unvectorized siRNA (Figure 5A). The excretion of unvectorized siRNA and SOLA based nanoformulation increased after 16 h in the urine, while SQ-based nano-

E

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

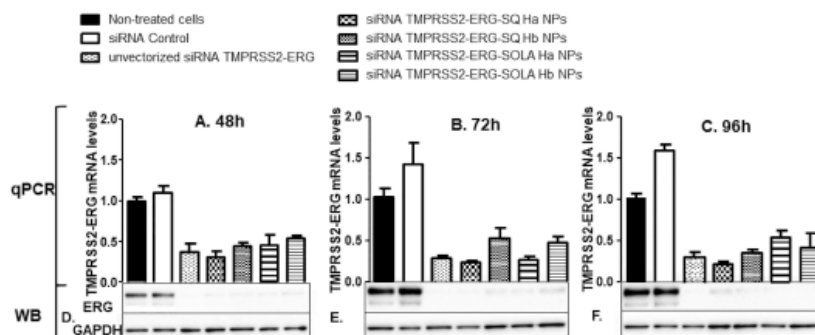


Figure 3. In vitro inhibitory efficacy of siRNA TMPRSS2-ERG-SQ/SOLA NPs. VCaP cells were transfected at 50 nM concentration with siRNA Control; unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG; siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs; siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs; siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs, and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs. After 48 h (A and D), 72 h (B and E), and 96 h (C and F), cells were harvested, then mRNA and proteins were extracted to be analyzed for gene (A, B, C) and protein (D, E, F) knockdown. All nanoformulations inhibited TMPRSS2-ERG products similarly to the unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG at either mRNA or protein levels over time (48, 72, and 96 h). The unvectorized siRNA is the siRNA TMPRSS2-ERG not bearing the vectors SQ or SOLA but transfected in the presence of Lipofectamine iMAX. Ha: hybridization after the bioconjugation, Hb: hybridization before the bioconjugation, qPCR: quantitative PCR, WB: Western blot.

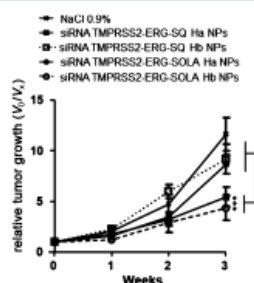


Figure 4. In vivo antineoplastic activity of siRNA TMPRSS2-ERG-SQ/SOLA NPs. Mice ($n = 5/\text{group}$) bearing VCaP cells xenografted tumors were treated intravenously twice per week either with saline solution (NaCl 0.9%); siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs; siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs; siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs dispersed in 100 μL of 0.9% NaCl solution at the cumulative dose of 1 mg/kg/mouse. The nanoformulations of siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs significantly inhibited tumor growth of $\sim 60\%$ compared to mice treated with saline solution ($p < 0.001$), while siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs only slightly inhibited tumor growth without significant difference. Ha: hybridization after the bioconjugation, Hb: hybridization before the bioconjugation; $V_0/V_x = \text{Volume of the tumor at day } X$ (X corresponds to the day of measurement of tumor volume during treatments, NaCl, siCT), and siTMPRSS2-ERG vectorized or not).

formulation was still observed upstream in the kidney suggesting a longer retention time when the SQ was used as a vector (data not shown).

Clickable siRNA-SQ Nanoparticles Approach May Represent a New Platform for siRNA Delivery. By applying the same parameters (molar ratio, solvents, temperature, and incubation time), the Cu-free click chemistry was performed to chemically link siRNA RET/PTC1 to SQ. A complete conversion of the initial siRNA RET/PTC1 (black

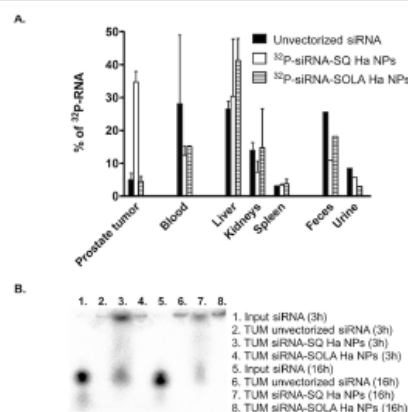


Figure 5. Biodistribution of vectorized or unvectorized ^{32}P labeled siRNA in mice bearing VCaP xenografts. Two mice bearing VCaP xenografted tumors were injected with 5 million cpm of unvectorized ^{32}P labeled siRNA or ^{32}P -siRNA-SQ Ha NPs or ^{32}P -siRNA-SOLA Ha NPs. (A) After 3 h mice were sacrificed, and tumors, organs, feces, and urine were collected. Total RNA was extracted from each organ and radioactivity present in the purified RNA was evaluated by Cherenkov counting. Results are expressed as the percentage of radioactivity in extracted RNA from each sample relatively to the total radioactivity of extracted RNA. Increased accumulation of radioactivity was found in tumors treated with ^{32}P -siRNA-SQ Ha NPs compared to unvectorized ^{32}P labeled siRNA or ^{32}P -siRNA-SOLA Ha NPs. (B) To assess the presence of intact ^{32}P -siRNA in extracted RNA, electrophoresis gel was performed on RNA extracted from tumors treated for 3 and 16 h with unvectorized ^{32}P labeled siRNA or ^{32}P -siRNA-SQ Ha NPs or ^{32}P -siRNA-SOLA Ha NPs. Tumors treated with ^{32}P -siRNA-SQ Ha NPs showed the presence of intact ^{32}P -siRNA mainly at 3 h and to a lesser extent at 16 h. Lanes 1 and 5 represent the input radiolabeled ^{32}P -siRNA. Ha: hybridization after the bioconjugation.

F

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

chromatogram) into the desired bioconjugate siRNA RET/PTC1-SQ (red chromatogram) with a high yield and absence of byproducts was observed (Figure SI 8A) and the nature of the bioconjugate was verified by MALDI-TOF MS (Figure SI 8B). The bioconjugate siRNA RET/PTC1-SQ was then annealed (Ha) and nanoprecipitated as previously described for siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs. As shown in Table 3,

Table 3. Physicochemical Characterization of siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs by DLS Analysis^a

nanoparticle formulation	day	size (nm) ± SD	PDI ± SD	zeta potential (mV) ± SD
siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs	0	232 ± 32	0.18 ± 0.03	-37 ± 7
	7	228 ± 32	0.18 ± 0.03	
	14	232 ± 35	0.16 ± 0.03	
	21	220 ± 31	0.17 ± 0.05	
	30	227 ± 46	0.18 ± 0.05	

^aSize and zeta potential of the nanoparticles were measured over 30 days. Each measure is the mean of 3 independent formulations and 3 independent technical measurements. Both size and zeta potential remain stable over time.

The DLS analysis revealed that the bioconjugate siRNA RET/PTC1-SQ was able to self-assemble into nanoparticles of ~230 nm in size with a PDI of ~0.175. The size and PDI of these nanoparticles are similar to the values obtained with the previous nanoformulations harboring the siRNA TMPRSS2-ERG sequence and in accordance with other studies.^{23,24} Herein, it was observed that the size of the nanoparticles was stable for at least 4 weeks.

Moreover, siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs were tested for their ability to inhibit the RET/PTC1 fusion oncogene transcriptional products in BHP 10-3 and TPC-1 papillary thyroid carcinoma cell lines for 24 and 48 h, respectively. Results have shown that siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs were as efficient as the unvectorized siRNA to inhibit the RET/PTC1 mRNA levels in both cell lines after 24 and 48 h (Table 4). However, the inhibition of the fusion oncogene RET/PTC1 observed was more important in BHP 10-3 cell line than in TPC-1 cells.

DISCUSSION

The aim of this study was to introduce a new targeted therapy for cancer patients with fusion oncogenes. In previous publications, we were able to develop specific siRNA against fusion oncogenes such as TMPRSS2-ERG found in 50% of patients with prostate cancers and RET/PTCs found in over 60% of patients with papillary thyroid carcinomas.^{10,11,14} Despite the efficacy of inhibiting the fusion oncogenes by siRNA-SQ NPs *in vivo*, the yield of the bioconjugation was low and poorly reproducible. In the present study, a new approach

is developed to protect the siRNA from degradation by using conjugation to polyisoprenoids via the Cu-free click chemistry. Indeed, Cu-free catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition has received tremendous interest as an established synthetic route to obtain tailor-made complex materials.¹⁸ Due to the very different physicochemical nature of the starting products (highly hydrophilic siRNA and lipophilic polyisoprenoid derivatives), the four main parameters of the reaction (solvents, molar ratio, temperature, and incubation time) were modified with respect to several articles describing the Cu-free click chemistry.^{26–28} Dimethyl sulfoxide and acetone were found to be the best solvents for performing the synthesis. Their ability to dissolve both polar and apolar compounds and to establish a chemical interface favored the interaction between siRNA and squalene thus leading to the complete conversion of the starting products into the desired bioconjugates. Concerning the molar ratio of the reagents, according to the literature, an equal molar ratio is generally applied. However, this could not be applied to the conjugation of siRNA (a high molecular weight hydrophilic molecule) with low molecular weight lipophilic molecules as squalene and solanesol. Herein, we showed that a molar ratio ≥1:50 of siRNA:SQ is necessary to obtain a complete conversion into the bioconjugate siRNA-SQ. This is directly linked with the kinetics of the reaction where the higher the amount of squalene, the faster the siRNA conversion.

Thus, the Cu-free click chemistry allowed us to substantially (i) increase the synthesis yield from ~35% to >95%, (ii) avoid the formation of byproducts during the synthesis, and (iii) improve the reproducibility of the bioconjugation. Despite the fact that this procedure is easy to handle and could be used as a platform for siRNA delivery, six steps were needed to obtain nanoparticles: (1) bioconjugation of siRNA to SQ/SOLA, (2) purification of the resulting bioconjugate siRNA-SQ/SOLA, (3) lyophilization of the purified bioconjugate, (4) hybridization of the bioconjugate with the antisense strand, (5) lyophilization of the hybridized bioconjugate, followed by (6) nanoprecipitation. Therefore, in order to further simplify and speed up the process by avoiding two steps (annealing and lyophilization of siRNA), it was tested to determine whether the conjugation to squalene could be performed on already hybridized siRNA in the double-stranded form. Moreover, to increase the siRNA lipophilicity, solanesol (SOLA), a longer polyisoprenoid compound, which possesses nine isoprenyl units instead of the six found in squalene, was used with the attempt of enhancing the nanoparticle stability. In this study, we showed that this polyisoprenoid behaves similarly to the squalene, regarding the stability and the reproducibility of the nanoformulation. The four bioconjugates produced were able to form nanoparticles in water. This result was expected for the squalene bioconjugates but has never been previously reported for the SOLA.

Table 4. Efficacy of siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs on RET/PTC1 Fusion Oncogene Inhibition^a

treatments	RET/PTC1 mRNA relative levels in BHP 10-3 cell line		RET/PTC1 mRNA relative levels in TPC-1 cell line	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Nontreated cells	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
free siRNA RET/PTC1	0.37 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.63 ± 0.09	0.70 ± 0.02
siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs	0.39 ± 0.03	0.28 ± 0.06	0.64 ± 0.12	0.76 ± 0.06

^aBHP 10-3 and TPC-1 cells were transfected at 50 nM concentration with unvectorized siRNA RET/PTC1 or siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs. After 24 and 48 h, cells were harvested; then, mRNA was extracted and analyzed by RT-qPCR. The nanoformulation inhibits RET/PTC1 mRNA expression similarly to the unvectorized siRNA RET/PTC1 in BHP 10-3 and TPC-1 cells. Ha: hybridization after the bioconjugation.

As previously described, *in vitro*, the squalene based siRNA nanoparticles were not able to enter spontaneously into the cells and need a cationic compound to enter into the cells.^{11,14} Indeed, when VCaP cells were transfected with these nanoparticles in the presence of Lipofectamine iMAX, an inhibition of TMPRSS2-ERG mRNA expression and of ERG protein content was observed. This verified that the Cu-free click chemistry reaction applied to the conjugation of siRNA TMPRSS2-ERG to squalene, and solanesol polyisoprenoids did not compromise the efficacy of the siRNA TMPRSS2-ERG regardless of when the hybridization step occurs, i.e., before or after the reaction.

On the contrary, different results were pointed out *in vivo* depending on the formulation administered to mice bearing VCaP prostate cancer xenografts. As discussed in our previous papers, the discrepancy between *in vitro* and *in vivo* nanoparticle uptake is probably related to the physicochemical properties of the nanoparticles that may change *in vivo* and the different enzymatic content present in the animal environment compared to simple culture medium.^{11,14,25} We observed a preserved efficacy of the siRNA to inhibit the tumor growth when siRNA TMPRSS2-ERG-SQ NPs (strands hybridized after bioconjugation, Ha) and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA NPs (strands hybridized before bioconjugation, Hb) were injected to mice intravenously. Cancer proliferation is due to deregulation of several signaling pathways that can act together to increase tumor growth, therefore the inhibition of ~50–60% of tumor growth by downregulating one oncogene (ERG) with a specific siRNA is noteworthy. Notably, in clinics, siRNA is often associated with other molecules to synergize with them and to allow decreasing the doses or the schedule of administration, thus diminishing the side effects. Interestingly, it seems that the *in vivo* efficacy of the nanoparticles was related to the nature of the terpene (SQ and SOLA) and to the hybridization step, both influencing the size and the nanostructural organization of the particles in aqueous solution. In fact, nanoparticles with a compact round shape and a size less than 300 nm resulted to be efficient *in vivo* suggesting that the conformation and the size may play a role in the activity as also observed recently by Jasinski et al.²⁹ In addition, bio-distribution studies explain the different antineoplastic activity observed between the formulations. It is noteworthy that the counting of total radioactivity within the organs contemplates the accumulation of ³²P probe whether free or linked to the siRNA. In contrast, when the radioactivity is counted after RNA extraction, only the intact ³²P-siRNA is selected and showed the preferential uptake of siRNA-SQ Ha NPs in tumor compared to siRNA-SOLA Ha NPs and unvectorized siRNA, which reflects the antineoplastic activity found for this treatment. The accumulation of the formulation within the tumors may be explained by the fact that squalene-derived nanoparticles could interact preferentially with cholesterol-rich lipoproteins such as low-density lipoproteins (LDLs). LDLs are the main source of cholesterol for the peripheral tissues; thus, uptake of LDLs is often used by rapidly proliferating cancer cells to satisfy their cholesterol needs.³⁰ Interestingly, it has been shown that squalene bioconjugates strongly interacted with LDL conferring a so-called "indirect" targeting toward tumors.¹⁷ Thus, for the formulation siRNA-SQ Hb NPs the lack of antineoplastic activity would be due to the hybridization step that modulates the nanoparticle size and conformation, preventing the interaction with LDL and consequently determining the siRNA therapeutic outcome.

In conclusion, we developed a new chemical synthesis for the linkage of siRNA to two polyisoprenoids resulting in bioconjugates able to self-assemble as nanoparticles. Moreover, we show, for the first time, the opportunity to broaden the bioconjugation of siRNA to other polyterpenes such as SOLA. This approach was also extended to other siRNAs showing that this vectorization method can be applied to different sequences maintaining the same efficacy of the unmodified siRNA *in vitro*. The ease and flexibility of the proposed methodology, as well as the improved yield of the synthesis, are believed to facilitate further translation toward "clickable" siRNA-polyisoprenoid-conjugated nanoparticles targeting genes whose overexpression results in the development of cancers or other genetic diseases.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. All the chemicals used were of highest analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise noted. The anhydrous solvents were dried and distilled before their use (tetrahydrofuran (THF) on Na/benzophenone) and the reactions sensitive to air or humidity were performed under nitrogen pressure. TLC was done over Merck 60 F254 plates, thickness 0.25 mm. K₂S₂O₈ (p-anisaldehyde 50 mL, CH₃COOH 10 mL, H₂SO₄ 50 mL, EtOH 900 mL) was used for spot visualization. SiO₂ (0.063 mm) was dried for flash chromatography.

¹H and ¹³C NMR spectra were registered on a Bruker ARX 300 spectrometer. 3-Hydroxypicolinic acid (3-HPA, used as the matrix for MALDI-TOF MS, was of the highest grade available and used without further purification) was purchased from Sigma-Aldrich Co. Modified siRNAs to perform the Cu-free click chemistry reactions were purchased from Eurogentec (France). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Opti-MEM, fetal calf serum (FCS), Lipofectamine iMAX, and PCR primers were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). BD Matrigel (Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced - Reference 356234) was purchased from Corning (Amsterdam, The Netherlands). Bio-RAD protein assay was purchased from Bio-RAD Laboratories (Marnes-la-Coquette, France). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France).

siRNAs Used and Chemical Modifications. The siRNA targeting TMPRSS2-ERG, RET/PTC1, and the irrelevant siRNA scrambled sequence used as a control in the experiments were previously described.^{10,14}

All single-stranded RNAs were synthesized, then characterized by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and purified by RP-HPLC. Single-stranded RNAs were synthesized as 19-mers with two 3'-overhanging 2'-deoxynucleotide residues to provide stabilization against nucleases as described by Tuschl et al.³¹ To allow functionalization, a dibenzocyclooctyne (DBCO) reactive group was introduced at the 5'-end of the sense strand of each siRNA sequence through a *N*-(hexamethylene)-6-oxohexanamide spacer (C₆) (Scheme 1 (1)), purchased from Eurogentec, France). To generate siRNA from RNA single strands, equimolar amounts of both forward and reverse strands were annealed in annealing buffer [30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2 mM Mg acetate, 100 mM K acetate] for 2 min at 95 °C and then kept 1 h at room temperature before storing at 20 °C.

Synthesis of Azido-Squalene and Azido-Solanesol. Azido squalene (SQ-N₃) (Scheme 1 (2c) and Figure SI 1A) was obtained by sequential mesylation and S_N2 displacement with sodium azide of the known alcohol (Scheme 1 (2c))

H

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

available in turn from squalene (SQ)³² (Figure SI 1A). Similarly, azido-solaneyl (SOLA-N₃, Scheme 1 (3c) and Figure SI 1A) was obtained from commercially available solanesol (SOLA) by bromination with PBr₃ in Et₂O followed by nucleophilic displacement of the bromine by sodium azide. The SOLA-N₃ (Scheme 1 (3c)) was obtained in 43% yield together with a minor amount of S_N2' product (15%) (Figure SI 1A).

¹H and ¹³C NMR spectra of azido-squalene 2c are reported in Figure SI 1B,C, respectively. ¹H and ¹³C NMR spectra of solanesyl azide 3c are reported as Figure SI 1D,E, respectively.

Bioconjugation of siRNAs to Azido-Squalene and Azido-Solaneyl. Before any synthesis was undertaken, precautions were applied to avoid degradation of siRNA by contamination of ribonucleases. The bioconjugates siRNA TMPRSS2-ERG-squalene (siRNA TMPRSS2-ERG-SQ) (Scheme 1 (4)) and siRNA TMPRSS2-ERG-solaneyl (siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA) (Scheme 1 (5)) were obtained by the 1,3-dipolar cycloaddition of azides and dibenzocyclooctynes, also known as Cu-free click chemistry.

Investigation of the nature of the solvents, the temperature, the incubation time, and the molar ratios between the SQ-N₃ or the SOLA-N₃ and the modified sense strand (DBCO) of the siRNA TMPRSS2-ERG was assessed to obtain the best parameters of the synthesis giving an high yield of the desired bioconjugate.

The protocol to obtain the bioconjugates siRNA TMPRSS2-ERG-SQ and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA is described as follows. 1 nmol of the 5'-end modified sense strand DBCO-C₆ of the siRNA TMPRSS2-ERG (1 mg/mL in DNase/RNase-free water) was mixed with 50 nmol of SQ-N₃ or SOLA-N₃ (1 mg/mL in DMSO) in a glass vial. DMSO (286 μ L) and acetone (65 μ L) were added to the solution and incubated at room temperature for 12 h under stirring to obtain the bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SQ or 18 h to obtain the bioconjugate siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA.

The progress of the reactions as well as the purification from the excess of unconjugated SQ and SOLA were performed by RP-HPLC on a polymeric column as described below. The coupling yield was determined based on the UV absorbance of the species. The identity of the bioconjugates siRNA TMPRSS2-ERG-SQ and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. Three independent reactions were carried out to verify the reproducibility of the synthesis. Purified products were lyophilized, then solubilized into RNase free water at the desired molar concentration.

To obtain the bioconjugate siRNA RET/PTC1-SQ, the protocol of Cu-free click chemistry and the processes described above were applied.

Hybridization of Both Strands of the siRNAs. The hybridization of both strands of the siRNA TMPRSS2-ERG was performed before (Hb) or after (Ha) the bioconjugation of the sense strand to SQ or SOLA according to the manufacturer's protocol. When the annealing of the driver strand was performed after the bioconjugation, the purified and lyophilized bioconjugates siRNA TMPRSS2-ERG-SQ and siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA were used. For the siRNA RET/PTC1, the annealing was performed only after (Ha) the bioconjugation to squalene.

Purification of siRNA-SQ/SOLA Bioconjugates via HPLC Equipment. The HPLC separation was performed on a Waters high-performance liquid chromatography system

(Waters 2695) equipped with a photodiode array detector (Waters 2996) whose wavelength range was between 190 and 800 nm, a pump (model Waters 600 controller), and an automatic injector (Waters 717 autosampler). The stationary phase consisted of a nonporous, alkylated polystyrene divinylbenzene column (Hamilton 10 μ m, 4.6–250 mm, PEEK) protected by precolumn (Hamilton). Empower was used for data acquisition. Flow rate was 1.2 mL/min. Injection volumes were 100 μ L. A gradient of mobile phases A and B was applied. Mobile phase A was composed of 0.2 M TEAA (5%), pH 7.0, with 5% acetonitrile (v/v), water 90%, and mobile phase B consisted of 95% acetonitrile with 5% TEAA (v/v), 5% of water. The gradient conditions applied for purification were as follows: 0–8 min linear gradient from 0% to 24% of B; 8–16 min linear gradient from 24% to 90% of B; 16–18 min linear gradient from 90% to 100% of B; 18–30 min 100% of B; 30–32 min linear gradient from 100% of B to 100% of A, and 32–42 min re-equilibration with 100% of A. The chromatograms were recorded at a wavelength of 258 nm. Quantification of peaks was performed by integration of peak areas. Bioconjugates siRNA-SQ/SOLA were purified by manual peak collection. Fractions were collected for 3 min, corresponding to a fraction volume of 3.6 mL, and then lyophilized. All lyophilized siRNA fractions were reconstituted in DEPC-treated water.

MALDI-TOF Mass Spectrometry. A MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen) was used for all experiments. Mass spectra were obtained in linear positive ion mode. The laser intensity was set just above the ion generation threshold to obtain peaks with the highest possible signal-to-noise (S/N) ratio without significant peak broadening. All data were processed using the FlexAnalysis software package (Bruker Daltonics).

Preparation and Characterization of Nanoparticles siRNA-SQ and siRNA-SOLA. Nanoparticles siRNA-SQ or siRNA-SOLA were prepared by nanoprecipitation in acetone/water. One phase (aqueous or organic) was slowly added to the other, under magnetic stirring, then acetone was completely evaporated using nitrogen flux to obtain an aqueous suspension of pure siRNA-SQ or siRNA-SOLA nanoassemblies at 10 μ M concentration. Control siRNA-SQ/SOLA NPs were prepared using the same protocol as described above.

Then, the hydrodynamic diameter (nm) was measured by dynamic light scattering (DLS) using the Nano Brook 90 Plus PALS with a DLS angle of 90° (Brookhaven Instrument) and the zeta potential (mV) was measured using a Zetasizer 4 (Malvern Instrument). Samples were analyzed at 10 μ M concentration in H₂O. Three measures of 5 min for each sample were performed and the average diameter \pm SD of three independent samples was calculated. The cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) was performed with the JEOL 2100 electron microscope at the Electronic Microscopy Platform (IBPS/Institut de Biologie Paris-Seine, Université P. et M. Curie, Paris, FRANCE). A 4 μ L droplet of the samples (concentration of 2.2 mg/mL) hybridized before (Hb) or after the synthesis (Ha) [siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs, siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs] was deposited on a carbon-coated copper grid. Excess of the liquid was removed with blotting filter paper, and the samples were quickly vitrified by plunging them into liquid ethane using a guillotine-like frame. The samples were then transferred to a cryo-sample holder. Observations were

made at an acceleration voltage of 200 kV under a low electron dose. Analysis was performed with ImageJ software.

Cell Lines and Cell Culture. The VCaP is a prostate cancer cell line expressing TMPRSS2-ERG fusion oncogene. BHP 10-3 and TPC-1 are both papillary thyroid carcinoma cell lines harboring the fusion oncogene RET/PTC1. All cell lines were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with FCS, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

In Vitro Cell Transfection. Our previous studies showed that NPs siRNA-SQ cannot spontaneously enter *in vitro*; therefore, Lipofectamine iMAX was used to assess the efficacy of siRNA bioconjugates compared to unvectorized siRNA and to decrypt if the conjugation was affecting the kinetic of the gene down regulation.

Briefly, 8×10^5 VCaP cells were seeded in six-well plates containing DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (10 µg/mL) and transient transfections were carried out using Lipofectamine RNAiMAX transfecting agent according to manufacturer's instructions. The following compounds were transfected at 50 nM concentration: (1) siRNA control; (2) unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG; (3) siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Hb NPs; (4) siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Hb NPs; (5) siRNA TMPRSS2-ERG-SQ Ha NPs; and (6) siRNA TMPRSS2-ERG-SOLA Ha NPs. After 48, 72, and 96 h, cells were harvested, and then mRNA and proteins were extracted to be analyzed for gene and protein knockdown. Each experiment was performed at least twice and in duplicate. Nanoparticles siRNA Control-SQ/SOLA Ha/b were also assessed as negative controls up to 72 h.

The papillary thyroid carcinoma cell lines BHP 10-3 and TPC-1 were also transfected with (1) siRNA RET/PTC-1 and (2) siRNA RET/PTC1-SQ Ha NPs at 50 nM concentration.

Briefly, 4×10^5 BHP 10-3 and TPC-1 cells were seeded in six-well plates containing OPTIMEM and transient transfections were carried out using Lipofectamine-2000 transfecting agent according to manufacturer's instructions. Four hours later, the medium was replaced by DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (10 µg/mL). Twenty-four hours and 48 h later, cells were harvested and mRNA was extracted to be analyzed for gene expression. Each experiment was performed at least twice and in duplicate.

mRNA Extraction and Real Time PCR (RT-qPCR) Experiments. Total RNA was extracted from VCaP, BHP 10-3, and TPC-1 cells using RNeasy mini-kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). First-strand cDNA was generated with M-MLV RT buffer pack (Invitrogen, Charbonnières-les-Bains, France). Real-time PCR (qPCR) was carried out with StepOnePlus PCR System (AB Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France) using Maxima Syber Green Rox qPCR master Mix (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) according to manufacturer's instructions. Samples were run in triplicate; gene regulation was determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and normalized to GAPDH levels. For knockdown experiments, results are given as relative mRNA levels compared to nontreated cells.

Immunoblotting. Total protein extracts were obtained using M-PER reagent (Thermo Fisher Scientific Courtaboeuf, France) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, Neuilly sur Seine, France). Proteins were titrated by Bio-RAD Assay according to manufacturer's instructions. Samples were then loaded on 10% polyacrylamide gel

(NuPAGE Bis Tris Mini Gels 10%, Life technologies, Saint-Aubin, France) and proteins were transferred using the iBlotDry Blotting System (Invitrogen, France). Membranes were incubated overnight at 4 °C with either of the following primary antibodies: monoclonal rabbit ERG (EPR 3864 (2); 1:500. Abcam Biochemicals, Paris, France). Monoclonal mouse GAPDH-HRP (1:1000. Cell Signaling technology, Saint Quentin en Yvelines, France. ref: 3683) was used as internal control. Blots were then washed and incubated with corresponding secondary anti-rabbit antibody conjugated to HRP (horseradish peroxidase, 1:3000. Cell Signaling Technology). Bands were visualized by enhanced chemiluminescence reagent (Invitrogen, France).

Animal Studies. All animal experiments and the use of VCaP cells were approved by the institutional Ethics Committee of Animal Experimentation (CEEA) and research council (Integrated Research Cancer Institute in Villejuif, IRCIV), registered in the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; MESR) under the authorization number CEEA IRCIV/IGR no 26:94-226, no: 2011-09 and carried out according to French laws and regulations under the conditions established by the European Community (Directive 2010/63/UE). Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki. All efforts were made to minimize animal suffering; administration of treatments was performed under isoflurane anesthesia and animals were sacrificed by CO₂. Five-week-old SCID/Beige mice were purchased from Harlan Laboratory. All animals were housed in sterilized laminar flow caging system. Food, water, and bedding were sterilized before being placed in the cages. Food and water were given *ad libitum*.

In Vivo Efficiency and Biodistribution of siRNA TMPRSS2-ERG Polyterpene Nanoparticles. VCaP cells were subcutaneously inoculated [10×10^6 cells/mouse in PBS (50 µL) mixed with Matrigel (50 µL)]. When tumors reached about 50 mm³, mice ($n = 5$ /group) were treated intravenously (i.v.) twice per week with either (1) saline solution (NaCl 0.9%); (2) siRNA TMPRSS2-ERG (or Control)-SQ Hb NPs; (3) siRNA TMPRSS2-ERG (or Control)-SOLA Hb NPs; (4) siRNA TMPRSS2-ERG (or Control)-SQ Ha NPs; (5) siRNA TMPRSS2-ERG (or Control)-SOLA Ha NPs; and (6) unvectorized siRNA TMPRSS2-ERG dispersed in 100 µL of 0.9% NaCl solution at the rate of 0.5 mg/kg for the first injection and 0.1 mg/kg for the rest of the injections (cumulative dose = 1.1 mg/kg/mouse). The administrated dose and schedule of treatments were selected based on previously published studies.^{10,11,13-15}

Mice were monitored daily for tumor growth and body weight and then sacrificed at the end of the experiment (day 22) or when tumors reached a volume of 1000 mm³.

For biodistribution studies, the groups of mice treated with unvectorized siRNA, siRNA-SQ Ha NPs, and siRNA-SOLA Ha NPs received unvectorized ³²P-labeled siRNA or ³²P-siRNA-SQ Ha NPs or ³²P-siRNA-SOLA Ha NPs, respectively (5 million cpm), as the last injection. After 3 h, mice were sacrificed and excretory organs, urine, feces, and tumor were collected, and total radioactivity was counted by Cherenkov counting. Then, total RNA was extracted from each organ, urine, feces, and tumor, and radioactivity present in the purified RNA was evaluated by Cherenkov counting (mean ± SD). To assess the presence of intact ³²P-siRNA in extracted RNA, electrophoresis gel was performed on RNA extracted from tumors treated for 3

and 16 h with unvectorized ^{32}P labeled siRNA or ^{32}P -siRNA-SQ Ha NPs or ^{32}P -siRNA-SOLA Ha NPs.

Statistical Analysis. All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). To compare the effects of the different treatments on tumor growth inhibition in mice, two-way ANOVA analysis followed by Bonferroni post-tests for multiple comparisons was applied using "Prism" software. $p < 0.05$ was considered as a statistically significant level.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00205.

Chemical synthesis and characterization of azido-squalene and azido-solanesol; Molar ratios, incubation time, temperature and solvent conditions of each reaction; MALDI-TOF MS spectrum; HPLC chromatograms; Biodistribution of total ^{32}P radioactivity (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: liliane.masade@gustaveroussy.fr. Phone: +33 1 42 11 51 28. Fax: + 33 1 42 11 52 45.

ORCID

Liliane Massaad-Massade: 0000-0002-9636-4559

Barbara Stella: 0000-0001-8266-6604

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (Labex NanoSaday, reference: ANR-10-LABX-0035), Ligue Contre le Cancer, Comité des Yvelines and de Val de Marne and PICS CNRS. We thank Ghislaine Frebourg for cryo-TEM observations and Vincent Guerin for MALDI-TOF Mass Spectrometry analysis.

■ ABBREVIATIONS

AUC, area under the curve; DBCO, dibenzocyclooctyne; Ha, hybridization after bioconjugation; Hb, hybridization before bioconjugation; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry; siRNA, small interfering RNAs; NPs, nanoparticles; SOLA, solanesol; SQ, squalene

■ REFERENCES

- (1) Chi, X., Gatti, P., and Papoian, T. (2017) Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discovery Today* 22, 823–833.
- (2) Stein, C. A., and Castanotto, D. (2017) FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther.* 25, 1069–1075.
- (3) Whitehead, K. A., Langer, R., and Anderson, D. G. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* 8, 129–38.
- (4) Bobbin, M. L., and Rossi, J. J. (2016) RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 103–22.
- (5) Bumett, J. C., Rossi, J. J., and Tiemann, K. (2011) Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* 6, 1130–46.
- (6) Akhtar, S., and Benter, I. (2007) Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv. Drug Delivery Rev.* 59, 164–182.
- (7) Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J., and Anderson, D. G. (2012) Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol. Ther.* 20, 513–24.
- (8) Raouane, M., Desmaele, D., Urbinati, G., Massaad-Massade, L., and Couvreur, P. (2012) Lipid conjugated oligonucleotides: a useful strategy for delivery. *Bioconjugate Chem.* 23, 1091–104.
- (9) Desmaele, D., Gref, R., and Couvreur, P. (2012) Squalenoylation: a generic platform for nanoparticulate drug delivery. *J. Controlled Release* 161, 609–18.
- (10) Ali, H. M., Maksimenko, A., Urbinati, G., Chapuis, H., Raouane, M., Desmaele, D., Yasuhiro, H., Harashima, H., Couvreur, P., and Massaad-Massade, L. (2014) Effects of silencing the RET/PTC1 oncogene in papillary thyroid carcinoma by siRNA-squalene nanoparticles with and without fusogenic companion GALA-cholesterol. *Thyroid* 24, 327–38.
- (11) Ali, H. M., Urbinati, G., Chapuis, H., Desmaele, D., Bertrand, J. R., Couvreur, P., and Massaad-Massade, L. (2014) Effects of siRNA on RET/PTC3 junction oncogene in papillary thyroid carcinoma: from molecular and cellular studies to preclinical investigations. *PLoS One* 9, e95964.
- (12) Ali, H. M., Urbinati, G., Raouane, M., and Massaad-Massade, L. (2012) Significance and applications of nanoparticles in siRNA delivery for cancer therapy. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 5, 403–12.
- (13) Raouane, M., Desmaele, D., Gilbert-Sirieix, M., Gueutin, C., Zouhri, F., Bourgaux, C., Lepeltier, E., Gref, R., Ben Salah, R., Clayman, G., et al. (2011) Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Med. Chem.* 54, 4067–4076.
- (14) Urbinati, G., Ali, H. M., Rousseau, Q., Chapuis, H., Desmaele, D., Couvreur, P., and Massaad-Massade, L. (2015) Antineoplastic Effects of siRNA against TMPRSS2-ERG Junction Oncogene in Prostate Cancer. *PLoS One* 10, e0125277.
- (15) Urbinati, G., de Waziers, I., Slamic, M., Fousigniere, T., Ali, H. M., Desmaele, D., Couvreur, P., and Massaad-Massade, L. (2016) Knocking Down TMPRSS2-ERG Fusion Oncogene by siRNA Could be an Alternative Treatment to Flutamide. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* 5, e301.
- (16) Sobot, D., Mura, S., Rouquette, M., Vukosavljevic, B., Cayre, F., Buchy, E., Pieters, G., Garcia-Argote, S., Windbergs, M., Desmaele, D., et al. (2017) Circulating Lipoproteins: A Trojan Horse Guiding Squalenoylated Drugs to LDL-Accumulating Cancer Cells. *Mol. Ther.* 25, 1596–1605.
- (17) Sobot, D., Mura, S., Yesylevskyy, S. O., Dalbin, L., Cayre, F., Bort, G., Mougou, J., Desmaele, D., Lepetre-Mouelhi, S., Pieters, G., et al. (2017) Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery. *Nat. Commun.* 8, 15678.
- (18) Jewett, J. C., and Bertozzi, C. R. (2010) Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1272–9.
- (19) Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, 2596–9.
- (20) Qin, B., Liu, L., Pan, Y., Zhu, Y., Wu, X., Song, S., and Han, G. (2017) PEGylated Solanesol for Oral Delivery of Coenzyme Q10. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3360–3367.
- (21) Qin, B., Liu, L., Wu, X., Liang, F., Hou, T., Pan, Y., and Song, S. (2017) mPEGylated solanesol micelles as redox-responsive nanocarriers with synergistic anticancer effect. *Acta Biomater.* 64, 211–222.
- (22) Daneial, B., Joseph, J. P. V., and Ramakrishna, G. (2017) Molecular dynamics simulation analysis of Focal Adhesive Kinase

K

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

- (FAK) docked with solanesol as an anti-cancer agent. *Bioinformation* 13, 274–283.
- (23) Troiber, C., Kasper, J. C., Milani, S., Scheible, M., Martin, L., Schaubhut, F., Kuchler, S., Radler, J., Simmel, F. C., Friess, W., et al. (2013) Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 255–64.
- (24) Esmailzadeh Gharehdaghi, E., Amani, A., Khoshayand, M. R., Banan, M., Esmailzadeh Gharehdaghi, E., Amini, M. A., and Faramarzi, M. A. (2014) Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimization of processing/formulation parameters. *Nucleic Acid Ther.* 24, 420–7.
- (25) Ali, H. M., Maksimenko, A., Urbinati, G., Chapuis, H., Raouane, M., Desmaele, D., Yasuhiro, H., Harashima, H., Couvreur, P., and Massaad-Massade, L. (2014) Effects of Silencing the RET/PTC1 Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma by siRNA-Squalene Nanoparticles With and Without Fusogenic Companion GALA-Cholesterol. *Thyroid* 24, 327–338.
- (26) Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., Lo, A., and Bertozzi, C. R. (2010) Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1821–6.
- (27) Jawalekar, A. M., Malik, S., Verkade, J. M., Gibson, B., Barta, N. S., Hodges, J. C., Rowan, A., and van Delft, F. L. (2013) Oligonucleotide tagging for copper-free click conjugation. *Molecules* 18, 7346–63.
- (28) van Delft, P., Meeuwenoord, N. J., Hoogendoorn, S., Dinkelaar, J., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A., and Filippov, D. V. (2010) Synthesis of oligoribonucleic acid conjugates using a cyclooctyne phosphoramidite. *Org. Lett.* 12, 5486–9.
- (29) Jasinski, D. L., Li, H., and Guo, P. (2018) The Effect of Size and Shape of RNA Nanoparticles on Biodistribution. *Mol. Ther.* 26, 784–792.
- (30) Versluis, A. J., van Geel, P. J., Oppelaar, H., van Berkel, T. J., and Bijsterbosch, M. K. (1996) Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br. J. Cancer* 74, 525–32.
- (31) Tuschl, T. (2002) Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 20, 446–8.
- (32) Othman, M., Desmaele, D., Couvreur, P., Vander Elst, L., Laurent, S., Muller, R. N., Bourgaux, C., Morvan, E., Pouget, T., Lepetre-Mouelhi, S., et al. (2011) Synthesis and physicochemical characterization of new squalenoyl amphiphilic gadolinium complexes as nanoparticle contrast agents. *Org. Biomol. Chem.* 9, 4367–86.

III. Structure des NPs siRNA-SQ

A. La structure de la double hélice n'est pas altérée par la chimie clic sans cuivre.

Une expérience de dichroïsme circulaire a été réalisée pour vérifier que la structure double-hélice du siRNA n'est pas altérée par les différentes étapes de la synthèse chimique et physique menant à la formation des NPs. Les spectres avant et après nanoprécipitation ont été comparés au spectre du siRNA « nu » non lié au SQ (Naked siRNA sur la figure 33). Nous montrons que ces trois spectres se superposent, confirmant que **la conformation du siRNA n'est pas modifiée par la synthèse chimique**.

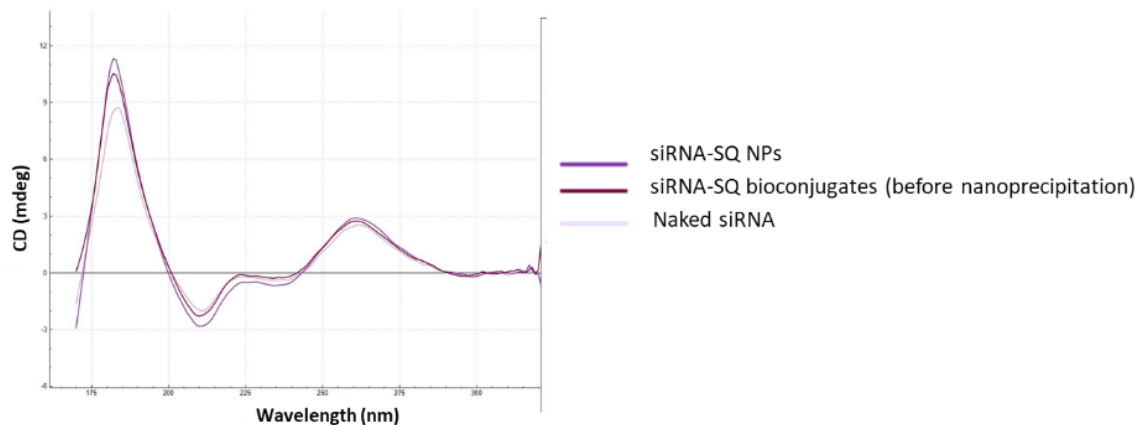


Figure 33 : La conformation du siRNA n'est pas modifiée par la synthèse chimique. *Spectres de dichroïsme circulaire du siRNA sous différentes formes : siRNA « nu » (courbe rose) ; BC siRNA-SQ avant nanoprécipitation (violet foncé) ; NPs siRNA-SQ (violet)*

B. Une nanoparticule siRNA-SQ encapsule des milliers de siRNA-SQ

L'étude par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), réalisée par l'équipe LIONS du CEA sur le spectromètre D33 à l'Institut Laue Langevin (Grenoble), permet de modéliser la structure globale des NPs siRNA-SQ dans une solution aqueuse. Pour cette expérience, deux dilutions de NPs siRNA-SQ (0,6 et 0,3 mg/mL) à partir d'une solution mère à 0,7 mg/mL ont été utilisées. L'analyse du diagramme (Figure 34A) permet de fournir deux informations importantes : d'une part que les NPs siRNA-SQ ont une **bonne stabilité colloïdale** dans l'eau et d'autre part, de déterminer le rayon d'une nanoparticule. En effet par une analyse de Guinier

au niveau du plateau débutant aux petits angles ($q < 0,002 \text{ \AA}^{-1}$), **un rayon de giration de 80 nm a été calculé pour les NPS siRNA-SQ**, ce qui correspond aux observations de cryoTEM.

Pour déterminer la structure interne des nanoparticules, une étude par diffusion des rayons X (SAXS) a également été réalisée sur une solution de 3,5 mg/mL de NPs siRNA-SQ (figure 34B). Le spectre vert montre **deux oscillations spécifiques des NPs siRNA-SQ (flèches vertes)** dans la région des q moyennes ($0,007 < q < 0,3 \text{ \AA}^{-1}$) qui ne sont pas retrouvées sur le spectre des NPs adénosine-SQ (spectre gris - figure 34B), particules bien caractérisées pour ses propriétés structurales (Rouquette, Ser-Le Roux et al. 2019). L'ajustement du diagramme SAXS par des sphères contenant des cylindres montre que l'oscillation numérotée **1** sur la figure 34B correspond à des **petites sphères de 10 nm de diamètre riches en siRNA** et l'oscillation numéro **2** sur la figure 34B est le **siRNA, qui est un cylindre de 4 nm de longueur et 1,1 nm de rayon**. La remontée aux petits angles est à attribuer au signal des particules de plus de 100 nm de diamètre.

Grâce à l'ajustement du diagramme de SANS par une sphère d'un diamètre totale de 120 nm et la comparaison des diagrammes SANS et SAXS (Figure 34C), nous pouvons dessiner une première modélisation de la structure interne d'une nanoparticule siRNA-SQ en solution aqueuse (Figure 34D). Chaque molécule de siRNA étant liée à un SQ, nous considérons que le nombre de molécule de siRNA présent dans une nanoparticule correspond aux nombres de BC siRNA-SQ. Ainsi, environ **34 BC siRNA-SQ** sont retrouvés dans **une petite sphère de 10 nm de diamètre**. La **nanoparticule siRNA-SQ** est quant à elle, composée d'une **dizaine de milliers de siRNA-SQ (~ 59 000 bioconjugués siRNA-SQ/ nanoparticule)** (Figure 34D).

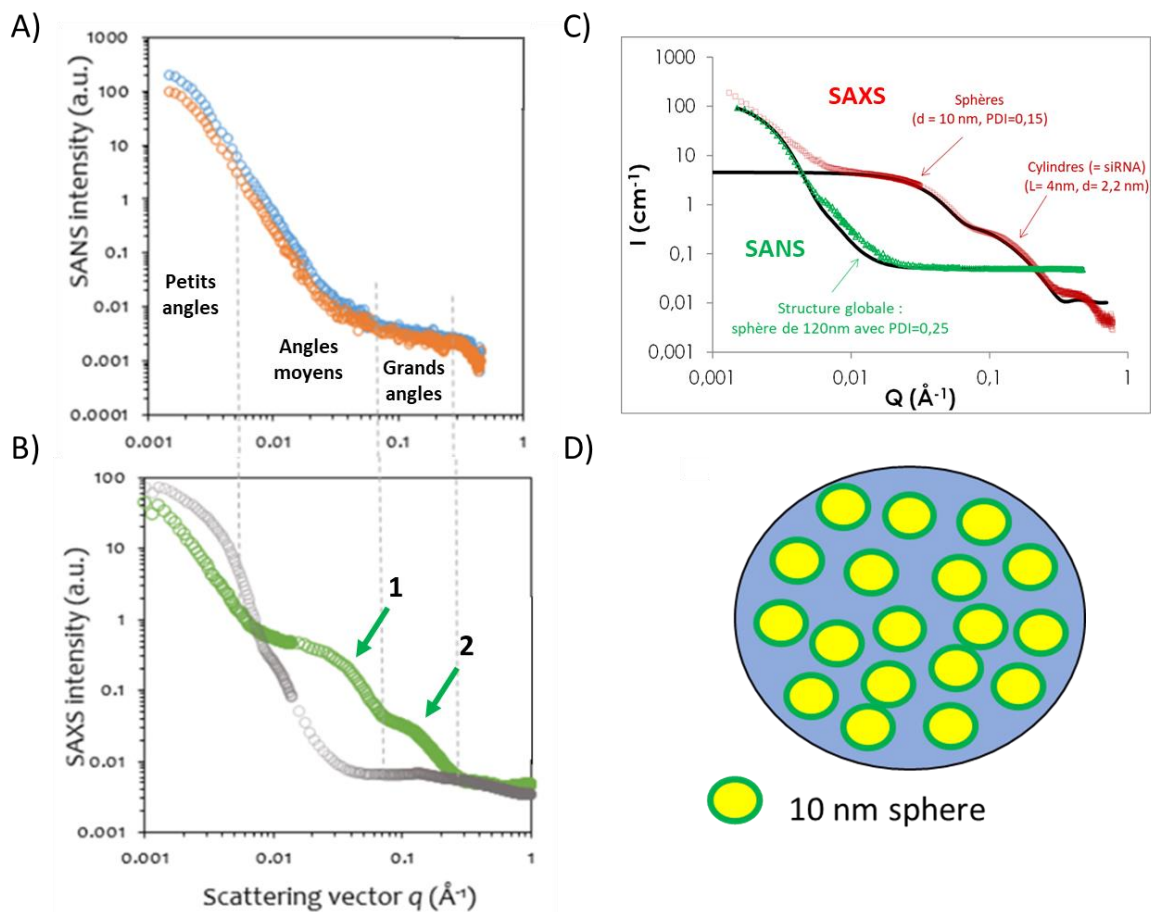


Figure 34 : Caractérisation structurale des NPs siRNA-SQ. A) Structure globale des NPs par SANS pour deux dilutions des NPs siRNA PMP22-SQ : 0,6 mg/mL (cercles orange) et 0,3 mg/mL (cercles bleus). La région des petits angles correspond à des valeurs de $q < 0,002 \text{ \AA}^{-1}$, angles moyens de $0,002$ à $0,04 \text{ \AA}^{-1}$ et la région des grands angles $q > 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ B) Structure interne des NPs par SAXS. Le diagramme des NPs siRNA-SQ en vert est comparé au diagramme de NPs adénosine-SQ (gris). La flèche numérotée 1 correspond à l'oscillation représentant des petites sphères de 10 nm de diamètre riche en siRNA et la flèche n°2 au siRNA de forme cylindrique de 4nm de longueur et 1,1 nm de rayon. C) Superposition des spectres SANS et SAXS des NPs siRNA-SQ et ajustement des courbes par des sphères polydisperses contenant ou non des cylindres de siRNA D) Schéma de la structure d'une nanoparticule siRNA-SQ issu des ajustements de courbes SANS et SAXS.

IV. Etude de l'identité biologique des nanoparticules siRNA-SQ

En se basant sur la littérature, il semblerait que l'identité synthétique des NPs ne correspondrait pas exactement à leurs identité biologique (Cai and Chen 2019). En effet, *in vivo* une couronne de protéines sériques va se former instantanément autour des NPs favorisant leur transport dans les tissus. Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à caractériser l'interaction avec les protéines sériques les plus abondantes.

A. Interactions avec le sérum

a) Les NPs siRNA-SQ interagissent avec le sérum

Pour montrer l'interaction entre les NPs siRNA-SQ avec des protéines sériques, ces dernières ont été incubées avec une quantité croissante de FBS à 37°C pendant 30 min puis une électrophorèse d'agarose 4% a été réalisée (Figure 35A). Nous observons qu'un retard à la migration apparaît dès que ces NPs sont mises en présence de sérum total. Ceci est dû à un changement de leur mobilité électrophorétique qui est fonction du poids moléculaire. Ainsi, les NPs siRNA-SQ sont « plus lourdes » par **interaction avec des éléments du sérum** et cela se traduit sur le gel d'électrophorèse par ce retard dans la migration en comparaison avec les NPs dans l'eau. Le potentiel ζ des NPs siRNA-SQ a été mesuré avant et après incubation avec différentes proportions de FBS (pH = 7 ; Figure 35B). Ce dernier augmente et devient presque neutre à partir de 25% de FBS, confirmant la **présence importante d'éléments sériques autour des NPs siRNA-SQ**.

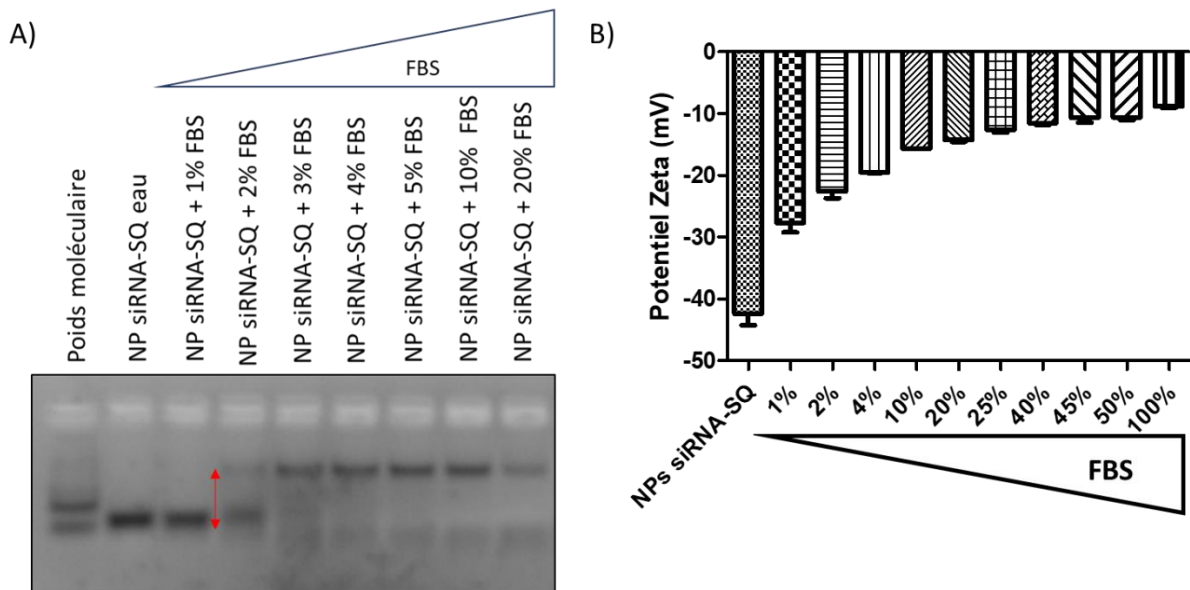


Figure 35: Les NPs siRNA-SQ interagissent avec des composants du sérum. A) *Electrophorèse d'agarose 4%*. La flèche rouge symbolise le retard à la migration dû à un changement dans la mobilité électrophorétique. B) *Mesures du potentiel ζ en présence des concentrations croissantes de FBS, montrant la neutralisation de la charge des NPs en présence du sérum.*

b) Les NPs siRNA-SQ sont stables dans 50% de sérum

La proportion de sérum dans le sang humain est de 50% environ. Nous avons voulu étudier la stabilité biologique des NPs siRNA-SQ dans ces conditions. Ainsi, les NPs siRNA-SQ ont été incubées avec 50% de sérum, des aliquotes ont été recueillies à différents temps d'incubation et une électrophorèse d'agarose 4% a été réalisée (Figure 36A). Dès la mise en présence des NPs avec le FBS (flèche rouge ; $t = 0\text{min}$), un retard à la migration est observé en comparaison avec le siRNA « nu » (flèche bleu), confirmant **l'assemblage instantané d'éléments sériques autour des NPs**. Cette observation permet aussi d'affirmer que le siRNA n'intervient pas dans ces interactions puisque le siRNA « nu » ne migre pas à la même distance que les NPs en présence de sérum. Après 30 min d'incubation à 37°C, un retard à la migration apparaît pour le siRNA « nu » (flèche orange) : il migre plus loin car il est dégradé à ses extrémités par les nucléases contenues dans le sérum. La dégradation des NPs se fait plus progressivement. La quantification des bandes permet d'estimer la demi-vie plasmatique des NPs siRNA-SQ à l'aide d'une régression polynomiale (Figure 36B) : $t_{1/2} = 1,62 \text{ h}$.

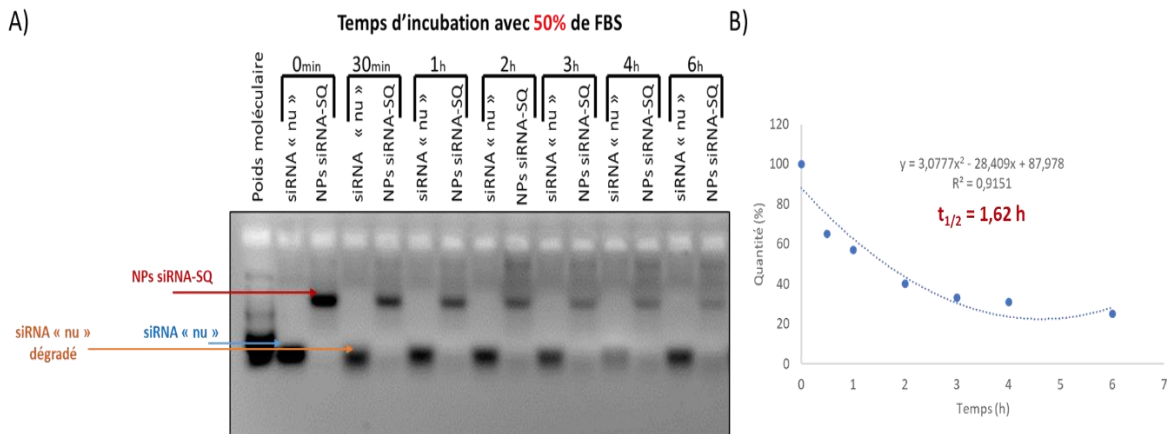


Figure 36 : Les NPs siRNA-SQ sont stables dans le sérum. A) *Electrophorèse d'agarose 4%* montrant la stabilité biologique du siRNA « nu » et des NPs siRNA-SQ dans 50% de sérum à 37°C. B) *Régression polynomiale de la quantité de NPs (%) en fonction du temps.*

c) *La structure et la forme des NPs siRNA-SQ n'est pas modifiée dans le sérum*

Il est possible d'étudier le comportement des molécules dans un mélange complexe comme le FBS grâce à la diffusion des neutrons. Aux petits angles (zone cerclée en rouge sur la figure 37 ; $q < 0,002 \text{ \AA}^{-1}$), le signal observé provient essentiellement des NPs siRNA-SQ. Nous n'observons aucune augmentation de ce signal en présence du FBS, **les NPs sont donc stables et ne s'agrègent pas dans ce milieu pourtant chargé en ions** (comparable au PBS 0,2 M). Seulement 13% du signal provenant de ces NPs (ligne d'ajustement en noir) a « disparu » en présence du FBS, confirmant la **forte stabilité colloïdale des NPs siRNA-SQ.**

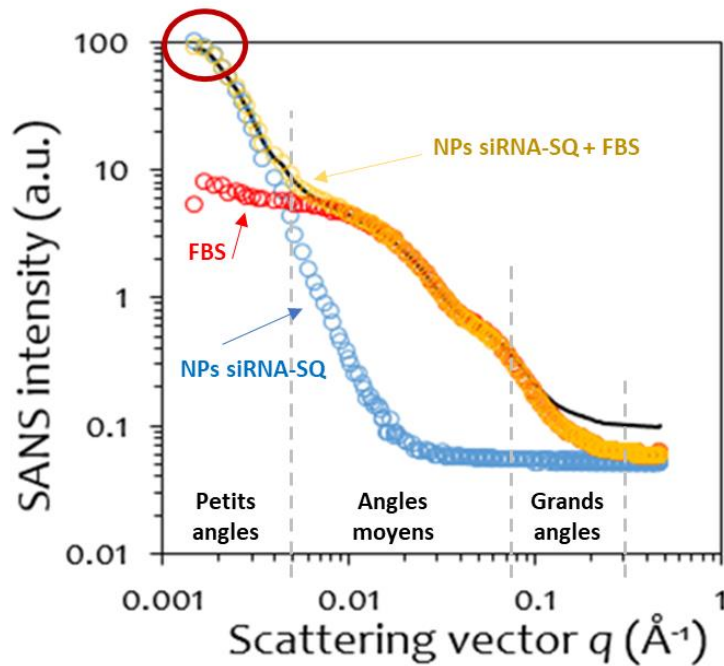


Figure 37 : Les NPs siRNA-SQ conservent leur structure dans le sérum. Spectre SANS des NPs siRNA-SQ dans D_2O (cercles bleus), du FBS dialysé contre D_2O (cercles rouges) et du mélange des 2 (cercles jaunes). La région des petits angles correspond à des valeurs de $q < 0,002 \text{ \AA}^{-1}$, angles moyens de $0,002$ à $0,04 \text{ \AA}^{-1}$ et la région des grands angles $q > 0,04 \text{ \AA}^{-1}$. La courbe lisse noire correspond à une combinaison linéaire des diagrammes SANS du FBS et des NPs siRNA-SQ.

B. Interactions avec l'albumine

a) Les NPs siRNA-SQ interagissent avec l'albumine

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la protéine la plus abondante du sérum, l'albumine. Tout d'abord, les NPs siRNA-SQ ont été incubées avec des quantités croissantes d'albumine de sérum bovin (bovine serum albumin ou BSA) selon le ratio molaire BSA/NPs et une migration sur gel d'agarose à 4% a été effectuée. Comme précédemment avec le FBS, un retard à la migration est observé. En effet, plus le ratio BSA/NP augmente, moins les NPs migrent loin (flèche rouge sur la figure 38A), confirmant **l'existence d'une interaction entre ces deux molécules**.

Pour la confirmer, une expérience de dichroïsme circulaire a été réalisée. Deux spectres ont été enregistrés (Figure 38B). La courbe orange est celle de la BSA seule à la concentration de 4 mg/mL et la deuxième courbe rouge représente la BSA en présence des NPs siRNA-SQ. Sur le premier spectre (courbe orange), les bandes caractéristiques de l'albumine sont retrouvées : deux négatives à 210 et 224 nm et une positive à 192 nm.

L'incubation avec les NPs entraîne une diminution du signal de ces bandes de l'ordre de 8 à 10 %, indiquant une **interaction entre les NPs siRNA-SQ et la BSA induisant un changement de conformation de cette dernière.**

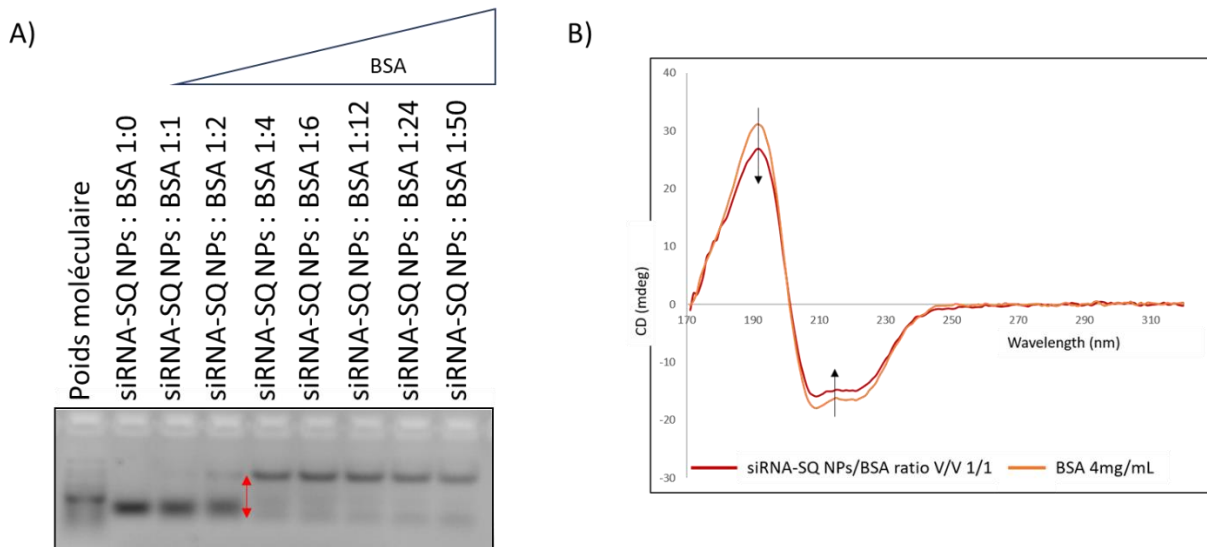


Figure 38 : Etude de l'interaction des NPs siRNA-SQ avec la BSA. *A) Electrophorèse d'agarose 4% après incubation des NPs avec une concentration croissante de BSA. B) Spectre de dichroïsme circulaire de la BSA seule (courbe orange) et en présence des NPs siRNA-SQ (courbe rouge).*

b) Les NPs siRNA-SQ interagissent avec l'albumine : étude spectroscopique

L'interaction entre les NPs siRNA-SQ et l'albumine a également été étudiée par deux approches en spectroscopie de fluorescence.

La *première approche* consiste à fixer la concentration de BSA (5 μM) et l'incuber en présence de concentrations croissantes de NPs. A chaque nouvelle incubation, le spectre de fluorescence émise de la BSA est enregistré (Figure 39). Plus la concentration en NPs augmente, plus l'intensité maximale de fluorescence émise diminue en comparaison avec le spectre de la BSA seule (courbe rouge sur la figure 39). L'analyse des données permet de confirmer la **formation d'un complexe NPs-BSA** ($k_q > 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et d'en déterminer la **constante de dissociation**, qui est équivalente à la réciproque de la constante de Stern-Volmer et égale à $3,61 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (Tableau 12).

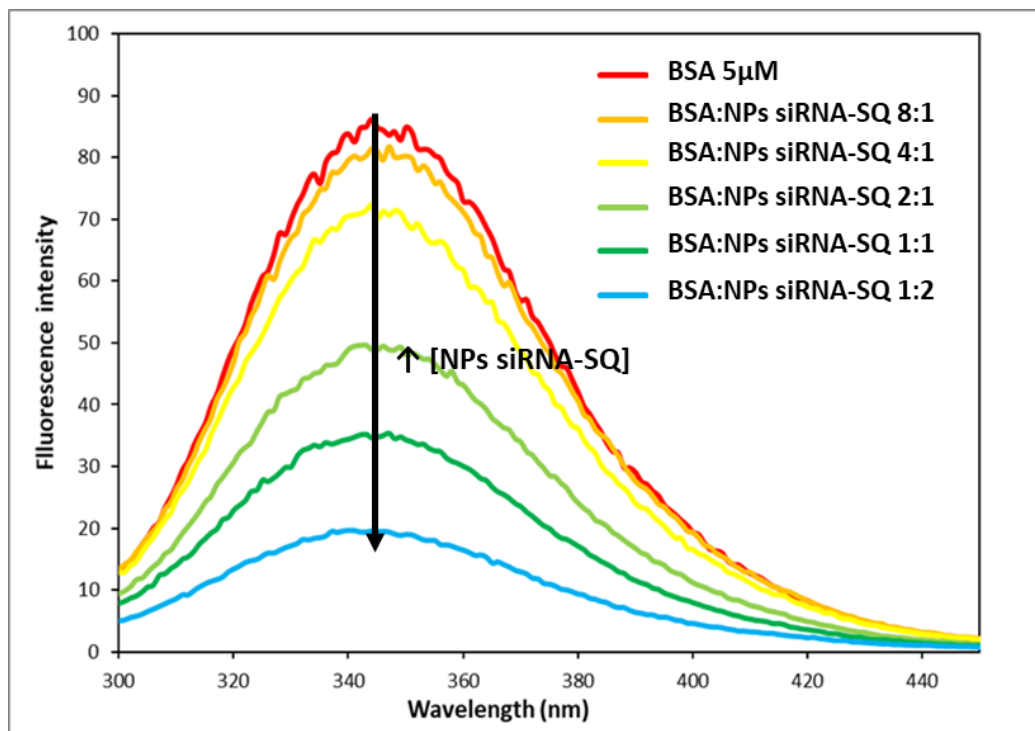


Figure 39 : La fluorescence émise par la BSA diminue en présence des NPs siRNA-SQ. Spectre d'émission de la fluorescence de la BSA seule (rouge) et en présence d'une concentration croissante de NPs siRNA-SQ selon le ratio molaire.

Tableau 12 : Constantes de la capture de la fluorescence de la BSA par les NPs siRNA-SQ à une température (25°C) (n=3)

Constants		Value	Unit
Quenching rate constant	k_q	$3,16 \pm 0,73$	$X 10^{13} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$
Stern-Volmer constant	K_{sv}	$3,16 \pm 0,73$	$X 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$
Dissociation constant	K_D	$3,61 \pm 0,99$	$X 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$
Binding site	n	$1 \pm 0,23$	

La *seconde approche* consiste à ajouter progressivement la BSA à une concentration fixe de NPs siRNA-SQ. Le suivi du spectre de fluorescence permet de confirmer la formation du complexe NPs-BSA. Les spectres finaux sont présentés sur la figure 40A. Nous pouvons remarquer que les NPs siRNA-SQ seules (courbe bleue) n'émettent pas de fluorescence, confirmant que celle enregistrée correspond à la BSA. Dans les mêmes conditions expérimentales, la fluorescence émise par la BSA en présence des NPs (courbe noire) est plus faible que celle de la BSA seule (courbe rouge), indiquant que ces deux molécules interagissent. De plus, nous observons un « shift » de 2 nm de la longueur d'onde d'émission maximale confirmant la **formation d'un complexe NPs-BSA**. La constante apparente de dissociation à 25°C et pH 7, K_{obs} , est déterminée à partir de l'analyse des données de fluorescence et de la régression linéaire selon l'équation 14 représentée sur la figure 40B. Sa valeur est égale à $7,79 \pm 1,27 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ (n=4).

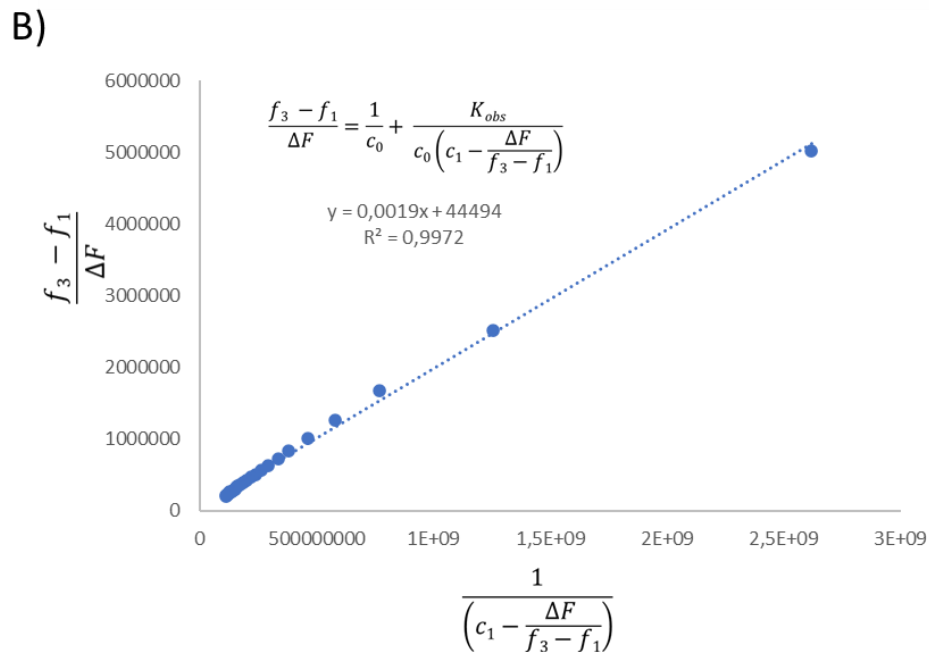
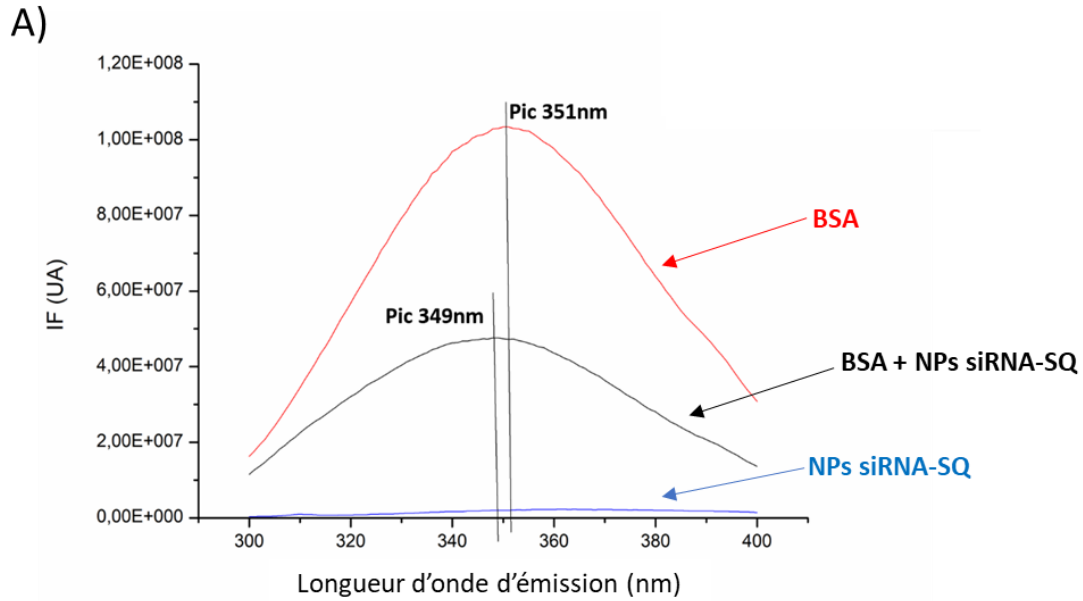


Figure 40 : Spectroscopie de fluorescence de la BSA en présence des NPs siRNA-SQ. A) Spectres finaux d'émission de la fluorescence de la BSA à la concentration de $5\mu\text{M}$ en rouge, BSA ($5\mu\text{M}$) + NPs siRNA-SQ ($5\mu\text{M}$) en noir et NPs siRNA-SQ ($5\mu\text{M}$) seules en bleu B) Présentation d'une régression linéaire permettant de calculer la constante apparente de dissociation K_{obs}

c) *Calculs des constantes thermodynamiques par calorimétrie isotherme*

L'étude de la différence de chaleur produite par l'interaction entre les NPs siRNA-SQ et l'albumine par calorimétrie isotherme permet de calculer l'ensemble des données thermodynamiques du complexe. Les résultats sont présentés dans la figure 41 : en A et C, sont représentés les pics ascendants de la titration par l'albumine des NPs siRNA RET/PTC1-SQ et PMP22-SQ respectivement, ainsi que l'intégration des pics en fonction du ratio molaire [Albumine]/[NPs siRNA-SQ]. Pour les deux formulations nanoparticulaires, nous observons des pics exothermiques indiquant que la formation du complexe produit de la chaleur ($\Delta H < 0$) et se fait spontanément ($\Delta G < 0$). Les valeurs obtenues après ajustement avec un modèle connu de liaison mono-site sont présentées en B et D.

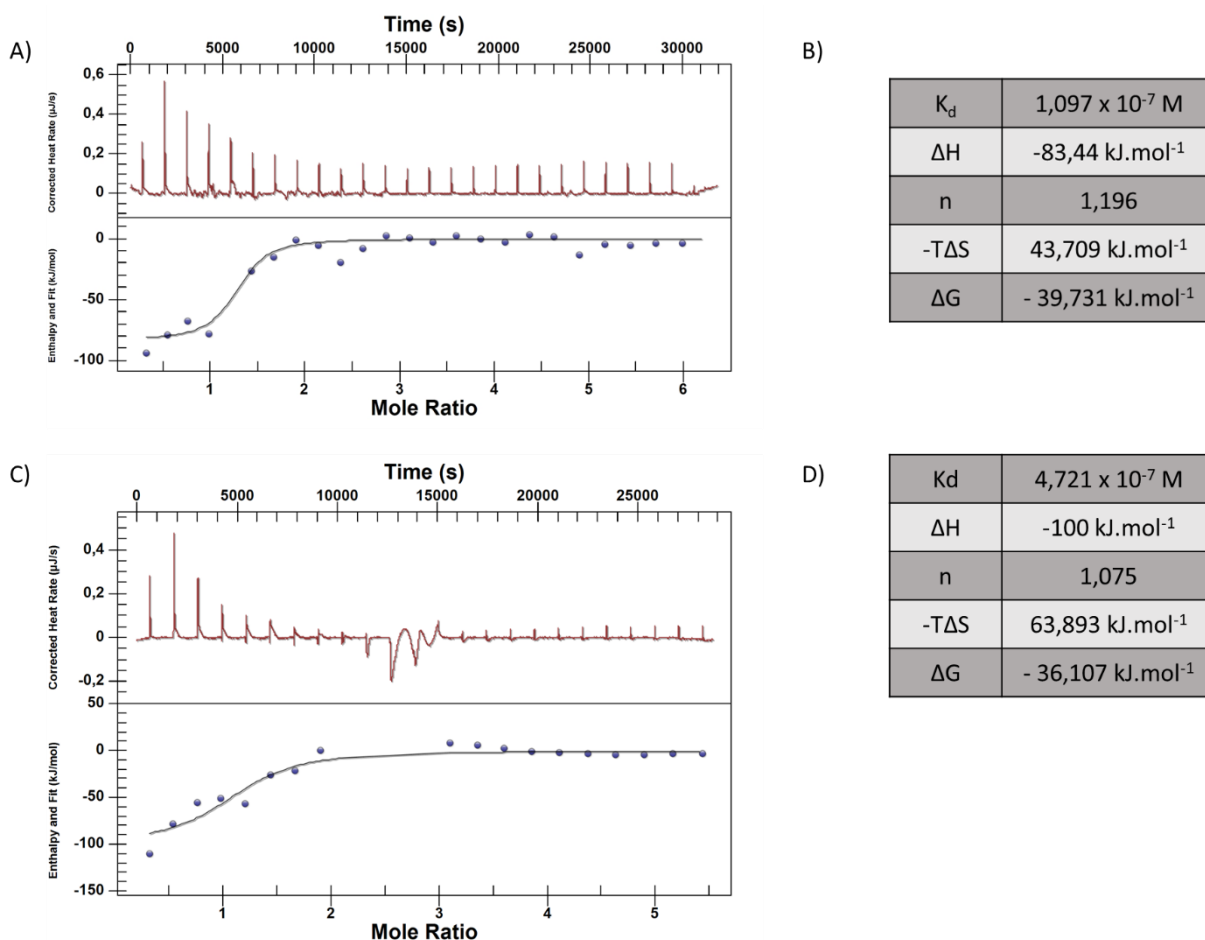


Figure 41 : Calorimétrie isotherme. A) Courbes obtenues lors de la titration des NPs siRNA RET/PTC1-SQ par la HSA ($[HSA]_{seringue} = 100 \mu\text{M}$), B) Valeurs thermodynamiques obtenues de A après ajustement, C) Courbes obtenues lors de la titration des NPs siRNA PMP22-SQ par la BSA ($[BSA]_{seringue} = 100 \mu\text{M}$) et D) Valeurs thermodynamiques de C après ajustement.

d) La structure des NPs siRNA-SQ n'est pas modifiée par la présence de l'albumine

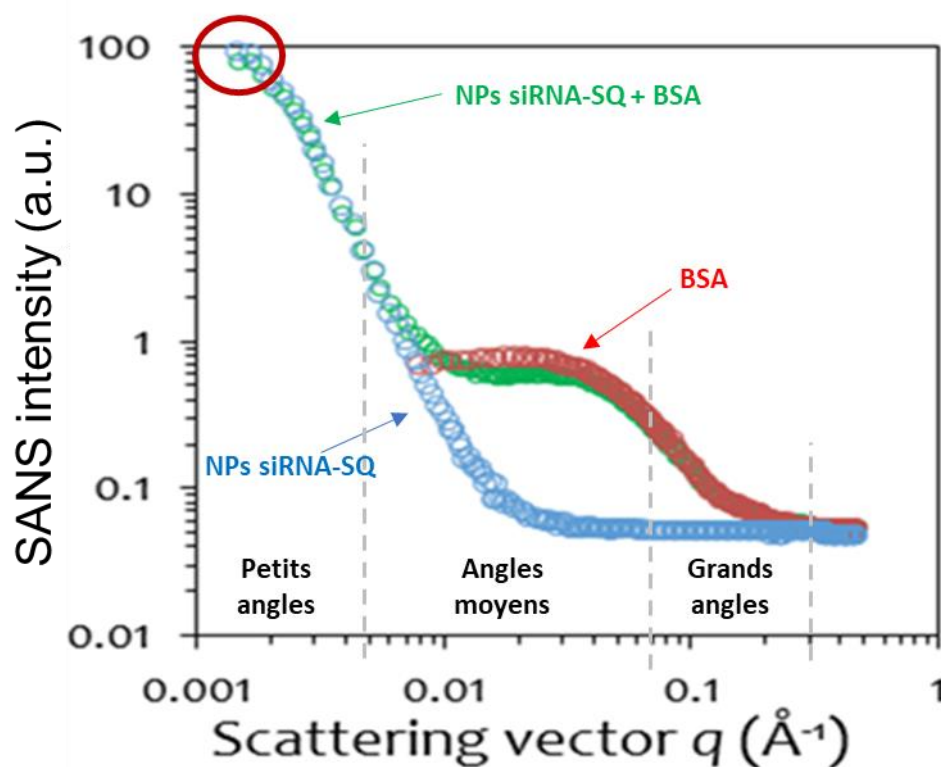


Figure 42 : Les NPs siRNA-SQ sont stables en présence de BSA. *Modèle SANS du mélange NPs siRNA-SQ/BSA (cercles verts). Cercles bleus : 0,3 mg/ml de NPs siRNA-SQ dans D_2O , cercles rouges : 13 mg/ml de BSA dans le D_2O . La région des petits angles correspond à des valeurs de $q < 0,002 \text{ \AA}^{-1}$, angles moyens de $0,002$ à $0,04 \text{ \AA}^{-1}$ et la région des grands angles $q > 0,04 \text{ \AA}^{-1}$*

L'interaction des NPs siRNA-SQ avec la BSA a également été étudiée par SANS sur D33 spectromètre de l'Institut Laue Langevin (Grenoble). Nos résultats présentés sur la figure 42 montrent une superposition entre les courbes des NPs siRNA-SQ seules (cercles bleus) et les NPs siRNA-SQ en présence de BSA (cercles verts). Ceci indique que les **NPs siRNA-SQ sont stables** et ne sont **pas modifiées en présence d'une forte concentration de BSA**.

C. Interactions avec les lipoprotéines de basse densité

Dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à la troisième protéine la plus abondante du sérum, les lipoprotéines et plus particulièrement aux LDL qui transportent 75% du cholestérol sanguin. Les NPs siRNA-SQ ont été incubées avec une quantité croissante de LDL selon leur ratio massique et une électrophorèse d'agarose 4% a été réalisée (Figure 43A). Comme pour les électrophorèses précédentes, un retard à la migration est observé lorsque la quantité de LDL incubée avec les NPs augmentent, indiquant **qu'une interaction se produit entre ces deux molécules**. De plus, les NPs siRNA-SQ ont été incubées avec une concentration croissante de LDL selon le rapport massique [NPs siRNA-SQ] 1 : 1-8 [LDL] et le potentiel ζ a été mesuré (Figure 43B). Une **augmentation de la charge de surface** est observée **en présence des lipoprotéines**, la rendant plus neutre. Enfin comme pour l'albumine, les LDL ont été ajoutés progressivement à une concentration fixe de NPs siRNA-SQ et les spectres de la fluorescence émise des LDL ont été enregistrés (Figure 43C). Dans les mêmes conditions expérimentales, la fluorescence émise par les LDL en présence des NPs est plus faible que celle des LDL seuls. **Ces deux molécules interagissent ce qui amène à une capture de la fluorescence émise par les LDL**. De plus, nous observons un « shift » de 5 nm dans la longueur d'onde maximale d'émission du pic confirmant la **formation d'un complexe NPs siRNA-SQ - LDL**.

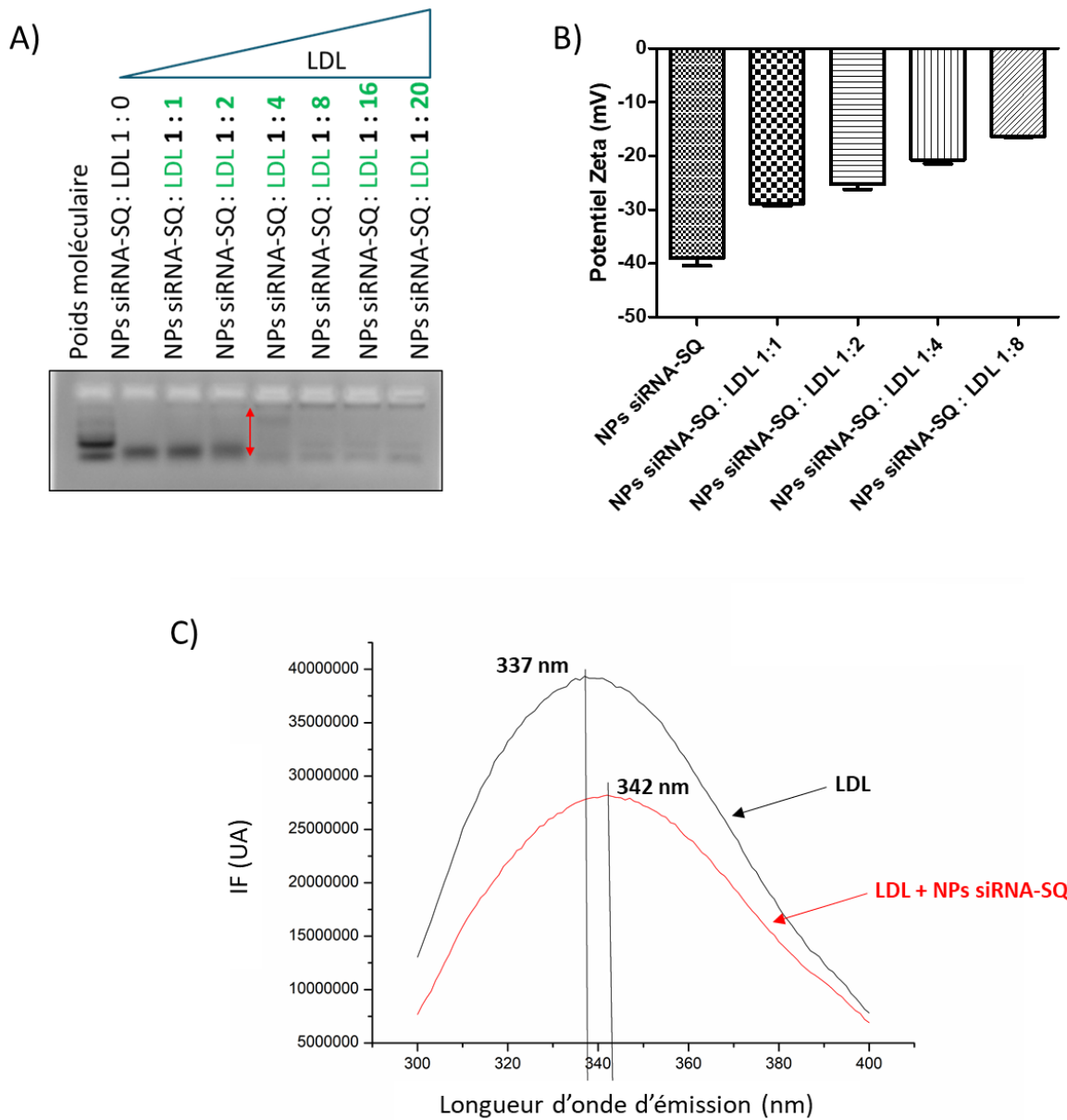


Figure 43 : Les NPs siRNA-SQ interagissent avec les LDL. A) *Electrophorèse d'agarose 4%* après incubation des NPs siRNA-SQ avec une quantité croissante de LDL. B) *Mesure du potentiel ζ* après incubation avec les LDL. C) *Spectre de fluorescence émise des LDL en absence (courbe noire) ou présence des NPs siRNA-SQ (courbe rouge).*

D. Interaction du siRNA « nu » avec le sérum et ses composants

Nous avons testé si l'interaction des NPs siRNA-SQ avec le sérum et ses composants se faisaient *via* le SQ et non du siRNA. Ainsi, le siRNA « nu » (c'est-à-dire non couplé au SQ) a été incubé pendant 30 min à 37°C avec des quantités croissantes avec le sérum entier, la BSA et les LDL puis des électrophorèses d'agarose 4% ont été réalisées. Contrairement aux NPs siRNA-SQ, aucun retard à la migration n'est observé lorsque le siRNA « nu » est en présence de sérum, albumine et LDL (Figure 44). Ceci confirme que **dans les NPs siRNA-SQ, c'est bien la partie squalénique qui interagit avec l'albumine et les LDL.**

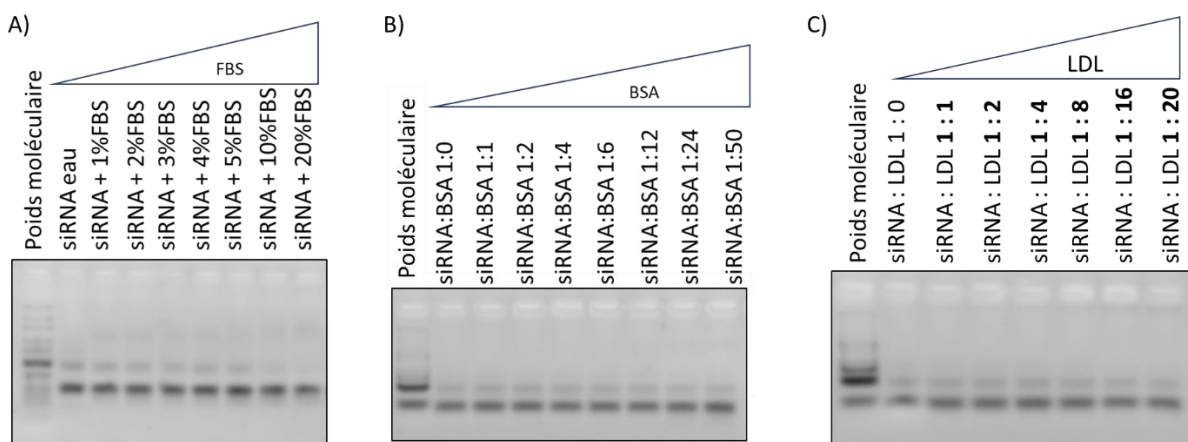


Figure 44 : Le siRNA « nu » n'interagit pas avec le sérum total, l'albumine et les LDL. *Electrophorèse d'agarose 4% après incubation du siRNA « nu » avec une quantité croissante de FBS (A), BSA (B) et LDL (C).*

V. Etude de l'internalisation des NPs siRNA-SQ

Depuis 2010, nous avons démontré l'efficacité thérapeutique des NPs siRNA-SQ dans plusieurs modèles pathologiques de cancers (carcinome papillaire de la thyroïde et cancer de la prostate) et récemment dans un modèle de neuropathie périphérique (maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A) mais nous n'avons jamais réussi à internaliser *in vitro* les NPs sans l'aide d'un agent transfectant cationique (lipofectamine®). Pour comprendre cette différence d'efficacité observée *in vitro* et *in vivo*, **différentes hypothèses ont été posées :**

- **Répulsion électrostatique entre les NPs siRNA-SQ anioniques et la membrane cellulaire également chargée négativement**
- **Rôle de la disponibilité de la surface cellulaire**
- **Les interactions avec le sérum aident à l'internalisation des NPs siRNA-SQ**

A. La charge négative des NPs siRNA-SQ empêche leur internalisation *in vitro*

Les NPs siRNA-SQ ont une charge négative qui empêche probablement leur internalisation dans les cellules par répulsions électrostatiques avec la membrane cellulaire chargée négativement. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser le même type de lipide que nos NPs mais modifié par la fonction guanidyl-hydrazone. Ce dérivé SQ cationique (SQ⁺) a ensuite été ajouté à la solution de NPs siRNA-SQ avec un ratio molaire 1 [NPs siRNA-SQ] : 100 [SQ⁺] (Bertrand, Lucas et al. 2015). Lorsque SQ⁺ a été ajouté aux NPs, leur taille a légèrement augmenté mais surtout **une inversion de charge a été mesurée** (Tableau 13). En effet, la charge négative initiale des NPs siRNA-SQ est devenue significativement positive.

Tableau 13 : Inversion de la charge des NPs siRNA-SQ après ajout du SQ cationique. *Tableau montrant l'inversion de charges des NPs siRNA-SQ en présence de SQ⁺ (n=5). ** p<0,001 par rapport au potentiel ζ des NPs siRNA-SQ (Mann-Whitney test)*

	Size	PDI	Zeta potential
siRNA-SQ NPs	197,7 ± 12,2 nm	0,127 ± 0,019	-37,1 ± 2,4 mV
siRNA-SQ NPs : SQ ⁺	255,6 ± 7,2 nm	0,119 ± 0,014	39,6 ± 4,3 mV **

L'efficacité thérapeutique de ces NPs rendues cationiques a été évaluée par une transfection dans deux lignées cellulaires BHP 10-3 (issue d'un carcinome papillaire de la

thyroïde) et MSC80 (cellules de Schwann murines) pendant 48 heures (n=2 pour BHP 10-3 et 1 pour MSC80 ; Figure 45). Comme attendu **sans transfectant cationique, aucun effet sur l'expression des gènes RET/PTC1 et PMP22 n'a été observé**, contrairement à ce qui se passe lorsque le siRNA « nu » (non couplé au SQ, noté Naked siRNA sur les figures) ou formulé en NPs est entouré de lipides cationiques (Lipofectamine et SQ⁺). L'effet de l'extinction du gène est maximal avec la lipofectamine®, mais les **SQ cationiques internalisent suffisamment de NPs siRNA RET/PTC1-SQ pour inhiber environ 20% de l'expression de l'ARNm RET/PTC1** (flèche noire sur la figure 45A) et **80% de l'ARNm PMP22** (flèche noire sur la Figure 45B).

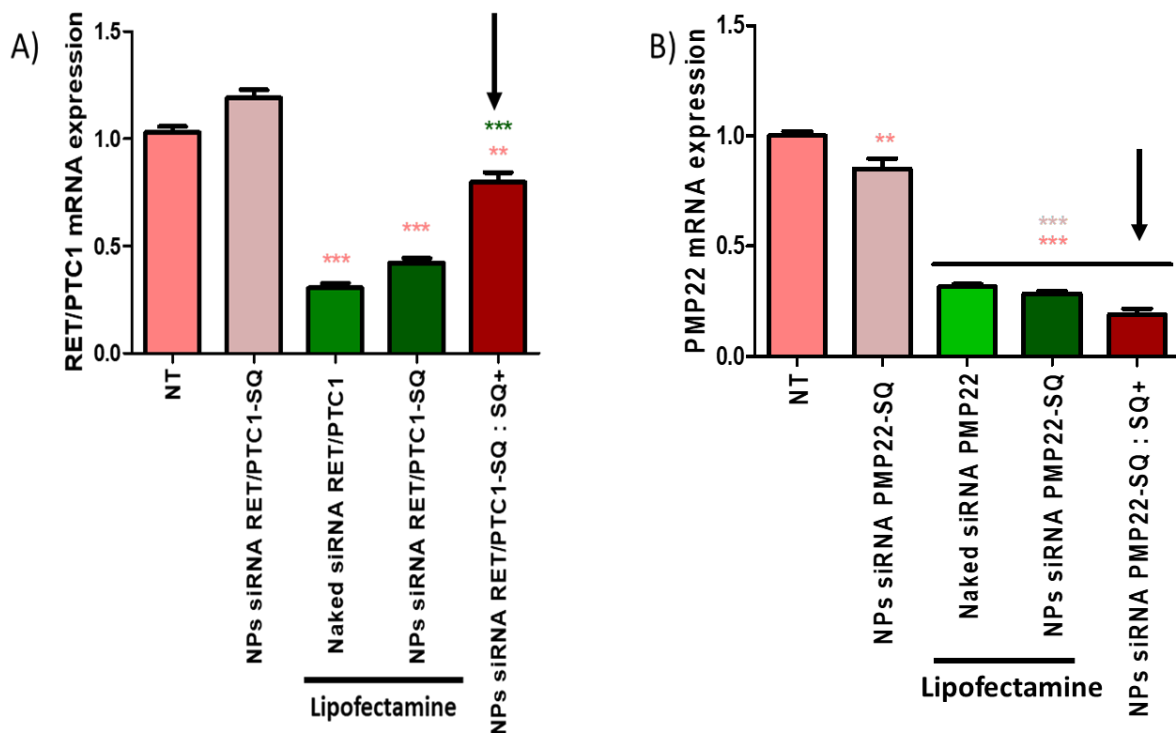


Figure 45 : L'inversion de la charge favorise l'internalisation des NPs siRNA-SQ. Les cellules BHP 10-3 A) et MSC80 B) ont été transfectées avec 50nM de NPs siRNA RET/PTC1 ou PMP22-SQ entouré de SQ⁺ ou non. La lipofectamine 2000 a été utilisée pour transfecter le siRNA nu et la forme NPs comme témoins positifs. Quarante-huit heures plus tard, les cellules ont été récoltées, l'ARN extrait et la RT-qPCR effectuée. La flèche noire désigne la condition où les NPs siRNA-SQ sont transfectées avec le SQ⁺. Pour les deux lignées : ***p<0,0001 et **p<0,001 par rapport à la condition NT. Pour la lignée BHP 10-3 : ***p<0,0001 par rapport aux Naked siRNA RET/PTC1 et NPs siRNA RET/PTC1-SQ lipofectamine. Pour la lignée MSC80 : ***p<0,0001 par rapport aux NPs siRNA PMP22-SQ (n=2 pour les deux lignées cellulaires ; One-way Anova suivi par un test de Bonferroni)

B. La disponibilité de la surface cellulaire semble avoir son importance dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ

La disponibilité de la surface cellulaire *in vitro* est moins importante que celle présentée aux NPs lorsqu'elles sont injectées *in vivo*. Pour tester cette deuxième hypothèse, les cellules BHP 10-3 et MSC80 ont été transfectées par la méthode « inverse » pendant 48 et 72h (n=2). L'ARN des cellules a ensuite été extrait et une RT-qPCR a été réalisée pour évaluer l'inhibition de l'expression du gène cible. La lipofectamine® a été utilisée pour faire entrer le siRNA « nu » et les NPs siRNA-SQ respectives, qui sont les contrôles positifs de l'expérience. **Aucune inhibition significative de l'expression de PMP22** n'a été mise en évidence pour la lignée MSC-80 lorsque les cellules sont traitées avec les NPs siRNA PMP22-SQ sans l'utilisation du transfectant cationique (Figure 46C et D). En revanche, une **inhibition de 26 % de l'expression de l'ARNm RET/PTC1** est observée dans les cellules BHP 10-3 après **48h de traitement avec les NPs siRNA RET/PTC1-SQ** (flèche noire sur la figure 46A). Cette inhibition est **comparable à celle observée avec les NPs siRNA-SQ transfectées par la lipofectamine**. Cependant, après 72h de traitement, cette inhibition n'est plus significative (Figure 46B). Il est difficile de conclure si la disponibilité de la surface est un facteur important dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ qui semble être dépendant de la lignée cellulaire.

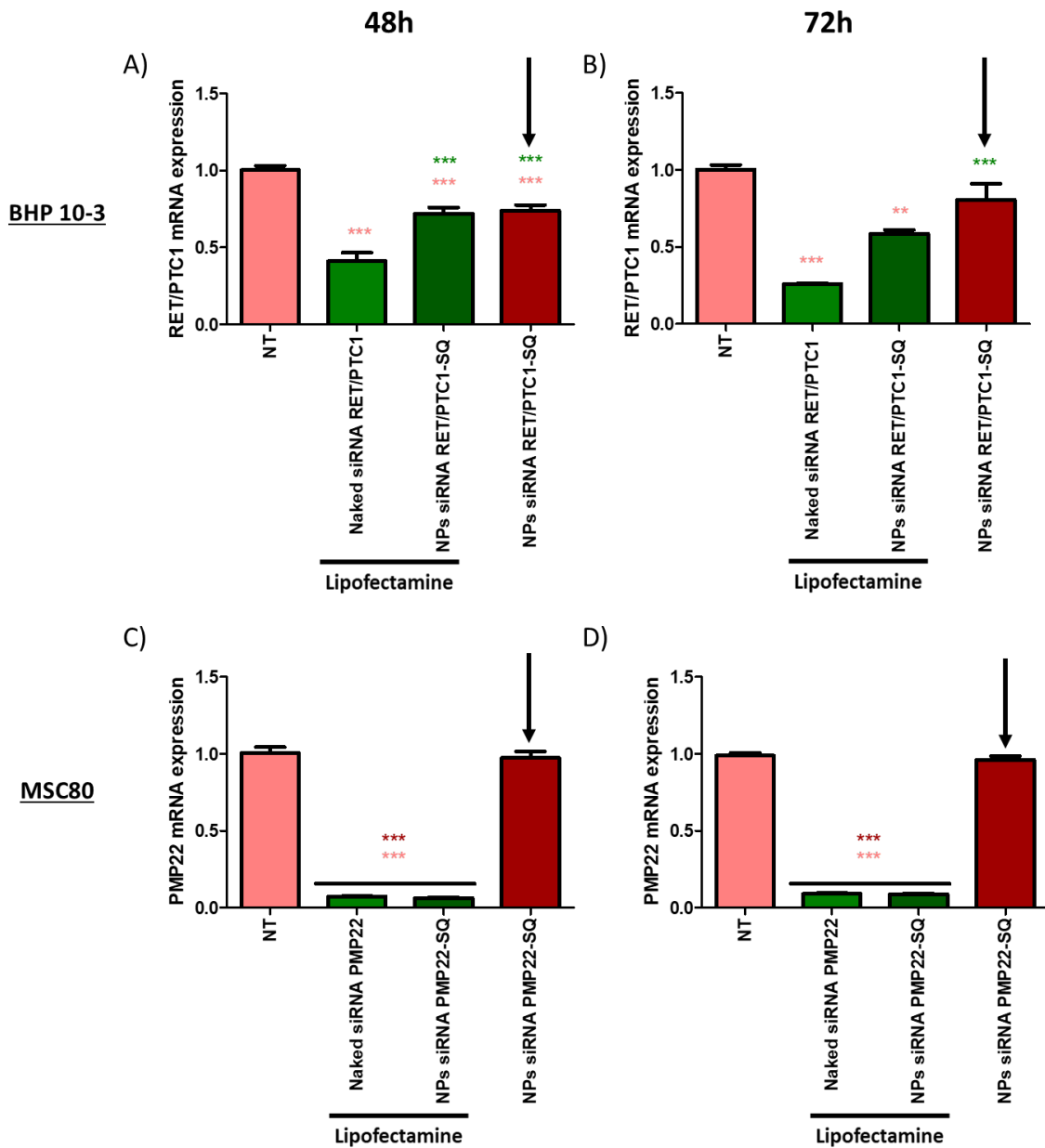


Figure 46 : Une surface cellulaire plus disponible permet d'internaliser les NPs siRNA -SQ dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules saines. Les cellules BHP 10-3 (A et B) et MSC80 (C et D) ont été traitées avec 50 nM de NPs siRNA RET/PTC1-SQ ou PMP22-SQ respectivement seuls ou transfectées avec la même concentration de siRNA nus et NPs. Quarante-huit et soixante-douze heures plus tard, les cellules ont été récoltées, l'ARN extrait et la RT-qPCR effectuée pour évaluer l'expression relative de l'ARNm RET/PTC1 et PMP22. La flèche noire désigne les conditions où les NPs siRNA-SQ ne sont pas transfectées avec la lipofectamine. Pour les deux lignées : *** $p < 0,0001$ et ** $p < 0,001$ par rapport à la condition NT. Pour la lignée BHP 10-3 : *** $p < 0,0001$ par rapport aux Naked siRNA RET/PTC1 lipofectamine. Pour la lignée MSC80 : *** $p < 0,0001$ par rapport aux NPs siRNA PMP22-SQ ($n=2$ pour les deux lignées cellulaires ; One-way Anova suivi par un test de Bonferroni)

C. Le récepteur des LDL pourrait jouer un rôle dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ

Sobot *et al.*, ont montré que les LDL s'adsorbaient à la surface des NPs de gemcitabine-SQ, ce qui permettait l'internalisation de ce nanovecteur par les cellules surexprimant le récepteur des LDL (LDLR) (Sobot, Mura *et al.* 2017, Sobot, Mura *et al.* 2017). Pour connaître le rôle du LDLR dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ, son expression a été analysée dans différentes lignées cellulaires pathologiques cancéreuses et saines (Figure 47). Les **lignées cellulaires cancéreuses BHP 10-3** (issues d'un carcinome papillaire de la thyroïde) et **A673** (provenant d'un sarcome d'Ewing) connues pour être très tumorigènes chez la souris **expriment fortement le récepteur des LDL. En revanche, les lignées non tumorigènes TCP1** (carcinome papillaire différencié) et **MSC80** (cellules de Schwann murines) **ou peu tumorigène chez la souris VCaP** (cancer de la prostate) expriment peu ou pas le récepteur LDL.

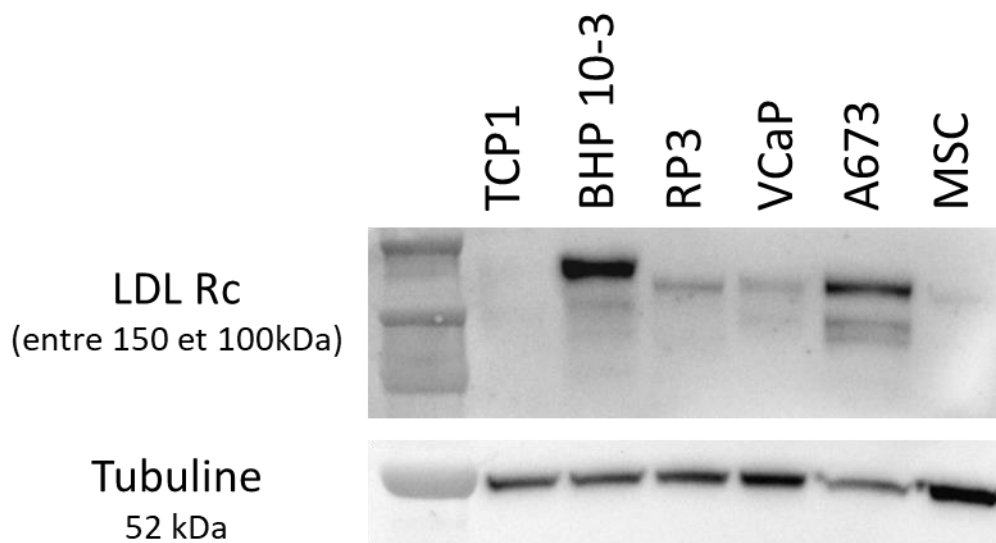


Figure 47 : Western blot représentatif de l'expression protéique du récepteur des LDL dans plusieurs lignées cellulaires. *Les résultats montrent une forte expression du LDLR dans les cellules tumorigènes (BHP 10-3, A673) comparativement aux cellules peu (RP3) ou pas tumorigènes (MSC80, TCP1).*

D'après ce résultat, et en se basant sur les résultats obtenus par l'équipe (Raouane, Desmaele *et al.* 2011, Ali, Maksimenko *et al.* 2014, Urbinati, Ali *et al.* 2015), il semblerait que l'internalisation *in vitro* des NPs siRNA-SQ soit indépendante de la concentration du LDLR. L'hypothèse que nous avons émise est qu'une surexpression du LDLR permettrait d'attirer plus de LDL et par conséquent de NPs transportées par les LDL.

Dans ce but, les cellules BHP 10-3 et MSC80 ont été cultivées pendant 48h avec un milieu de culture pauvre en sérum (1% contre 10% dans les conditions normales de culture). Les protéines membranaires ont ensuite été extraites et l'expression du LDLR a été analysée par WB (Figure 48A et C). Nous observons une augmentation de **l'expression du LDLR de 3 et 4 fois dans les cellules BHP 10-3** (Figure 48A) **et MSC80** (Figure 48C) respectivement, en comparant aux conditions normales de culture (milieu contenant 10% FBS). Pour montrer l'effet de la surexpression du LDLR sur l'internalisation des NPs siRNA-SQ, nous les avons incubées pendant 30 min à 37°C avec 50 % de FBS ou de LDL (deux ratios massiques NPs siRNA-SQ : LDL 1:1 ou 1:8) et ajoutées sur les cellules. Après quatre heures d'incubation avec les cellules, le milieu a été remplacé par un milieu de culture complet et 48 heures plus tard, l'ARN total a été extrait et l'expression de l'ARNm de RET/PTC1 et PMP22 a été analysée par RT-qPCR. **L'augmentation de l'expression du LDLR et les pré-incubations des NPs siRNA-SQ dans 50 % de FBS ou avec les LDL n'ont pas aidé à internaliser le siRNA dans les cellules** car aucune différence significative d'inhibition de l'expression des gènes spécifiques aux siRNA n'a été observée en comparaison aux cellules non traitées (Figure 48B et D ; n=1). Ce résultat préliminaire suggère que les LDL seraient des cargos pour les NPs siRNA-SQ mais ne jouent pas un rôle important dans l'internalisation dans les cellules cibles.

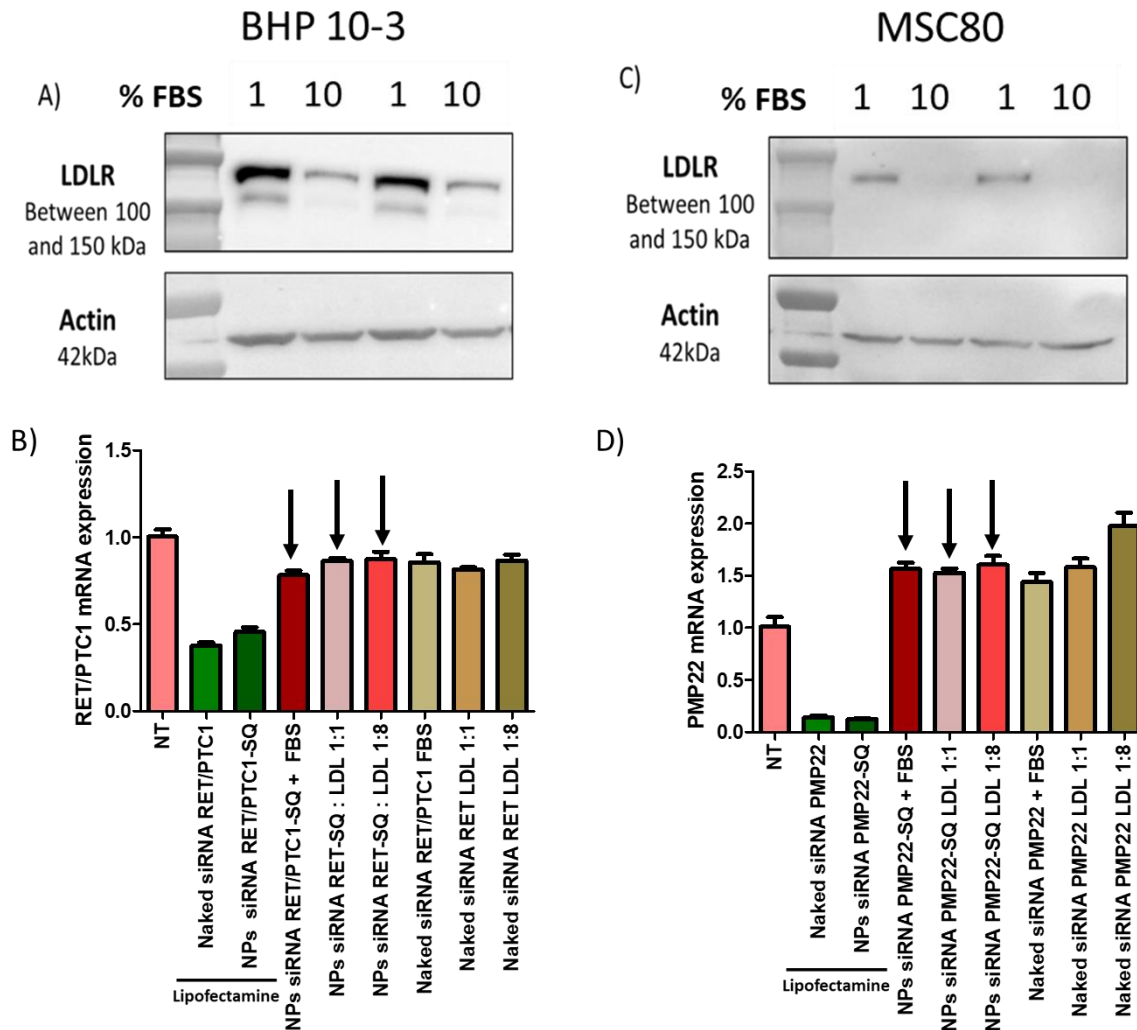


Figure 48 : Le sérum et les LDL ne favorisent pas l'internalisation cellulaire des NPs siRNA-SQ. Les cellules BHP 10-3 (A) ou MSC80 (C) ont étéensemencées pendant 48 heures avec un milieu de culture à 10 % de FBS ou à 1 % de FBS. L'expression protéique membranaire du LDLR a été évaluée par WB. Après un ensemencement en milieu de culture à 1% FBS pendant 48 heures, les cellules BHP 10-3 et MSC80 ont été traitées avec une concentration de 50 nM de NPs siRNA RET/PTC1-SQ (B) ou les NPs siRNA PMP22-SQ (D) préincubées dans du FBS ou avec des LDL. La lipofectamine 2000 a été utilisée pour transfecter les siRNA « nus » ou les NPs siRNA-SQ comme témoins positifs. La flèche noire désigne les conditions où les NPs siRNA-SQ sont pré-incubées avec le FBS ou les LDL (n=1 pour les deux lignées cellulaires).

L'ensemble des résultats obtenus montrent que seule la charge des NPs est importante pour leur internalisation *in vitro*. La disponibilité de la surface cellulaire aurait un rôle dans l'internalisation des NPs siRNA-SQ mais cela reste à vérifier. Quant aux LDL, ils joueraient uniquement un rôle dans le transport des NPs siRNA-SQ vers le tissu cible.

Discussion

La découverte des siRNA en 1998 par Fire et Mello a bouleversé le monde scientifique et pharmaceutique (Fire, Xu et al. 1998). Leur unique spécificité d'inhiber l'expression d'un gène cible en dégradant son ARNm rend cette molécule intéressante pour traiter des pathologies pour lesquelles aucune option thérapeutique n'est disponible. Le principal inconvénient empêchant une utilisation sûre et efficace en clinique est dû à sa nature oligonucléotidique. En effet, les siRNA sont des petits ARN double brins rapidement dégradés *in vivo* par les nucléases sériques et éliminés par filtration glomérulaire en raison de leur petite taille. De plus, leur nature polyanionique empêche une internalisation cellulaire optimale. Pour pallier ces inconvénients, le siRNA doit être protégé et encapsulé. La méthode choisie par l'équipe d'accueil est de le coupler à un lipide naturel précurseur du cholestérol, le SQ. Dès 2006, l'équipe du Pr Patrick Couvreur a utilisé la propriété de « se compacter » de ce triterpène pour le conjuguer à une petite molécule chimiothérapeutique, la gemcitabine, pour améliorer son efficacité antinéoplasique et diminuer sa toxicité (Couvreur, Stella et al. 2006).

Ce concept de « squalénisation » a donc été transposé aux siRNA, une macromolécule oligonucléotidique comparée à la petite molécule précédente (masse molaire < 1000 g/mol contre plus de 13 000 pour le bioconjugué siRNA-SQ, Tableau 14). La méthode de couplage initiale par une addition de Michaël a montré son efficacité *in vivo* par inhibition de la croissance tumorale corrélée à l'inhibition des produits du gène (ARNm et protéines) dans trois modèles pathologiques de cancers à OF : carcinome papillaire de la thyroïde (avec les OF RET/PTC1 et RET/PTC3) et cancer de la prostate (avec l'OF TMPRSS2-ERG). Néanmoins le processus d'obtention des NPs siRNA-SQ était long et laborieux avec un rendement final de 12% environ. Une nouvelle méthode de bioconjugaison a donc été développée. Il s'agit du couplage par chimie clic sans cuivre qui a permis d'augmenter le **rendement final jusqu'à 70%** (Massaad-Massade, Boutary et al. 2018). La vérification de la réaction de couplage par HPLC montre que le rendement de la réaction de **conjugaison du brin sens du siRNA** est **quasi-total**. Trois siRNA ont été conjugués au SQ par cette méthode et ont montré *in vivo* une efficacité thérapeutique dans l'inhibition de l'expression du gène ciblé. Cependant, *in vitro*, les NPs siRNA-SQ obtenues *via* les deux méthodes de couplage ne sont pas internalisées ; *i.e.* aucune inhibition du gène cible n'a été observée.

Cette étude se situe à la suite de ces travaux. Elle a consisté à : 1) caractériser les NPs siRNA-SQ après optimisation de la méthode de nanopréciptation et à définir leur structure interne, 2) étudier les interactions avec les protéines sériques et 3) déterminer comment les NPs siRNA-SQ sont internalisées pour comprendre les différences d'efficacité observées entre les études *in vitro* et *in vivo*.

Tableau 14 : Comparaison des paramètres physico-chimiques des nanoformulations squalénisées

Bioconjugués	Masse molaire approximative (g/mol)	Diamètre (nm)	PDI	Potentiel ζ (mV)	Références
Ad-SQ	678	71	0,08	-	Rouquette et al., 2019
CisPt-SQ	712	128	< 0,2	-	Kotelevets et al., 2017
Gem-SQ	674	133	0,12	- 15,1	Maksimenko et al., 2015
Anti-VIH ddi-SQ	647	217	0,220	-	Hillaireau et al., 2013
Anti-VIH ddC-SQ	622	204	0,020	-	
siRNA RET/PTC1-SQ	13 411	170	0,2	- 25	Raouane et al., 2011
siRNA RET/PTC3-SQ	13 411	230	0,2	- 27	Ali et al., 2014
siRNA TMPRSS2-ERG-SQ	13 411	244	0,23	- 48	Massade et al., 2018
siRNA PMP22-SQ	13 411	180	< 0,2	- 48	Boutary et al., soumis

La première partie de ce projet a été d'optimiser la dernière étape menant à la formation des NPs : la nanopréciptation. Il s'agit d'une méthode de déplacement de solvant qui va permettre la formation de particules de taille homogène (Fessi, Puisieux et al. , Fessi, Devissaguet et al. 1992, Lepeltier, Bourgaux et al. 2014). Ainsi la molécule d'intérêt (généralement hydrophobe) est reprise dans un solvant organique polaire et ajouté à un large volume d'un autre solvant, aqueux le plus souvent où le premier solvant est miscible. L'eau est un « non-solvant » pour la molécule hydrophobe, ce qui entraîne une séparation des phases et la formation des NPs. Cela est notamment le protocole suivi pour former les NPs petites molécules-SQ dont les paramètres physico-chimiques sont présentés dans le tableau 14 (Hillaireau, Dereuddre-Bosquet et al. 2013, Maksimenko, Dosio et al. 2014,

Kotelevets, Chastre et al. 2017, Rouquette, Ser-Le Roux et al. 2019). Dans le cadre des NPs siRNA-SQ couplés par chimie clic sans cuivre, cette méthode a été transposée et testée avec différents solvants organiques. Dans un premier temps, le bioconjugué siRNA-SQ lyophilisé a donc été repris avec différentes proportions d'éthanol (le bioconjugué n'étant pas soluble dans 100% éthanol) avec ou sans tétrahydrofurane mais cela n'a pas permis d'obtenir des NPs d'une taille homogène injectable et reproductible. Ainsi une autre méthode a été testée. Il s'agit de la nanoprécipitation inverse proposée par Bilati *et al.*, pour les molécules hydrophiles (Bilati, Allémann et al. 2005). En effet, le rapport des poids moléculaires entre le siRNA et le squalène (~ 13 000 Da pour le siRNA /~ 494 Da pour le SQ) est déséquilibré par rapport aux autres NPs squalénisées et est en faveur de la partie hydrophile du siRNA. Le bioconjugué siRNA-SQ a donc été repris dans l'eau et ajouté à un solvant organique, l'acétone. Cette inversion dans l'addition des solvants a permis de former des **NPs siRNA-SQ** avec **une taille ~ 200 nm** et un **potentiel ζ de -35 mV** favorisant la présence de répulsions électrostatiques entre les NPs et empêchant ainsi leur agrégation. **Ces caractéristiques physico-chimiques sont compatibles avec une administration intraveineuse sûre dans la microcirculation vasculaire. Elles sont similaires entre toutes les formulations testées.**

L'ensemble de la synthèse comporte des étapes avec des solvants organiques pouvant altérer la conformation en double-hélice du siRNA. L'étude par dichroïsme circulaire du siRNA contenu dans les NPs en comparaison au siRNA « nu » permet de se rassurer du contraire, les pics caractéristiques du siRNA ayant été retrouvés et les spectres se superposant. Ceci signifie que **les brins du siRNA sont fonctionnels** et est en accord avec les études d'efficacité *in vitro* où la transfection des NPs siRNA-SQ permet d'inhiber l'expression des gènes cibles de façon similaire aux siRNA « nus » transfectés (Raouane, Desmaele et al. 2011, Ali, Maksimenko et al. 2014, Massaad-Massade, Boutary et al. 2018). En collaboration avec l'équipe LIONS du CEA, la structure interne des NPs siRNA-SQ a été déterminée. Deux techniques physiques ont été utilisées dans ce but : la diffusion aux petits angles des neutrons (SANS) et des rayons X (SAXS). Ces deux méthodes physiques permettent de caractériser les suspensions colloïdales nanométriques. Elles ont déjà été utilisées pour caractériser les formulations squalénisées, notamment adénosine-SQ (Ad-SQ) mais c'est la première fois que ces outils de haute technologie ont été adoptés pour notre formulation de siRNA conjugué au SQ (Rouquette, Ser-Le Roux et al. 2019, Gobeaux, Bizeau et al. 2020). L'utilisation concomitante de ces deux techniques aux sensibilités différentes permet de visualiser les différentes parties internes des NPs siRNA-SQ. En effet, le SANS étant plus sensible à la fraction SQ, permet d'obtenir la structure globale d'une nanoparticule. *A contrario*, le SAXS est sensible aux contrastes électroniques de l'échantillon et permet de visualiser le siRNA. Sa présence est notamment retrouvée au niveau des deux oscillations aux moyens et grands

angles, respectivement dans des petites sphères homogènes (diamètre 10 nm et PDI 0,15) enrichies en cette molécule oligonucléotidique et sous sa forme originelle cylindrique de longueur 4 nm et diamètre 2,2 nm. Ainsi, la nanoparticule siRNA-SQ peut être représentée comme une **grande sphère de 120 nm de diamètre (PDI 0,25) comprenant à l'intérieur des petites sphères composées des BC siRNA-SQ.**

Lors d'une injection dans l'organisme, des protéines vont s'adsorber de façon instantanée à la surface des NPs. Ce qui est communément appelé « couronne de protéines » ou « protein corona » en anglais, va définir une nouvelle identité pour les NPs : leur identité biologique (Cedervall, Lynch et al. 2007). En présence d'une quantité croissante de sérum, la charge négative des NPs siRNA-SQ est « neutralisée » et un retard à la migration apparaît après migration sur gel d'agarose. Ces premiers résultats confirment la **présence d'interaction avec des éléments sériques**. L'aptitude des NPs siRNA-SQ à protéger le siRNA de la dégradation par les nucléases a été également été déterminée. Ce test nous a permis de constater que **le siRNA se trouve toujours sous sa forme intacte après plusieurs heures d'incubation en présence de 50% de sérum**, quantité moyenne physiologique.

En plus de déterminer la structure globale des NPs, la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) permet aussi d'étudier le comportement des molécules dans un mélange complexe. **Dans le FBS ou en présence d'une forte concentration de BSA (13 mg/mL), les NPs siRNA-SQ restent stables.** En effet, aucune différence n'a été observée aux petits angles dans les spectres des NPs siRNA-SQ en présence de FBS et de la BSA. Seulement 13% du signal des NPs a « disparu » dans le FBS et une valeur similaire a été retrouvée en présence de BSA. En comparaison, les profils des NPs Ad-SQ ont montré une forte diminution avec une disparition de près de 50% et 35% du signal en présence de FBS ou de BSA respectivement, indiquant une importante diminution en fraction volumique et un désassemblage de ces NPs en présence de ces deux éléments (Gobeaux, Bizeau et al. 2020). Le comportement des NPs siRNA-SQ semble donc différer des NPs Ad-SQ. De plus comme observé par l'étude des spectres SANS, le sérum et l'albumine ne vont pas entraîner de changement de la distribution en taille des NPs siRNA-SQ, il n'y a donc pas d'extraction de bioconjugués siRNA-SQ vers le sérum et son composant l'albumine. Il est difficile de déduire de ces expériences de la formation d'une couronne de protéines sériques autour des NPs. Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : peut-être que les NPs siRNA-SQ sont trop « lourdes » pour que leur signal soit facilement visualisable sur le spectre ou que la cinétique est plus longue, même si les expériences ultérieures (spectroscopie de fluorescence notamment) semblent prouver le contraire. Enfin, si on compare les paramètres physico-chimiques des NPs siRNA-SQ et ceux des NPs Ad-SQ, nous remarquons que les

NPs que nous développons ont une taille plus importante que les NPs Ad-SQ (tableau 14), elles seraient potentiellement moins nombreuses en solution et il est donc plus difficile de voir un effet (Rouquette, Ser-Le Roux et al. 2019). Cette hypothèse semble se confirmer avec le calcul du nombre de bioconjugués présents dans une nanoparticule. En effet, il est estimé à **environ 59 000 bioconjugués siRNA-SQ/nanoparticule**, ce nombre paraît important mais il explique probablement pourquoi lors des observations au cryoTEM et au SANS, nous voyons peu de NPs alors que la concentration massique en siRNA (dosage spectrophotométrique au Nanodrop®) est optimale pour ces techniques.

Le sérum contient plusieurs milliers de protéines mais les protéines majoritaires qui vont interagir avec les nanomatériaux, sont généralement les plus abondantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux interactions des NPs siRNA-SQ avec deux protéines sériques : l'albumine et les LDL.

La protéine la plus abondante du sérum, l'albumine, a notamment pour rôle de transporter des ligands endogènes et exogènes dans la circulation sanguine et s'accumule préférentiellement dans les tissus inflammés comme les tumeurs (Hoogenboezem and Duvall 2018). En effet, grâce à une angiogenèse incontrôlée et une forte réaction inflammatoire, des capillaires autour des tumeurs présentent une perméation augmentée. De plus, le drainage lymphatique est non fonctionnel. Cet effet EPR (enhanced permeability and retention effect) permet l'accumulation passive de NPs d'une taille > 100 nm (Ozpolat, Sood et al. 2014, Tatiparti, Sau et al. 2017). Ainsi, la conjugaison d'un siRNA à un lipide permet son interaction *in vivo* avec l'albumine, ce qui augmente significativement sa demi-vie plasmatique et est corrélée avec une meilleure accumulation tumorale, une efficacité antinéoplasique supérieure à une formulation polymérique et une non-toxicité (Sarett, Werfel et al. 2017). Les neuropathies héréditaires sont généralement associées à des modifications au niveau des fibres nerveuses. Ainsi, dans certains cas de CMT ont été décrits des changements histologiques synonymes d'inflammation comme l'œdème et les infiltrats lymphocytaires (Weis, Claeys et al. 2017). L'étude de l'interaction des NPs siRNA-SQ avec l'albumine a été réalisée à l'aide de différentes techniques analytiques. **Toutes montrent une interaction entre ces deux molécules.** Tout d'abord par électrophorèse d'agarose où comme précédemment avec le FBS, un retard à la migration des NPs siRNA-SQ est observé après incubation avec des quantités croissantes de BSA. Une première étude par dichroïsme circulaire semble indiquer que cette interaction entraîne un changement de conformation de la BSA, ce qui pourrait entraîner une modification de sa fonctionnalité (Belatik, Hotchandani et al. 2012, Fleischer and Payne 2014). La spectroscopie de fluorescence permet par deux approches différentes de confirmer la **formation d'un complexe NPs siRNA-SQ – BSA**. La calorimétrie isotherme est la seule technique expérimentale qui permet la détermination de la thermodynamique de l'interaction

(BRUYLANTS and BARTIK). Les valeurs déterminées suggèrent une interaction spontanée exothermique avec une stœchiométrie égale à celle retrouvée par l'étude du « quenching » de la fluorescence et égale à 1 environ.

Les lipoprotéines (LPs) sont le troisième groupe de protéines les plus abondantes dans le sang. De nombreuses molécules actives comme des anti-cancéreux de la classe 2 de la classification BDDCS (Biopharmaceutical Drug Disposition and Classification System) interagissent avec les LPs, ce qui permet leur accumulation au niveau des cellules tumorales (Chaudhary, Bower et al. 2019). Récemment, il a été montré que les NPs gemcitabine-SQ interagissaient avec les LDL et HDL, ce qui permettaient leur accumulation « passive » dans le tissu tumorale et l'internalisation par le LDLR (Sobot, Mura et al. 2017, Sobot, Mura et al. 2017). L'agence du médicament américaine, la FDA, demande également depuis 2002 à ce que tout nouveau candidat-médicament lipophile fasse l'objet d'une étude de son interaction avec les LPs (Wasan, Brocks et al. 2008). Ces dernières ont pour rôle principal de transporter le cholestérol, élément essentiel des membranes cellulaires et de la myéline. En effet, cette dernière est principalement constituée à 70% de lipides dont 26% de cholestérol, qui est essentiel pour son développement et son maintien (Zhou, Bazick et al. 2019). Au cours de la thèse du Dr Suzan Boutary, des images de TEM après traitement par les NPs siRNA-SQ de souris pathologiques CMT1A ont montré la présence de vésicules à l'intérieur des cellules de Schwann et dans l'axone. L'une des hypothèses émise par l'équipe est que ces vésicules seraient les NPs siRNA-SQ qui ont été transportées par les LDL jusqu'au nerf périphérique puis internalisées (Boutary 2019). En effet, les LDL sont le principal transporteur du cholestérol dans le sang et une de ses apolipoprotéines, l'apoE, a un rôle important dans la remyélinisation du SNP (Li, Fowler et al. 2010, Zhou and Notterpek 2016). Par le biais de différentes techniques, nos résultats montrent que **les NPs siRNA-SQ interagissent avec les LDL et forment même un complexe.**

Au vu des résultats obtenus, le schéma suivant semble se profiler. Ainsi lors de leur injection intraveineuse, les NPs siRNA-SQ interagissent instantanément avec les deux composantes principales du sérum, l'albumine et les lipoprotéines, servant probablement de transporteurs et permettant leur accumulation dans les tissus cibles : tumeur et nerf périphérique. La formation de ces complexes s'effectue par liaison du SQ avec l'albumine et les LDL.

L'un des derniers obstacles avant l'action inhibitrice du siRNA est son internalisation à l'intérieur des cellules cibles. Depuis le développement des nanoformulations siRNA-SQ, nous observons une efficacité thérapeutique prouvée par l'inhibition ou la normalisation de l'expression du gène ciblé dans les modèles de cancers à OF ou neuropathie périphérique

respectivement. Néanmoins, ces NPs ne pénètrent pas *in vitro* sans utiliser un agent transfectant, la Lipofectamine®, disponible chez Invitrogen. Ce liposome cationique est composé de deux types de lipides : un cationique le DOSPA qui va permettre l'attraction avec la membrane plasmique négative et un autre fusogénique le DOPE permettant un échappement optimal de l'endosome (Forest, Cottier et al. 2015, Xia, Tian et al. 2016, Forest and Pourchez 2017, Vocelle, Chan et al. 2020). Nous avons voulu comprendre cette différence d'activité thérapeutique en développant trois hypothèses.

La première concerne la charge des NPs siRNA-SQ, anionique comme la membrane plasmique ce qui entraîne probablement une répulsion électrostatique et empêche leur internalisation. Nous avons voulu comprendre ce rôle de la charge en utilisant un SQ cationique qui va interagir par interactions électrostatiques avec les NPs mais dont on ne connaît pas ni la fusogénicité ou le mode d'internalisation. L'inversion de charge des NPs siRNA RET/PTC1-SQ après ajout du SQ⁺ permet leur internalisation dans les cellules BHP 10-3 comme prouvé par l'inhibition du gène cible. Cette expérience doit être répétée pour la lignée de cellules de Schwann murine, MSC80, mais le résultat préliminaire est le même. **La charge négative semble être l'une des principales causes de la non-internalisation des NPs siRNA-SQ *in vitro*.**

In vivo, les NPs siRNA-SQ sont en contact avec les tissus et cellules en trois dimensions contrairement aux expériences *in vitro*, où la culture se passe en deux dimensions et par conséquent la disponibilité de la surface cellulaire est diminuée. La transfection inverse est une méthode qui permet de transfecter les molécules sur des cellules trypsinisées. Leur surface cellulaire est ainsi plus disponible par élimination partielle des protéines de surface et le fait que les cellules ne soient pas encoreensemencées et confluentes (Amarzguioui 2004). Ce mode de transfection a permis d'obtenir une inhibition significative de l'expression de l'OF RET/PTC1 après 48h de transfection des cellules BHP 10-3, pas d'effet significatif n'a été observé pour la lignée MSC80. La disponibilité cellulaire semble donc avoir son importance dans la capture cellulaire des NPs siRNA-SQ mais n'explique pas totalement les différences observées entre les études *in vitro* et *in vivo*.

A la suite des résultats précédents et ceux obtenus par Sobot *et al.*, nous avons émis comme dernière hypothèse que la non-internalisation des NPs siRNA-SQ *in vitro* était due à une différence de profil d'expression protéique du LDLR impliqué dans l'internalisation des NPs gemcitabine-SQ et à un changement d'identité des NPs siRNA-SQ après injection intraveineuse (Sobot, Mura et al. 2017). Le LDLR est plus fortement exprimé par les lignées cellulaires tumorigènes chez la souris, ce qui s'explique par le besoin en cholestérol de ces cellules pour proliférer (Yameen, Choi et al. 2014). Nous savons déjà que cette expression

basale n'est pas suffisante pour internaliser les NPs sans utiliser un transfectant cationique. Nous avons donc décidé d'augmenter son expression en cultivant les cellules dans un milieu de culture pauvre en sérum puis de les transfecter avec les NPs siRNA-SQ pré-incubées avec le FBS et les LDL. Cette étape de pré-incubation a pour objectif d'établir les interactions définies auparavant et qui se produisent probablement instantanément *in vivo*. Cela n'a malheureusement pas été suffisant pour internaliser les NPs siRNA-SQ et observer une inhibition de l'expression des gènes cibles RET/PTC1 et PMP22. Cette expérience doit être répétée néanmoins plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat préliminaire. Tout d'abord il existe peut-être un problème de compatibilité entre le sérum d'origine bovine et les LDL provenant de plasmas humains avec le LDLR ou autre récepteur des cellules BHP 10-3 humaines et MSC80 murines. L'ensemencement et la culture préalable dans un milieu pauvre en sérum a peut-être un effet sur l'expression des produits du gène ciblé, l'OF RET/PTC1 et la glycoprotéine PMP22, ce qui pourrait expliquer l'absence d'efficacité. Une autre hypothèse est l'absence ou la faible expression d'un « second » récepteur impliqué dans l'internalisation des siRNA. Wolfrum et ses collègues ont développé en 2007 un siRNA conjugué au cholestérol et ont montré que son internalisation par les cellules dépendait à la fois du LDLR et d'une protéine transmembranaire, Sid1 (systemic RNAi deficient-1) (Wolfrum, Shi et al. 2007). Cette protéine agirait comme un canal permettant le passage intracellulaire des ARN double brins (Duxbury, Ashley et al. 2005, Li, Koutmou et al. 2015). Ainsi la capture des NPs siRNA-SQ pourrait se faire en deux temps : 1) liaison au LDLR *via* les LDL ou liaison à un autre récepteur et 2) transport intracellulaire *via* Sid1.

La figure ci-après représente de façon schématique l'ensemble des résultats obtenus. Tout d'abord, l'ajout du BC siRNA-SQ contenu dans l'eau à l'acétone (la nanoprécipitation inverse numérotée 1 sur la figure 49) a permis d'obtenir de façon reproductible des NPs siRNA-SQ (2) de forme sphérique et d'une taille de 200 nm environ. Ces NPs se composent de petites sphères comprenant 34 BC siRNA-SQ. Lors de leur administration intraveineuse, les NPs vont interagir avec les protéines majoritaires du sérum (3) ce qui permet leur extravasation et accumulation dans les tissus cibles : la tumeur et le nerf périphérique. Ces interactions « neutralisent » également les charges négatives des NPs siRNA-SQ, ce qui limite les répulsions électrostatiques avec la membrane plasmique et favorise probablement leur internalisation par le biais d'un récepteur (LDLR ou autre) (4). Une fois internalisé, nous savons que le siRNA est libéré dans le cytoplasme et inhibe l'expression du gène cible RET/PTC1 dans les cancers à OF permettant d'inhiber la croissance tumorale, ou normalise l'expression de PMP22 amenant à l'amélioration de l'activité motrice dans un modèle pathologique de CMT1A.

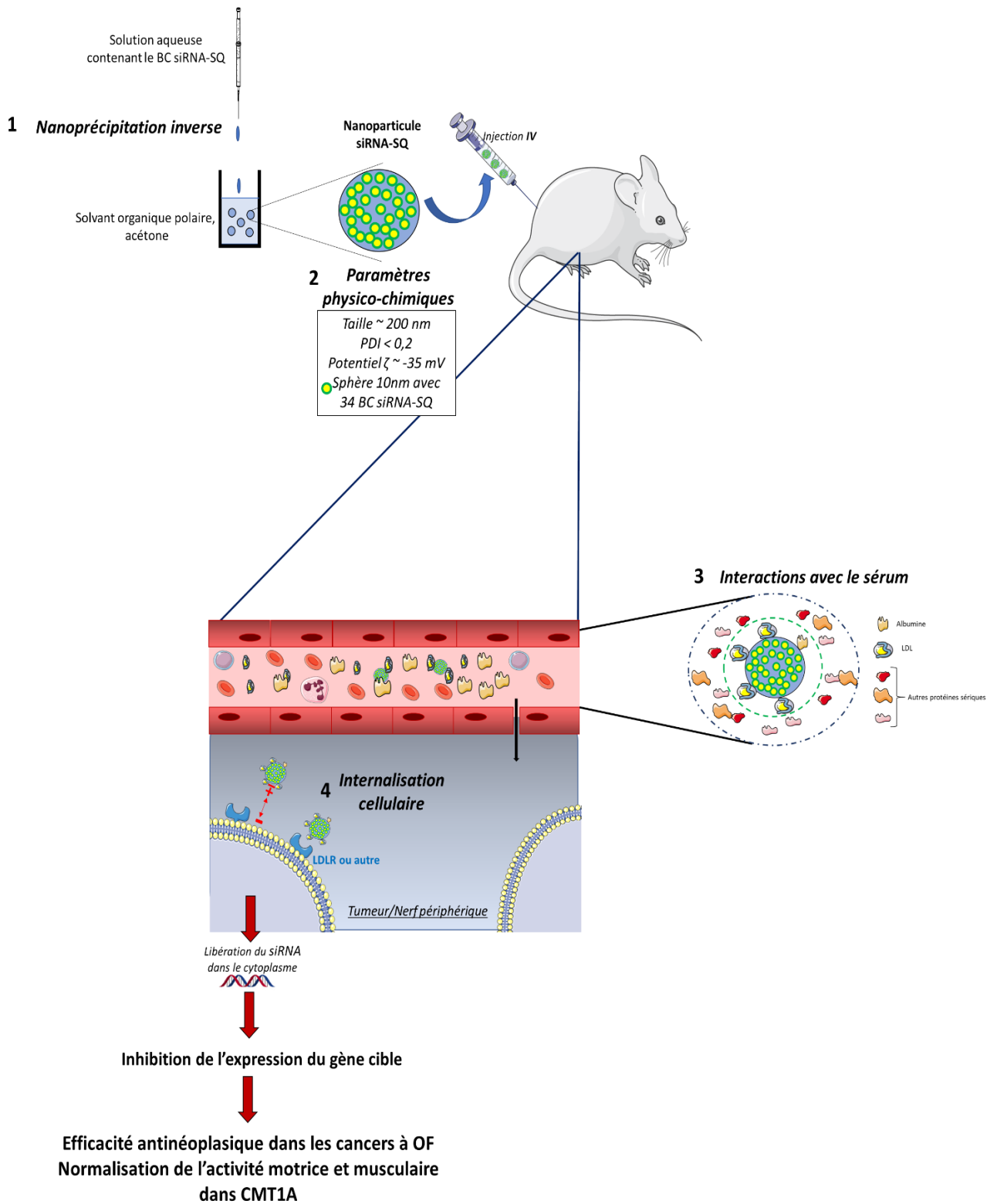


Figure 49 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des travaux de la thèse

Conclusion générale et perspectives

En conclusion cette thèse a permis de comprendre l'efficacité observée des formulations de siRNA-SQ dans plusieurs modèles pathologiques. Nous avons déterminé les caractéristiques physico-chimiques de la nanoformulation siRNA-SQ en solution aqueuse. Les NPs ont une taille homogène et reproductible ~ 200 nm avec un potentiel ζ ~ -35 mV, permettant une administration intraveineuse sûre *in vivo*. Dans la circulation sanguine, les NPs vont interagir avec l'albumine et les lipoprotéines, notamment les LDL, ce qui permet de neutraliser leurs charges négatives et de les transporter jusqu'au tissu cible. L'accumulation dans les tumeurs et nerfs périphériques se fait de façon passive grâce à ses interactions, aux besoins nutritionnels des cellules et au niveau inflammatoire induit par les pathologies traitées : cancer à oncogène de fusion et maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A. La neutralisation de la nature anionique des NPs siRNA-SQ par les protéines sériques aide probablement à leur internalisation en facilitant l'attraction vers la membrane plasmique des cellules cibles (cellules tumorales et cellules de Schwann).

Depuis 2010, l'ensemble des travaux de l'équipe d'accueil a ouvert de nombreuses perspectives positives quant à l'utilisation thérapeutique des nanoparticules siRNA-SQ pour les patients atteints de cancer à oncogène de fusion et récemment pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A. **Nos objectifs à court terme sont de compléter le développement préclinique de ces NPs siRNA-SQ en réalisant les études de biodistribution et de toxicité.** En cas de succès, ceci ouvrira les portes pour les études réglementaires de toxicité préclinique et plus tard pour les études cliniques. Ce projet est soutenu par un financement de la SATT Paris Saclay dans le cadre de « projet de maturation ».

Références numériques

¹ <https://www.genengnews.com/news/after-18-deaths-in-phase-iii-alnylam-halts-revusiran-development/>, visualisé le 28/11/19

² <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/FIBRINOGENE.pdf>, visualisé le 28/09/20

³ <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/videos/smis-la-spectroscopie-infrarouge-transformee-de-fourier>, visualisé le 28/09/20

⁴ <https://www.lise.upmc.fr/Raman>, visualisé le 28/09/20

⁵ <http://www.afmb.univ-mrs.fr/resonance-plasmonique-de-surface>, visualisé le 28/09/20

Références bibliographiques

- Abu Lila, A. S. and T. Ishida (2019). "Anti-PEG IgM Production via a PEGylated Nanocarrier System for Nucleic Acid Delivery." *Methods Mol Biol* **1943**: 333-346.
- Adams, D., A. Gonzalez-Duarte, W. D. O'Riordan, C. C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, I. Tournev, H. H. Schmidt, T. Coelho, J. L. Berk, K. P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Plante-Bordeneuve, M. M. Mezei, J. M. Campistol, J. Buades, T. H. Brannagan, 3rd, B. J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P. N. Hawkins, S. D. Solomon, M. Polydefkis, P. J. Dyck, P. J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A. L. Strahs, S. V. Nochur, M. T. Sweetser, P. P. Garg, A. K. Vaishnav, J. A. Gollob and O. B. Suhr (2018). "Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis." *N Engl J Med* **379**(1): 11-21.
- Akinc, A., W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, K. G. Rajeev, W. L. Cantley, J. R. Dorkin, J. S. Butler, L. Qin, T. Racie, A. Sprague, E. Fava, A. Zeigerer, M. J. Hope, M. Zerial, D. W. Sah, K. Fitzgerald, M. A. Tracy, M. Manoharan, V. Kotliansky, A. Fougerolles and M. A. Maier (2010). "Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms." *Mol Ther* **18**(7): 1357-1364.
- Alhaddad, A., C. Durieu, G. Dantelle, E. Le Cam, C. Malvy, F. Treussart and J. R. Bertrand (2012). "Influence of the internalization pathway on the efficacy of siRNA delivery by cationic fluorescent nanodiamonds in the Ewing sarcoma cell model." *PLoS One* **7**(12): e52207.
- Ali, H. M., A. Maksimenko, G. Urbinati, H. Chapuis, M. Raouane, D. Desmaele, H. Yasuhiro, H. Harashima, P. Couvreur and L. Massaad-Massade (2014). "Effects of silencing the RET/PTC1 oncogene in papillary thyroid carcinoma by siRNA-squalene nanoparticles with and without fusogenic companion GALA-cholesterol." *Thyroid* **24**(2): 327-338.
- Ali, H. M., G. Urbinati, H. Chapuis, D. Desmaele, J. R. Bertrand, P. Couvreur and L. Massaad-Massade (2014). "Effects of siRNA on RET/PTC3 junction oncogene in papillary thyroid carcinoma: from molecular and cellular studies to preclinical investigations." *PLoS One* **9**(4): e95964.
- Amarzguioui, M. (2004). "Improved siRNA-mediated silencing in refractory adherent cell lines by detachment and transfection in suspension." *Biotechniques* **36**(5): 766-768, 770.
- Ang, J. C., J.-M. Lin, P. N. Yaron and J. W. White (2010). "Protein trapping of silica nanoparticles." *Soft Matter* **6**(2): 383-390.
- Antimisiaris, S., S. Mourtas and K. Papadia (2017). "Targeted si-RNA with liposomes and exosomes (extracellular vesicles): How to unlock the potential." *Int J Pharm* **525**(2): 293-312.
- Azhdarzadeh, M., A. A. Saei, S. Sharifi, M. J. Hajipour, A. M. Alkilany, M. Sharifzadeh, F. Ramazani, S. Laurent, A. Mashaghi and M. Mahmoudi (2015). "Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology." *Nanomedicine (Lond)* **10**(18): 2931-2952.
- Barenholz, Y. (2012). "Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned." *J Control Release* **160**(2): 117-134.
- Barros, S. A. and J. A. Gollob (2012). "Safety profile of RNAi nanomedicines." *Adv Drug Deliv Rev* **64**(15): 1730-1737.
- Bartlett, D. W. and M. E. Davis (2008). "Impact of tumor-specific targeting and dosing schedule on tumor growth inhibition after intravenous administration of siRNA-containing nanoparticles." *Biotechnol Bioeng* **99**(4): 975-985.
- Behzadi, S., V. Serpooshan, R. Sakhtianchi, B. Müller, K. Landfester, D. Crespy and M. Mahmoudi (2014). "Protein corona change the drug release profile of nanocarriers: the "overlooked" factor at the nanobio interface." *Colloids Surf B Biointerfaces* **123**: 143-149.
- Belatik, A., S. Hotchandani, J. Bariyanga and H. Tajmir-Riahi (2012). "Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins." *European journal of medicinal chemistry* **48**: 114-123.
- Bellocq, N. C., S. H. Pun, G. S. Jensen and M. E. Davis (2003). "Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery." *Bioconjugate Chemistry* **14**(6): 1122-1132.

Bertrand, J. R., C. Lucas, N. M. Pham, C. Durieu, P. Couvreur, C. P. Malvy and D. Desmaele (2015). "Turning Squalene into Cationic Lipid Allows a Delivery of siRNA in Cultured Cells." Nucleic Acid Ther **25**(3): 121-129.

Bilati, U., E. Allémann and E. Doelker (2005). "Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles." Eur J Pharm Sci **24**(1): 67-75.

Boutary, S. (2019). Development of a Targeted Therapy for Charcot Marie Tooth 1A (CMT1A) Neuropathy Based on siRNA PMP22 Squalene Nanoparticles, Université Paris-Saclay (ComUE).

Boutary, S., A. Echaniz-Laguna, D. Adams, J. Loisel-Duwattez, M. Schumacher, C. Massaad and L. Massaad-Massade (2020). "Treating PMP22 gene duplication-related Charcot-Marie-Tooth disease: the past, the present and the future." Transl Res.

Bruniaux, J. (2014). Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de courtes séquences d'ARN interférents.

BRUYLANTS, G. and K. BARTIK "Utilisation de la Calorimétrie à Titration Isotherme pour l'étude des interactions entre (bio) molécules."

Bumcrot, D., M. Manoharan, V. Koteliansky and D. W. Sah (2006). "RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs." Nat Chem Biol **2**(12): 711-719.

Butler, J. S., A. Chan, S. Costelha, S. Fishman, J. L. Willoughby, T. D. Borland, S. Milstein, D. J. Foster, P. Goncalves, Q. Chen, J. Qin, B. R. Bettencourt, D. W. Sah, R. Alvarez, K. G. Rajeev, M. Manoharan, K. Fitzgerald, R. E. Meyers, S. V. Nochur, M. J. Saraiva and T. S. Zimmermann (2016). "Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis." Amyloid **23**(2): 109-118.

Cai, R. and C. Chen (2019). "The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine." Adv Mater **31**(45): e1805740.

Carvalho, P. M., M. R. Felício, N. C. Santos, S. Gonçalves and M. M. Domingues (2018). "Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development." Front Chem **6**: 237.

Cecchelli, R., V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M. P. Dehouck and L. Fenart (2007). "Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **6**(8): 650-661.

Cedervall, T., I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse (2007). "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2050-2055.

Charbonnier, C. a. (2010). Biologie cellulaire et moléculaire de la cellule eucaryote.

Chaudhary, J., J. Bower and I. R. Corbin (2019). "Lipoprotein Drug Delivery Vehicles for Cancer: Rationale and Reason." Int J Mol Sci **20**(24).

Cheng, X. and R. J. Lee (2016). "The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery." Adv Drug Deliv Rev **99**(Pt A): 129-137.

Chetwynd, A. J., E. J. Guggenheim, S. M. Briffa, J. A. Thorn, I. Lynch and E. Valsami-Jones (2018). "Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona." Nanomaterials (Basel) **8**(2).

Cho, I. S., J. Kim, D. H. Lim, H.-C. Ahn, H. Kim, K.-B. Lee and Y. S. Lee (2008). "Improved serum stability and biophysical properties of siRNAs following chemical modifications." Biotechnology Letters **30**(11): 1901.

Chumakov, I., A. Milet, N. Cholet, G. Primas, A. Boucard, Y. Pereira, E. Gaudens, J. Mandel, J. Laffaire, J. Fouquier, F. Glibert, V. Bertrand, K. A. Nave, M. W. Sereda, E. Vial, M. Guedj, R. Hajj, S. Nabirotkin and D. Cohen (2014). "Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy." Orphanet J Rare Dis **9**: 201.

Coelho, T., D. Adams, A. Silva, P. Lozeron, P. N. Hawkins, T. Mant, J. Perez, J. Chiesa, S. Warrington, E. Tranter, M. Munisamy, R. Falzone, J. Harrop, J. Cehelsky, B. R. Bettencourt, M. Geissler, J. S. Butler, A. Sehgal, R. E. Meyers, Q. Chen, T. Borland, R. M. Hutabarat, V. A. Clausen, R. Alvarez, K. Fitzgerald, C. Gamba-Vitalo, S. V. Nochur, A. K. Vaishnav, D. W. Sah, J. A. Gollob and O. B. Suhr (2013). "Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis." N Engl J Med **369**(9): 819-829.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." *Nature* **422**(6927): 37-44.

Copolovici, D. M., K. Langel, E. Eriste and U. Langel (2014). "Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications." *ACS nano* **8**(3): 1972-1994.

Couvreur, P., L. H. Reddy, S. Mangenot, J. H. Poupaert, D. Desmaele, S. Lepetre-Mouelhi, B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch and M. Ollivon (2008). "Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue." *Small* **4**(2): 247-253.

Couvreur, P., B. Stella, L. H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepêtre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J.-M. Renoir and L. Cattel (2006). "Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics." *Nano Letters* **6**(11): 2544-2548.

Couvreur, P., B. Stella, L. H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaele, S. Lepetre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J. M. Renoir and L. Cattel (2006). "Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics." *Nano Lett* **6**(11): 2544-2548.

Cukalevski, R., S. A. Ferreira, C. J. Dunning, T. Berggård and T. Cedervall (2015). "IgG and fibrinogen driven nanoparticle aggregation." *Nano Research* **8**(8): 2733-2743.

Davalos, D. and K. Akassoglou (2012). "Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease." *Semin Immunopathol* **34**(1): 43-62.

David, S., B. Pitard, J. P. Benoit and C. Passirani (2010). "Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery." *Pharmacol Res* **62**(2): 100-114.

Davidson, B. L. and P. B. McCray (2011). "Current prospects for RNA interference-based therapies." *Nature Reviews Genetics* **12**(5): 329-340.

Davis, M. E. (2009). "The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic." *Mol Pharm* **6**(3): 659-668.

Davis, M. E., Z. G. Chen and D. M. Shin (2008). "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." *Nat Rev Drug Discov* **7**(9): 771-782.

Davis, M. E., S. H. Pun, N. C. Bellocq, T. M. Reineke, S. R. Popielarski, S. Mishra and J. D. Heidel (2004). "Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers." *Curr Med Chem* **11**(2): 179-197.

Davis, M. E., J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas (2010). "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles." *Nature* **464**(7291): 1067-1070.

Del Giudice, G., E. Fracapane, R. Bugarini, M. Hora, T. Henriksson, E. Palla, D. O'Hagan, J. Donnelly, R. Rappuoli and A. Podda (2006). "Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene." *Clin Vaccine Immunol* **13**(9): 1010-1013.

Del Giudice, G., R. Rappuoli and A. M. Didierlaurent (2018). "Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines." *Semin Immunol* **39**: 14-21.

Delattre, O., J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau and et al. (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." *Nature* **359**(6391): 162-165.

Deng, Y., C. C. Wang, K. W. Choy, Q. Du, J. Chen, Q. Wang, L. Li, T. K. Chung and T. Tang (2014). "Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies." *Gene* **538**(2): 217-227.

Deng, Z. J., M. Liang, M. Monteiro, I. Toth and R. F. Minchin (2011). "Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation." *Nat Nanotechnol* **6**(1): 39-44.

Desmaele, D., R. Gref and P. Couvreur (2012). "Squalenoylation: a generic platform for nanoparticulate drug delivery." *J Control Release* **161**(2): 609-618.

Docter, D., C. Bantz, D. Westmeier, H. J. Galla, Q. Wang, J. C. Kirkpatrick, P. Nielsen, M. Maskos and R. H. Stauber (2014). "The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles." *Beilstein J Nanotechnol* **5**: 1380-1392.

Docter, D., S. Strieth, D. Westmeier, O. Hayden, M. Gao, S. K. Knauer and R. H. Stauber (2015). "No king without a crown--impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine." Nanomedicine (Lond) **10**(3): 503-519.

Donahue, N. D., H. Acar and S. Wilhelm (2019). "Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine." Adv Drug Deliv Rev **143**: 68-96.

Dowdy, S. F. (2017). "Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics." Nat Biotechnol **35**(3): 222-229.

Durymanov, M. and J. Reineke (2018). "Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers." Front Pharmacol **9**: 971.

Duxbury, M. S., S. W. Ashley and E. E. Whang (2005). "RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 459-463.

Fadeel, B. (2012). "Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system." Swiss Med Wkly **142**: w13609.

Fernández-Iglesias, N. and J. Bettmer (2015). "Complementary mass spectrometric techniques for the quantification of the protein corona: a case study on gold nanoparticles and human serum proteins." Nanoscale **7**(34): 14324-14331.

Fessi, C., J.-P. Devissaguet, F. Puisieux and C. Thies (1992). Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles, Google Patents.

Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.

Fleischer, C. C. and C. K. Payne (2014). "Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes." Acc Chem Res **47**(8): 2651-2659.

Fleischer, C. C. and C. K. Payne (2014). "Secondary structure of corona proteins determines the cell surface receptors used by nanoparticles." J Phys Chem B **118**(49): 14017-14026.

Forest, V., M. Cottier and J. Pourchez (2015). "Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells: A reductive theory." Nano Today **10**(6): 677-680.

Forest, V. and J. Pourchez (2017). "Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona." Materials Science and Engineering: C **70**: 889-896.

Garber, K. (2016). "Alynlam terminates revusiran program, stock plunges." Nat Biotechnol **34**(12): 1213-1214.

Gaudin, A., E. Song, A. R. King, J. K. Saucier-Sawyer, R. Bindra, D. Desmaele, P. Couvreur and W. M. Saltzman (2016). "PEGylated squalenoyl-gemcitabine nanoparticles for the treatment of glioblastoma." Biomaterials **105**: 136-144.

Gillmore, J. D., R. H. Falk, M. S. Maurer, M. Hanna, V. Karsten, J. Vest, J. Gollob and P. N. Hawkins (2015). "Phase 2, open-label extension (OLE) study of revusiran, an investigational RNAi therapeutic for the treatment of patients with transthyretin cardiac amyloidosis." Orphanet Journal of Rare Diseases **10**(Suppl 1): O21-O21.

Gobeaux, F., J. Bizeau, F. Samson, L. Marichal, I. Grillo, F. Wien, S. O. Yesylevsky, C. Ramseyer, M. Rouquette, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaële, P. Couvreur, P. Guenoun, J. P. Renault and F. Testard (2020). "Albumin-driven disassembly of lipidic nanoparticles: the specific case of the squalene-adenosine nanodrug." Nanoscale **12**(4): 2793-2809.

Gossmann, R., E. Fahrländer, M. Hummel, D. Mulac, J. Brockmeyer and K. Langer (2015). "Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **93**: 80-87.

Greenfield, N. J. (2006). "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure." Nat Protoc **1**(6): 2876-2890.

Hammoum, R. (2008). Etude par spectroscopie Raman de la structure des domaines périodiquement polarisés dans le niobate de lithium (PPLN).

Haussecker, D. (2014). "Current issues of RNAi therapeutics delivery and development." J Control Release **195**: 49-54.

Heidel, J. D., J. Y. Liu, Y. Yen, B. Zhou, B. S. Heale, J. J. Rossi, D. W. Bartlett and M. E. Davis (2007). "Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **13**(7): 2207-2215.

Heidel, J. D., Z. Yu, J. Y. Liu, S. M. Rele, Y. Liang, R. K. Zeidan, D. J. Kornbrust and M. E. Davis (2007). "Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5715-5721.

Heuer-Jungemann, A., R. Kirkwood, A. H. El-Sagheer, T. Brown and A. G. Kanaras (2013). "Copper-free click chemistry as an emerging tool for the programmed ligation of DNA-functionalised gold nanoparticles." Nanoscale **5**(16): 7209-7212.

Heyes, J., L. Palmer, K. Bremner and I. MacLachlan (2005). "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids." J Control Release **107**(2): 276-287.

Hillaireau, H., N. Dereuddre-Bosquet, R. Skanji, F. Bekkara-Aounallah, J. Caron, S. Lepêtre, S. Argote, L. Bauduin, R. Yousfi and C. Rogez-Kreuz (2013). "Anti-HIV efficacy and biodistribution of nucleoside reverse transcriptase inhibitors delivered as squalenoylated prodrug nanoassemblies." Biomaterials **34**(20): 4831-4838.

Ho, Y. T., N. A. Azman, F. W. Y. Loh, G. K. T. Ong, G. Engudar, S. A. Kriz and J. C. Y. Kah (2018). "Protein Corona Formed from Different Blood Plasma Proteins Affects the Colloidal Stability of Nanoparticles Differently." Bioconjugate Chemistry **29**(11): 3923-3934.

Hoogenboezem, E. N. and C. L. Duvall (2018). "Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies." Adv Drug Deliv Rev **130**: 73-89.

Hu-Lieskovan, S., J. D. Heidel, D. W. Bartlett, M. E. Davis and T. J. Triche (2005). "Sequence-Specific Knockdown of EWS-FLI1 by Targeted, Nonviral Delivery of Small Interfering RNA Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Metastatic Ewing's Sarcoma." Cancer Research **65**(19): 8984.

Husson, J. C., F. Pilot, U. P.-E. C. V. d. M. . and É. n. v. d'Alfort (2011). L'ARN interférence: des mécanismes fondamentaux aux applications thérapeutiques.

Hwang, S. J., N. C. Bellocoq and M. E. Davis (2001). "Effects of Structure of β -Cyclodextrin-Containing Polymers on Gene Delivery." Bioconjugate Chemistry **12**(2): 280-290.

Ibrahim, N. K., N. Desai, S. Legha, P. Soon-Shiong, R. L. Theriault, E. Rivera, B. Esmali, S. E. Ring, A. Bedikian and G. N. Hortobagyi (2002). "Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel." Clinical Cancer Research **8**(5): 1038-1044.

Ishida, T., M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima and H. Kiwada (2006). "Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes." J Control Release **112**(1): 15-25.

Jain, S., K. Pathak and A. Vaidya (2018). "Molecular therapy using siRNA: Recent trends and advances of multi target inhibition of cancer growth." International Journal of Biological Macromolecules **116**: 880-892.

Janas, M. M., C. E. Harbison, V. K. Perry, B. Carito, J. E. Sutherland, A. K. Vaishnav, N. D. Keirstead and G. Warner (2018). "The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies." Toxicol Pathol **46**(7): 735-745.

Jawalekar, A. M., S. Malik, J. M. Verkade, B. Gibson, N. S. Barta, J. C. Hodges, A. Rowan and F. L. van Delft (2013). "Oligonucleotide tagging for copper-free click conjugation." Molecules **18**(7): 7346-7363.

Jewett, J. C. and C. R. Bertozzi (2010). "Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology." Chem Soc Rev **39**(4): 1272-1279.

Jiang, Y., S. Huo, T. Mizuhara, R. Das, Y. W. Lee, S. Hou, D. F. Moyano, B. Duncan, X. J. Liang and V. M. Rotello (2015). "The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles." ACS Nano **9**(10): 9986-9993.

Judge, A., K. McClintock, J. R. Phelps and I. MacLachlan (2006). "Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes." Mol Ther **13**(2): 328-337.

Juliano, R. L., X. Ming, K. Carver and B. Laing (2014). "Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: implications for oligonucleotide pharmacology." *Nucleic Acid Ther* **24**(2): 101-113.

Juliano, R. L., X. Ming and O. Nakagawa (2012). "Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides." *Bioconjug Chem* **23**(2): 147-157.

Jung, C. (2000). "Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy." *J Mol Recognit* **13**(6): 325-351.

Kafshgari, M. H., F. J. Harding and N. H. Voelcker (2015). "Insights into cellular uptake of nanoparticles." *Curr Drug Deliv* **12**(1): 63-77.

Kanasty, R., J. R. Dorkin, A. Vegas and D. Anderson (2013). "Delivery materials for siRNA therapeutics." *Nature Materials* **12**: 967.

Kanasty, R. L., K. A. Whitehead, A. J. Vegas and D. G. Anderson (2012). "Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles." *Mol Ther* **20**(3): 513-524.

Kelly, P. M., C. Åberg, E. Polo, A. O'Connell, J. Cookman, J. Fallon, Ž. Krpetić and K. A. Dawson (2015). "Mapping protein binding sites on the biomolecular corona of nanoparticles." *Nat Nanotechnol* **10**(5): 472-479.

Kelly, S. M., T. J. Jess and N. C. Price (2005). "How to study proteins by circular dichroism." *Biochim Biophys Acta* **1751**(2): 119-139.

Kettler, K., K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel and A. J. Hendriks (2014). "Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type." *Environ Toxicol Chem* **33**(3): 481-492.

Kihara, S., N. J. van der Heijden, C. K. Seal, J. P. Mata, A. E. Whitten, I. Köper and D. J. McGillivray (2019). "Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona." *Bioconjug Chem* **30**(4): 1067-1076.

Kim, S.-K. and F. Karadeniz (2012). Chapter 14 - Biological Importance and Applications of Squalene and Squalane. *Advances in Food and Nutrition Research*. S.-K. Kim, Academic Press. **65**: 223-233.

Kiss, A. L. and E. Botos (2009). "Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?" *J Cell Mol Med* **13**(7): 1228-1237.

Kotelevets, L., E. Chastre, J. Caron, J. Mougin, G. Bastian, A. Pineau, F. Walker, T. Lehy, D. Desmaële and P. Couvreur (2017). "A Squalene-Based Nanomedicine for Oral Treatment of Colon Cancer." *Cancer Res* **77**(11): 2964-2975.

Kraft, J. C., J. P. Freeling, Z. Wang and R. J. Ho (2014). "Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems." *J Pharm Sci* **103**(1): 29-52.

Kratz, F. (2008). "Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles." *J Control Release* **132**(3): 171-183.

Kreuter, J. (2004). "Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain." *J Nanosci Nanotechnol* **4**(5): 484-488.

Kujak, C. and J. M. Kolesar (2016). "Treatment of chronic myelogenous leukemia." *American Journal of Health-System Pharmacy* **73**(3): 113-120.

Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media.

Lam, J. K., M. Y. Chow, Y. Zhang and S. W. Leung (2015). "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing." *Mol Ther Nucleic Acids* **4**: e252.

Latysheva, N. S. and M. M. Babu (2016). "Discovering and understanding oncogenic gene fusions through data intensive computational approaches." *Nucleic Acids Res* **44**(10): 4487-4503.

Lee, J. S., E. H. Chang, O. J. Koo, D. H. Jwa, W. M. Mo, G. Kwak, H. W. Moon, H. T. Park, Y. B. Hong and B. O. Choi (2017). "Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo." *Neurobiol Dis* **100**: 99-107.

Lee, S. H., Y. Y. Kang, H. E. Jang and H. Mok (2016). "Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* **104**: 78-92.

Legrand, B. (2009). *Analyse d'interactions moléculaires par RMN: Étude de la DHFR en présence d'osmolytes et structures de pseudopeptides antimicrobiens en environnement membranaire*.

Lepeltier, E., C. Bourgaux and P. Couvreur (2014). "Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices." *Adv Drug Deliv Rev* **71**: 86-97.

Li, F. Q., K. A. Fowler, J. E. Neil, C. A. Colton and M. P. Vitek (2010). "An apolipoprotein E-mimetic stimulates axonal regeneration and remyelination after peripheral nerve injury." J Pharmacol Exp Ther **334**(1): 106-115.

Li, J., B. Parker, C. Martyn, C. Natarajan and J. Guo (2013). "The PMP22 gene and its related diseases." Mol Neurobiol **47**(2): 673-698.

Li, W., K. S. Koutmou, D. J. Leahy and M. Li (2015). "Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1." J Biol Chem **290**(31): 18904-18913.

Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr. and K. H. Weisgraber (1984). "Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function." J Lipid Res **25**(12): 1277-1294.

Mahmoudi, M., I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent (2011). "Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges." Chem Rev **111**(9): 5610-5637.

Mainard, M. and D. Jacob (2016). "Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière." Photoniques(83): 40-44.

Maksimenko, A., F. Dosio, J. Mougin, A. Ferrero, S. Wack, L. H. Reddy, A. A. Weyn, E. Lepeltier, C. Bourgaux, B. Stella, L. Cattel and P. Couvreur (2014). "A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(2): E217-226.

Manaia, E. B., M. P. Abucafy, B. G. Chiari-Andreo, B. L. Silva, J. A. Oshiro Junior and L. A. Chiavacci (2017). "Physicochemical characterization of drug nanocarriers." Int J Nanomedicine **12**: 4991-5011.

Martinez-Moro, M., D. Di Silvio and S. E. Moya (2019). "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool for the study of the intracellular dynamics and biological fate of protein corona." Biophys Chem **253**: 106218.

Massaad-Massade, L., S. Boutary, M. Caillaud, C. Gracia, B. Parola, S. B. Gnaouiya, B. Stella, S. Arpicco, E. Buchy, D. Desmaele, P. Couvreur and G. Urbinati (2018). "New Formulation for the Delivery of Oligonucleotides Using "Clickable" siRNA-Polyisoprenoid-Conjugated Nanoparticles: Application to Cancers Harboring Fusion Oncogenes." Bioconjug Chem **29**(6): 1961-1972.

Mathew, V. and A. K. Wang (2019). "Inotersen: new promise for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis." Drug design, development and therapy **13**: 1515-1525.

Menet, M.-C. (2011). "Principes de la spectrométrie de masse." Revue Francophone des Laboratoires **2011**(437): 41-53.

Mesa, C. and L. E. Fernández (2004). "Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy." Immunol Cell Biol **82**(6): 644-650.

Mishra, S., J. D. Heidel, P. Webster and M. E. Davis (2006). "Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes." Journal of Controlled Release **116**(2): 179-191.

Monopoli, M. P., C. Åberg, A. Salvati and K. A. Dawson (2012). "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials." Nature Nanotechnology **7**(12): 779-786.

Nair, J. K., H. Attarwala, A. Sehgal, Q. Wang, K. Aluri, X. Zhang, M. Gao, J. Liu, R. Indrakanti, S. Schofield, P. Kretschmer, C. R. Brown, S. Gupta, J. L. S. Willoughby, J. A. Boshar, V. Jadhav, K. Charisse, T. Zimmermann, K. Fitzgerald, M. Manoharan, K. G. Rajeev, A. Akinc, R. Hutabarat and M. A. Maier (2017). "Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates." Nucleic Acids Res **45**(19): 10969-10977.

Nair, J. K., J. L. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev and M. Manoharan (2014). "Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing." J Am Chem Soc **136**(49): 16958-16961.

Neagu, M., Z. Piperigkou, K. Karamanou, A. B. Engin, A. O. Docea, C. Constantin, C. Negrei, D. Nikitovic and A. Tsatsakis (2017). "Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology." Arch Toxicol **91**(3): 1031-1048.

Nel, A., T. Xia, L. Mädler and N. Li (2006). "Toxic potential of materials at the nanolevel." *Science* **311**(5761): 622-627.

Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." *Nat Mater* **8**(7): 543-557.

Nguyen, V. H. and B. J. Lee (2017). "Protein corona: a new approach for nanomedicine design." *Int J Nanomedicine* **12**: 3137-3151.

Ó'Fágáin, C., P. M. Cummins and B. F. O'Connor (2017). "Gel-Filtration Chromatography." *Methods Mol Biol* **1485**: 15-25.

Othman, M., D. Desmaële, P. Couvreur, L. Vander Elst, S. Laurent, R. N. Muller, C. Bourgaux, E. Morvan, T. Pouget, S. Lepêtre-Mouelhi, P. Durand and R. Gref (2011). "Synthesis and physicochemical characterization of new squalenoyl amphiphilic gadolinium complexes as nanoparticle contrast agents." *Org Biomol Chem* **9**(11): 4367-4386.

Owens, D. E., 3rd and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." *Int J Pharm* **307**(1): 93-102.

Ozpolat, B., A. K. Sood and G. Lopez-Berestein (2014). "Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy." *Adv Drug Deliv Rev* **66**: 110-116.

Patel, M. M. and B. M. Patel (2017). "Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain." *CNS Drugs* **31**(2): 109-133.

Pederzoli, F., G. Tosi, M. A. Vandelli, D. Belletti, F. Forni and B. Ruozi (2017). "Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on?" *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **9**(6).

Pelkmans, L., J. Kartenbeck and A. Helenius (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." *Nature Cell Biology* **3**(5): 473-483.

Peltier, A. P. (1974). "Opsonization." *Nouv Rev Fr Hematol* **14**(2): 247-257.

Peng, Q. and H. Mu (2016). "The potential of protein-nanomaterial interaction for advanced drug delivery." *J Control Release* **225**: 121-132.

Peuvrel-Disdier, E., S. Manneville, G. Ovarlez, F. Pignon and S. Rodts (2012). "Apport de techniques couplées (diffusion de rayonnements, résonance magnétique, vélocimétrie ultrasonore) à la rhéologie." *Rhéologie* **21**: 36-67.

Prozeller, D., S. Morsbach and K. Landfester (2019). "Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle-protein interactions." *Nanoscale* **11**(41): 19265-19273.

Pun, S. H. and M. E. Davis (2002). "Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application." *Bioconjug Chem* **13**(3): 630-639.

Ramezani, M., M. Khoshhamdam, A. Dehshahri and B. Malaekheh-Nikouei (2009). "The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes." *Colloids Surf B Biointerfaces* **72**(1): 1-5.

Raouane, M., D. Desmaele, M. Gilbert-Sirieix, C. Gueutin, F. Zouhiri, C. Bourgaux, E. Lepeltier, R. Gref, R. Ben Salah, G. Clayman, L. Massaad-Massade and P. Couvreur (2011). "Synthesis, characterization, and in vivo delivery of siRNA-squalene nanoparticles targeting fusion oncogene in papillary thyroid carcinoma." *J Med Chem* **54**(12): 4067-4076.

Raouane, M., D. Desmaele, G. Urbinati, L. Massaad-Massade and P. Couvreur (2012). "Lipid conjugated oligonucleotides: a useful strategy for delivery." *Bioconjug Chem* **23**(6): 1091-1104.

Reddy, L. H. and P. Couvreur (2009). "Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(15): 1412-1426.

Rensen, P. C., R. L. de Vruh, J. Kuiper, M. K. Bijsterbosch, E. A. Biessen and T. J. van Berkel (2001). "Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting." *Adv Drug Deliv Rev* **47**(2-3): 251-276.

Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall and A. Khvorova (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol* **22**(3): 326-330.

Richard, D., M. Ferrand and G. Kearley (1996). "Analysis and visualisation of neutron-scattering data." *Journal of Neutron Research* **4**(1-4): 33-39.

Ries, J. and P. Schuille (2012). "Fluorescence correlation spectroscopy." *Bioessays* **34**(5): 361-368.

Rizk, M. and S. Tuzmen (2017). "Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran." *Pharmgenomics Pers Med* **10**: 267-278.

Romei, C., R. Ciampi and R. Elisei (2016). "A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma." *Nat Rev Endocrinol* **12**(4): 192-202.

Romei, C. and R. Elisei (2012). "RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma." *Frontiers in endocrinology* **3**: 54-54.

Rouquette, M., K. Ser-Le Roux, M. Polrot, C. Bourgaux, J. P. Michel, F. Testard, F. Gobeaux and S. Lepetre-Mouelhi (2019). "Towards a clinical application of freeze-dried squalene-based nanomedicines." *J Drug Target* **27**(5-6): 699-708.

Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* **243**(5405): 290-293.

Sakulkhu, U., M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang and H. Hofmann (2014). "Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings." *Sci Rep* **4**: 5020.

Salvati, A., A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Åberg, E. Mahon and K. A. Dawson (2013). "Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface." *Nat Nanotechnol* **8**(2): 137-143.

Sangrà, M., J. Estelrich, R. Sabaté, A. Espargaró and M. A. Busquets (2017). "Evidence of Protein Adsorption in Pegylated Liposomes: Influence of Liposomal Decoration." *Nanomaterials (Basel)* **7**(2).

Sapsford, K. E., K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps and I. L. Medintz (2011). "Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques." *Anal Chem* **83**(12): 4453-4488.

Sarett, S. M., T. A. Werfel, L. Lee, M. A. Jackson, K. V. Kilchrist, D. Brantley-Sieders and C. L. Duvall (2017). "Lipophilic siRNA targets albumin in situ and promotes bioavailability, tumor penetration, and carrier-free gene silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(32): E6490-E6497.

Schumaker, V. N. and G. H. Adams (1969). "Circulating lipoproteins." *Annu Rev Biochem* **38**: 113-136.

Schumann, F. H., H. Riepl, T. Maurer, W. Gronwald, K. P. Neidig and H. R. Kalbitzer (2007). "Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions." *J Biomol NMR* **39**(4): 275-289.

Scott, L. J. (2020). "Givosiran: First Approval." *Drugs*.

Semple, S. C., A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden and M. J. Hope (2010). "Rational design of cationic lipids for siRNA delivery." *Nat Biotechnol* **28**(2): 172-176.

Semple, S. C., T. O. Harasym, K. A. Clow, S. M. Ansell, S. K. Klimuk and M. J. Hope (2005). "Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic acid." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(3): 1020-1026.

Setten, R. L., J. J. Rossi and S. P. Han (2019). "The current state and future directions of RNAi-based therapeutics." *Nat Rev Drug Discov*.

Sleep, D. (2015). "Albumin and its application in drug delivery." *Expert Opin Drug Deliv* **12**(5): 793-812.

Sobot, D., S. Mura, M. Rouquette, B. Vukosavljevic, F. Cayre, E. Buchy, G. Pieters, S. Garcia-Argote, M. Windbergs, D. Desmaele and P. Couvreur (2017). "Circulating Lipoproteins: A Trojan Horse Guiding Squalenoylated Drugs to LDL-Accumulating Cancer Cells." *Mol Ther* **25**(7): 1596-1605.

Sobot, D., S. Mura, S. O. Yesylevskyy, L. Dalbin, F. Cayre, G. Bort, J. Mouglin, D. Desmaele, S. Lepetre-Mouelhi, G. Pieters, B. Andreiuk, A. S. Klymchenko, J. L. Paul, C. Ramseyer and P. Couvreur (2017).

"Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery." *Nat Commun* **8**: 15678.

Springer, A. D. and S. F. Dowdy (2018). "GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics." *Nucleic Acid Ther* **28**(3): 109-118.

Stirland, D. L., J. W. Nichols, S. Miura and Y. H. Bae (2013). "Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice." *J Control Release* **172**(3): 1045-1064.

Suhr, O. B., T. Coelho, J. Buades, J. Pouget, I. Conceicao, J. Berk, H. Schmidt, M. Waddington-Cruz, J. M. Campistol, B. R. Bettencourt, A. Vaishnav, J. Gollob and D. Adams (2015). "Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study." *Orphanet J Rare Dis* **10**: 109.

Suk, J. S., Q. Xu, N. Kim, J. Hanes and L. M. Ensign (2016). "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery." *Adv Drug Deliv Rev* **99**(Pt A): 28-51.

Sun, C., A. Dobi, A. Mohamed, H. Li, R. L. Thangapazham, B. Furusato, S. Shaheduzzaman, S. H. Tan, G. Vaidyanathan, E. Whitman, D. J. Hawsworth, Y. Chen, M. Nau, V. Patel, M. Vahey, J. S. Gutkind, T. Sreenath, G. Petrovics, I. A. Sesterhenn, D. G. McLeod and S. Srivastava (2008). "TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation." *Oncogene* **27**(40): 5348-5353.

Szatanek, R., M. Baj-Krzyworzeka, J. Zimoch, M. Lekka, M. Siedlar and J. Baran (2017). "The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization." *Int J Mol Sci* **18**(6).

Szebeni, J., F. Muggia, A. Gabizon and Y. Barenholz (2011). "Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention." *Adv Drug Deliv Rev* **63**(12): 1020-1030.

Taleb, I. (2013). *Apport de la spectroscopie vibrationnelle, infrarouge et Raman, appliquée au sérum pour le diagnostic de carcinome hépatocellulaire chez les patients atteints de cirrhose*, Reims.

Tatiparti, K., S. Sau, S. K. Kashaw and A. K. Iyer (2017). "siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments." *Nanomaterials (Basel)* **7**(4).

Tavano, R., L. Gabrielli, E. Lubian, C. Fedeli, S. Visentin, P. Polverino De Laureto, G. Arrigoni, A. Geffner-Smith, F. Chen, D. Simberg, G. Morgese, E. M. Benetti, L. Wu, S. M. Moghimi, F. Mancin and E. Papini (2018). "C1q-Mediated Complement Activation and C3 Opsonization Trigger Recognition of Stealth Poly(2-methyl-2-oxazoline)-Coated Silica Nanoparticles by Human Phagocytes." *ACS Nano* **12**(6): 5834-5847.

Thaxton, C. S., J. S. Rink, P. C. Naha and D. P. Cormode (2016). "Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery." *Adv Drug Deliv Rev* **106**(Pt A): 116-131.

Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." *Nat Rev Genet* **4**(5): 346-358.

Thompson, J. D., D. J. Kornbrust, J. W. Foy, E. C. Solano, D. J. Schneider, E. Feinstein, B. A. Molitoris and S. Erlich (2012). "Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified siRNAs targeting p53 RNA following intravenous administration." *Nucleic Acid Ther* **22**(4): 255-264.

Tomlins, S. A., B. Laxman, S. Varambally, X. Cao, J. Yu, B. E. Helgeson, Q. Cao, J. R. Prensner, M. A. Rubin, R. B. Shah, R. Mehra and A. M. Chinnaiyan (2008). "Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer." *Neoplasia* **10**(2): 177-IN179.

Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X. W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." *Science* **310**(5748): 644-648.

Tran, S., P. J. DeGiovanni, B. Piel and P. Rai (2017). "Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery." *Clin Transl Med* **6**(1): 44.

Troiber, C., J. C. Kasper, S. Milani, M. Scheible, I. Martin, F. Schaubhut, S. Kuchler, J. Radler, F. C. Simmel, W. Friess and E. Wagner (2013). "Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization." *Eur J Pharm Biopharm* **84**(2): 255-264.

Tseng, Y. C., S. Mozumdar and L. Huang (2009). "Lipid-based systemic delivery of siRNA." Adv Drug Deliv Rev **61**(9): 721-731.

Tuschl, T. (2002). "Expanding small RNA interference." Nat Biotechnol **20**(5): 446-448.

Urbinati, G., H. M. Ali, Q. Rousseau, H. Chapuis, D. Desmaele, P. Couvreur and L. Massaad-Massade (2015). "Antineoplastic Effects of siRNA against TMPRSS2-ERG Junction Oncogene in Prostate Cancer." PLoS One **10**(5): e0125277.

Urbinati, G., I. de Waziers, M. Slamic, T. Foussigniere, H. M. Ali, D. Desmaele, P. Couvreur and L. Massaad-Massade (2016). "Knocking Down TMPRSS2-ERG Fusion Oncogene by siRNA Could be an Alternative Treatment to Flutamide." Mol Ther Nucleic Acids **5**: e301.

Valetti, S., F. Maione, S. Mura, B. Stella, D. Desmaele, M. Noiray, J. Vergnaud, C. Vauthier, L. Cattel, E. Giraudo and P. Couvreur (2014). "Peptide-functionalized nanoparticles for selective targeting of pancreatic tumor." J Control Release **192**: 29-39.

Vocelle, D., C. Chan and S. P. Walton (2020). "Endocytosis Controls siRNA Efficiency: Implications for siRNA Delivery Vehicle Design and Cell-Specific Targeting." Nucleic Acid Ther **30**(1): 22-32.

Vroman, L. (1962). "Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids." Nature **196**: 476-477.

Wakkel, M. (2015). Contribution à l'étude de la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions en milieu complexe. Effet du poids moléculaire sur l'équilibre et la cinétique de rétention, Toulouse, INSA.

Ward, W. H. and G. A. Holdgate (2001). "Isothermal titration calorimetry in drug discovery." Prog Med Chem **38**: 309-376.

Wasan, K. M., D. R. Brocks, S. D. Lee, K. Sachs-Barrable and S. J. Thornton (2008). "Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **7**(1): 84-99.

Weis, J., K. G. Claeys, A. Roos, H. Azzedine, I. Katona, J. M. Schröder and J. Senderek (2017). "Towards a functional pathology of hereditary neuropathies." Acta Neuropathol **133**(4): 493-515.

Welsher, K., S. A. McManus, C. H. Hsia, S. Yin and H. Yang (2015). "Discovery of protein- and DNA-imperceptible nanoparticle hard coating using gel-based reaction tuning." J Am Chem Soc **137**(2): 580-583.

Weng, Y., H. Xiao, J. Zhang, X.-J. Liang and Y. Huang (2019). "RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution." Biotechnology Advances **37**(5): 801-825.

Whitehead, K. A., R. Langer and D. G. Anderson (2009). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." Nat Rev Drug Discov **8**(2): 129-138.

Wolfrum, C., S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan and M. Stoffel (2007). "Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs." Nat Biotechnol **25**(10): 1149-1157.

Xia, Y., J. Tian and X. Chen (2016). "Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery." Biomaterials **79**: 56-68.

Xue, H. Y., S. Liu and H. L. Wong (2014). "Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine." Nanomedicine (Lond) **9**(2): 295-312.

Yameen, B., W. I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi and O. C. Farokhzad (2014). "Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting." J Control Release **190**: 485-499.

Yan, X., G. L. Scherphof and J. A. A. M. Kamps (2005). "Liposome Opsonization." Journal of Liposome Research **15**(1-2): 109-139.

Yang, H., M. Wang, Y. Zhang, X. Liu, S. Yu, Y. Guo, S. Yang and L. Yang (2019). "Detailed insight into the formation of protein corona: Conformational change, stability and aggregation." Int J Biol Macromol **135**: 1114-1122.

Yao, H., E. Wynendaele, X. Xu, A. Kosgei and B. De Spiegeleer (2018). "Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **147**: 50-64.

Yardley, D. A. (2013). "nan-Paclitaxel mechanisms of action and delivery." J Control Release **170**(3): 365-372.

Yarmush, M. L., A. Golberg, G. Sersa, T. Kotnik and D. Miklavcic (2014). "Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges." Annu Rev Biomed Eng **16**: 295-320.

Yu, H., Y. Ge, L. Guo and L. Huang (2017). "Potential approaches to the treatment of Ewing's sarcoma." Oncotarget **8**(3): 5523-5539.

Zanganeh, S., R. Spitler, M. Erfanzadeh, A. M. Alkilany and M. Mahmoudi (2016). "Protein corona: Opportunities and challenges." Int J Biochem Cell Biol **75**: 143-147.

Zarei, M. and J. Aalaie (2019). "Profiling of nanoparticle-protein interactions by electrophoresis techniques." Anal Bioanal Chem **411**(1): 79-96.

Zhang, Z., J. Guan, Z. Jiang, Y. Yang, J. Liu, W. Hua, Y. Mao, C. Li, W. Lu, J. Qian and C. Zhan (2019). "Brain-targeted drug delivery by manipulating protein corona functions." Nat Commun **10**(1): 3561.

Zhou, Y., H. Bazick, J. R. Miles, A. I. Fethiere, M. O. Al Salihi, S. Fazio, H. Tavori and L. Notterpek (2019). "A neutral lipid-enriched diet improves myelination and alleviates peripheral nerve pathology in neuropathic mice." Experimental neurology **321**: 113031.

Zhou, Y. and L. Notterpek (2016). "Promoting peripheral myelin repair." Experimental neurology **283**: 573-580.

Zimmermann, T. S., V. Karsten, A. Chan, J. Chiesa, M. Boyce, B. R. Bettencourt, R. Hutabarat, S. Nochur, A. Vaishnav and J. Gollob (2017). "Clinical Proof of Concept for a Novel Hepatocyte-Targeting GalNAc-siRNA Conjugate." Mol Ther **25**(1): 71-78.

Zuckerman, J. E. and M. E. Davis (2015). "Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer." Nat Rev Drug Discov **14**(12): 843-856.

Zuckerman, J. E., I. Gritli, A. Tolcher, J. D. Heidel, D. Lim, R. Morgan, B. Chmielowski, A. Ribas, M. E. Davis and Y. Yen (2014). "Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(31): 11449-11454.

Annexes

I. Etude *in vitro* des NPs siRNA-SQ avec le brin espaceur TEG

Au début de la thèse, un nouveau brin espaceur tri-éthylène glycol (TEG) (Figure S1B) a été synthétisé et testé.

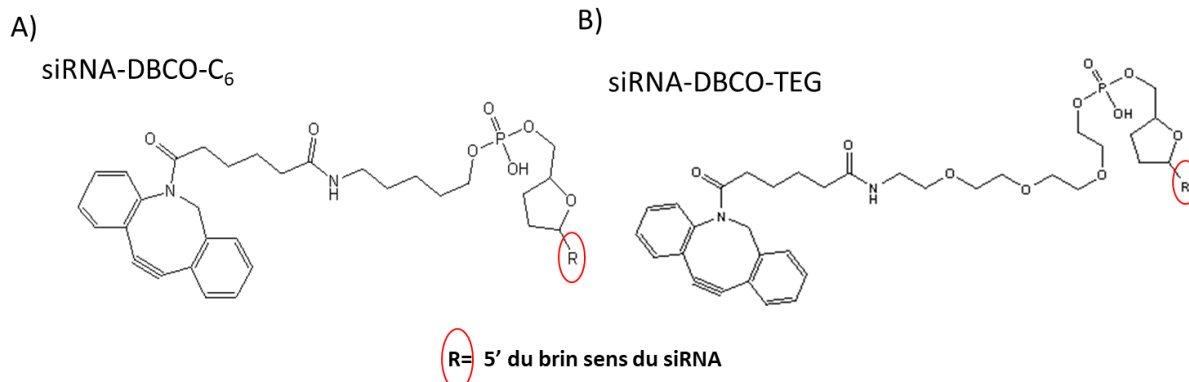


Figure S1 : Formule chimique des modifications pour la chimie clic sans cuivre avec présentation de deux brins espaceur différents. A) Brin espaceur C₆ liant le brin sens en 5'- et le groupement dibenzocyclooctyne (DBCO) pour la chimie clic sans cuivre. B) Brin espaceur de 3 motifs éthylène glycol (TEG) liant le brin sens en 5'- et le groupement dibenzocyclooctyne (DBCO)

La taille des NPs siRNA(TEG)-SQ et leur stabilité ont été déterminées sur un mois (n=3; Figure S2). Les NPs résultantes ont un diamètre hydrodynamique stable autour de 250 nm avec un PDI de 0,2.

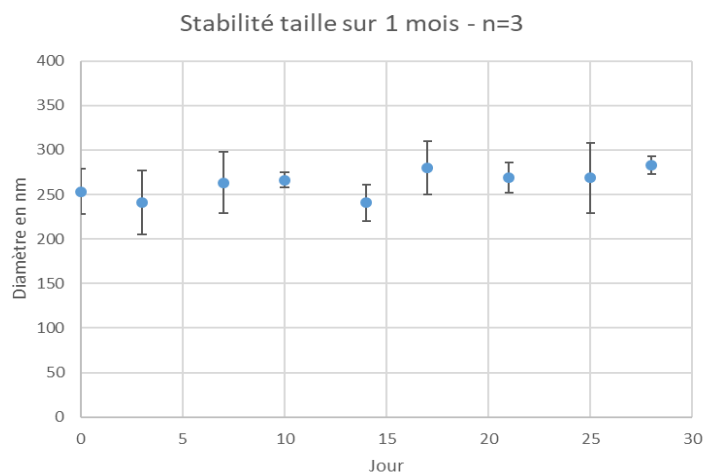


Figure S2 : Les NPs siRNA(TEG)-SQ sont stables un mois

L'efficacité thérapeutique a été testée *in vitro* sur les cellules VCaP issues de cancer prostatique et exprimant l'oncogène de fusion TMPRSS2-ERG. Après 72h (Figure S3A) et 96h (Figure S3B), l'inhibition de l'expression de l'OF par les NPs siRNA TMPRSS2-ERG (TEG)-SQ est comparable à celle observée par le siRNA « nu » et le siRNA IVB (correspondant au siRNA anti-TMPRSS2-ERG sans modification chimique), que cela soit au niveau de l'ARNm ou des protéines. Ceci démontre que l'ensemble de la synthèse chimique ne modifie pas l'efficacité du siRNA. La transfection du siRNA contrôle non bioconjugué (annoté siRNA Ct sur la figure S4) ou sous forme de NPs (NPs siRNA Ct(TEG)-SQ) n'a pas affecté l'expression de TMPRSS2-ERG, confirmant l'effet spécifique du siRNA sur l'expression de ce gène.

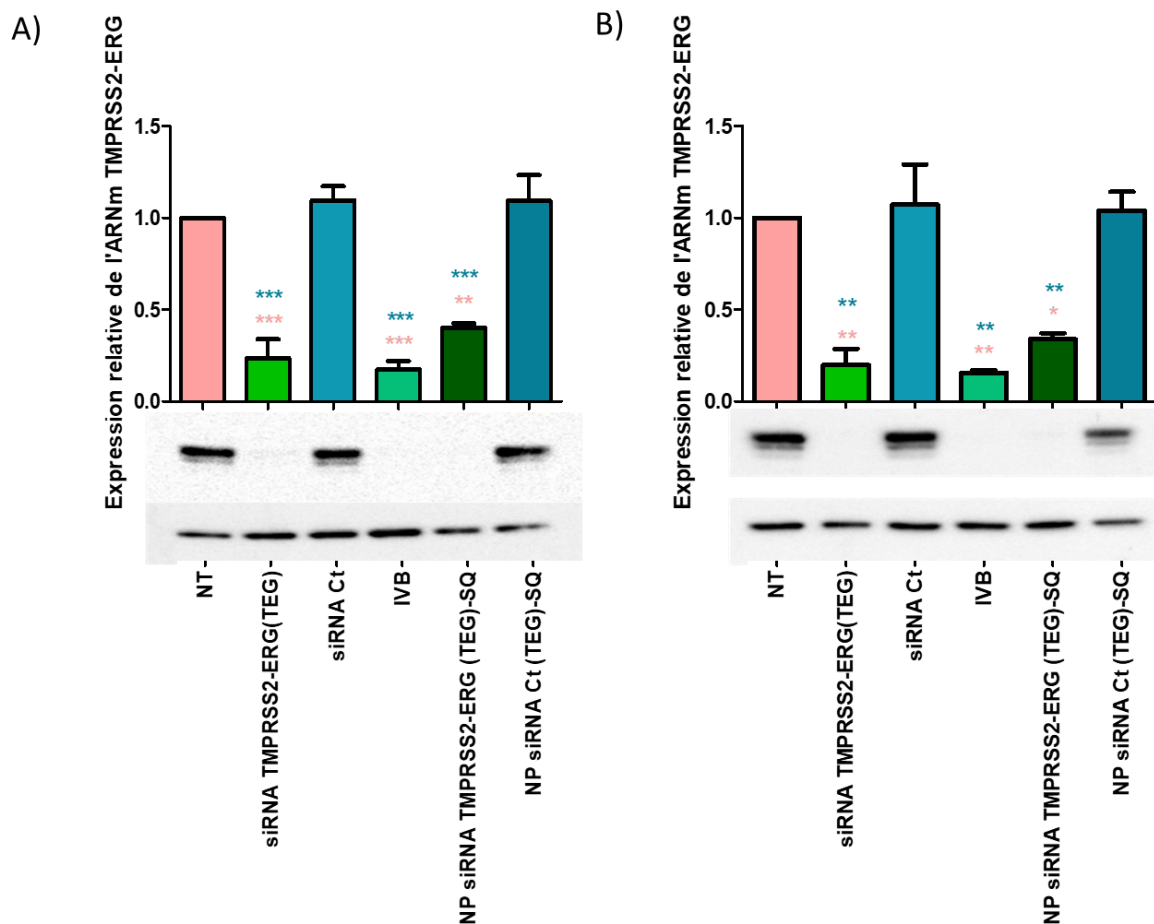


Figure S3 : Etude de l'inhibition *in vitro* de l'expression de TMPRSS2-ERG. Les cellules VCaP ont été transfectées pendant 72h (A) et 96h (B) avec une concentration de 50 nM du siRNA contrôle et anti-TMPRSS2-ERG sous forme « nu » ou nanoparticulaire conjugué au SQ. L'ARNm et les protéines ont été extrait pour étudier l'expression du gène par RT-qPCR et WB. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$ et * $p < 0,01$ par rapport aux conditions non traités NT. *** $p < 0,0001$ et ** $p < 0,001$ par rapport au siRNA contrôle Ct et au NPs siRNA contrôle Ct(TEG)-SQ. (One-way Anova suivi par un test de Bonferroni ; $n=3$)

La toxicité de ces nanoformulations a été vérifiée par tests MTT après 72h d'incubation (n=2 ; figure S4). Le siRNA anti-TMPRSS2-ERG, qui a un effet antinéoplasique, diminue la viabilité cellulaire des cellules VCaP. Le siRNA contrôle n'a pas d'effet sur l'expression de ce gène et nous pouvons observer qu'il n'entraîne pas de changement de la viabilité cellulaire. Ceci confirme la non-toxicité de la formulation siRNA conjugué au SQ par le biais d'un espaceur TEG.

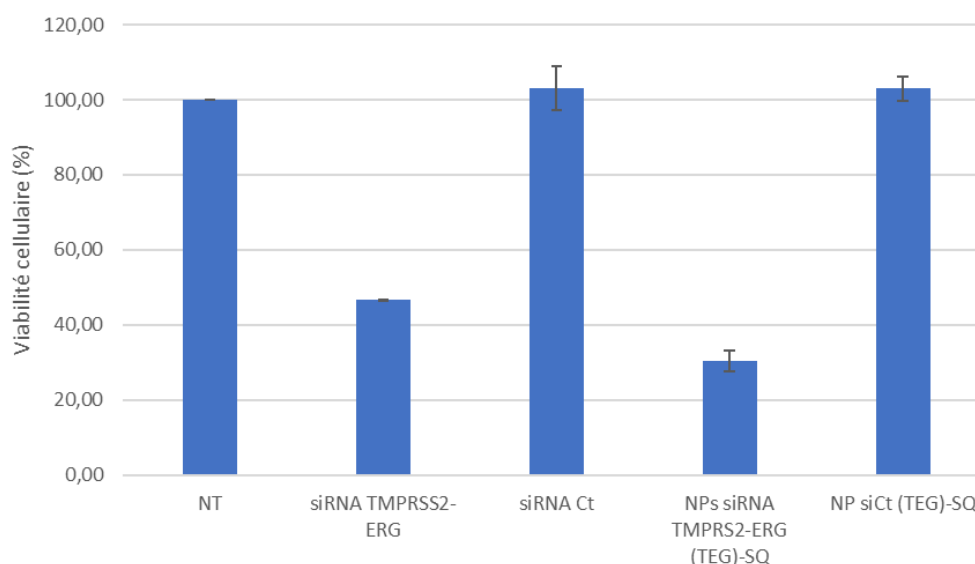


Figure S4 : Effet sur la viabilité cellulaire des NPs siRNA TMPRSS2-ERG(TEG)-SQ

Pour conclure, le remplacement d'un brin espaceur lipophile (C6) par un hydrophile (TEG) ne peut pas être utilisée pour les études futures car elle n'a pas eu d'effets positifs sur l'efficacité et la taille des NPs siRNA-SQ. Les NPs obtenues ont même une taille supérieure. Néanmoins, cette étude montre l'importance de la polarité du brin espaceur dans la synthèse chimique qui influence l'efficacité et la stéréochimie des NPs squalénées encapsulant des principes actifs.

Titre : *Caractérisation des nanoparticules siRNA-SQ et étude de leur transport et internalisation*

Mots clés : siRNA – nanoparticules – squalène – thérapie ciblée – transport

Résumé : Les siRNA constituent une thérapie ciblée pour les cancers à oncogène de fusion (réarrangement chromosomique se produisant uniquement dans les cellules tumorales) et les maladies monogéniques neurodégénérative comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth (pathologie démyélinisante du système nerveux périphérique). En effet, les siRNA sont spécifiques de la séquence d'ARNm d'un gène cible à inhiber, mais sont instables dans les milieux biologiques. Pour les protéger de la dégradation et les véhiculer, nous avons conjugué, par chimie clic sans cuivre le brin sens du siRNA à un lipide naturel précurseur du cholestérol, le squalène (SQ). Le bioconjugué résultant est ensuite hybridé avec le brin antisens puis nanoprecipité. Notre étude s'est intéressée à étudier les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules siRNA-SQ (NPs) et à montrer les interactions se produisant *in vivo* avec le sérum. La compréhension des mécanismes impliqués dans le transport et l'internalisation des NPs a pour objectif de proposer une nanomédecine personnalisée basée sur l'utilisation des NPs siRNA-SQ. Nos résultats montrent qu'en solution aqueuse, les NPs siRNA-SQ ont un diamètre d'environ 200 nm de diamètre, sont chargées négativement (potentiel $\zeta \sim -35$ mV) et de forme sphérique. Par des méthodes physicochimiques et biologiques, nous montrons que les NPs siRNA-SQ interagissent avec les deux principales composantes du sang, l'albumine et les lipoprotéines de basse densité, permettant leur transport vers les tissus cibles (tumeurs et nerfs périphériques). Les NPs siRNA-SQ ont montré une efficacité thérapeutique dans différents modèles pathologiques corrélée avec une inhibition des gènes cibles. Cependant, *in vitro*, aucune activité inhibitrice n'a été observée sans utilisation d'un agent transfectant. Nos expériences montrent que la charge négative de ces NPs empêche leur internalisation par répulsion électrostatique avec la membrane cellulaire également chargée négativement. En présence des composantes du sérum, la charge négative des NPs siRNA-SQ est neutralisée. Pour conclure, nous montrons qu'après injection intraveineuse, les NPs siRNA-SQ interagissent avec les composantes majeures du sang, sont transportées par les lipoprotéines pour être internalisées dans le tissu pathologique.

Title : *Characterization of siRNA-SQ nanoparticles and study of their transport and internalization*

Keywords : siRNA – nanoparticles – squalene – targeted therapy – transport

Abstract: The siRNA are a targeted therapy for cancers with fusion oncogenes (chromosomal rearrangement occurring only in tumor cells) and neurodegenerative monogenic diseases such as Charcot-Marie-Tooth disease (demyelinating pathology of the peripheral nervous system). Indeed, siRNAs are specific for the mRNA sequence of a target gene to be inhibited but are unstable in biological media. To protect them from degradation and to transport them, we have conjugated, by copper-free click chemistry, the sense strand of the siRNA to a natural lipid precursor of cholesterol, squalene (SQ). The resulting bioconjugate is then hybridized with the antisense strand and nanoprecipitated. Our study focused on studying the physicochemical characteristics of siRNA-SQ nanoparticles (NPs) and showing the interactions occurring *in vivo* with the serum. The understanding of the mechanisms involved in the transport and internalization aims to propose a personalized nanomedicine based on the use of siRNA-SQ NPs. Our results show that in aqueous solution, siRNA-SQ NPs have a diameter of about 200 nm, are negatively charged (potential $\zeta \sim -35$ mV) and spherical in shape. Using physicochemical and biological methods, we show that siRNA-SQ NPs interact with the two main components of blood, albumin and low-density lipoproteins, allowing their transport to target tissues (tumors and peripheral nerves). siRNA-SQ NPs have shown therapeutic efficacy in different pathological models correlated with inhibition of target genes. However, *in vitro*, no inhibitory activity was observed without the use of a transfecting agent. Our experiments show that the negative charge of these NPs prevents their internalization by electrostatic repulsion with the cell membrane also negatively charged. In the presence of serum components, the negative charge of siRNA-SQ NPs is neutralized. To conclude, we show that after intravenous injection, siRNA-SQ NPs interact with the major components of the blood, are transported by lipoproteins to be internalized in the pathological tissue.

