



**HAL**  
open science

# Développement d'une nouvelle approche théranostique ciblant la réponse télomérique dans les cellules cancéreuses radio-résistantes du poumon

Sean Moro

► **To cite this version:**

Sean Moro. Développement d'une nouvelle approche théranostique ciblant la réponse télomérique dans les cellules cancéreuses radio-résistantes du poumon. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV114 . tel-04614253

**HAL Id: tel-04614253**

**<https://theses.hal.science/tel-04614253v1>**

Submitted on 17 Jun 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)

**Développement d'une nouvelle approche théranostique ciblant la réponse télomérique dans les cellules cancéreuses radio-résistantes du poumon**

**Development of a new theranostic approach targeting telomeric response in radio-resistant lung cancer**

Présentée par :

**Sean MORO**

Direction de thèse :

**Virginie FAURE**

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

**Olivier RENAUDET**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

**Elisabeth GARANGER**

CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Aquitaine

**Cyrille RICHARD**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Paris Centre

Thèse soutenue publiquement le **15 décembre 2023**, devant le jury composé de :

**Ahcène BOUMENDJEL**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

**Elisabeth GARANGER**

CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Aquitaine

Rapporteuse

**Cyrille RICHARD**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Paris Centre

Rapporteur

**May MORRIS**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Occitanie Est

Examinatrice

**Virginie FAURE**

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

**Olivier RENAUDET**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse





# Sommaire

<b>Sommaire</b>	2
<b>Avant-propos</b>	5
<b>Abréviations</b>	7
<b>Résumé</b>	9
<b>Abstract</b>	10
<b>Introduction bibliographique</b>	11
<b>I. Le cancer du poumon</b>	11
I.1 Généralités	12
I.1.1 La maladie et ses déclinaisons	12
I.1.2 Incidence	14
I.2 Les thérapies utilisées actuellement contre le cancer du poumon	16
I.2.1 Chimiothérapie et thérapies ciblées	16
I.2.2 L'immunothérapie	17
I.2.3 La chirurgie	18
I.2.4 La radiothérapie	19
<b>II. Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique</b>	23
II.1 Biologie des télomères	24
II.1.1 Structure	24
II.1.2 Le complexe shelterin (ou télosome)	26
II.1.3 La réponse télomérique et la radiosensibilité cellulaire	27
II.2 Les siARNs pour la thérapie	33
II.2.1 Structure et fonction des siARNs	33
II.2.2 Découvertes et avancées	35
II.2.3 Les contraintes à l'utilisation de siARN en thérapie et les solutions envisagées	36
II.2.4 Les systèmes de diffusion des siARNs pour la thérapie	38
<b>III. Les nanoclusters d'or pour la thérapie anti-cancer</b>	45
III.1 Généralités	46
III.2 Les propriétés optiques des AuNCs	48
III.2.1 Photoluminescence	48
III.2.2 Les AuNCs comme agents de contraste	50
III.3 Les propriétés des AuNCs pour la thérapie	53
III.3.1 Vectorisation de biomolécules	53
III.3.2 Propriétés radiosensibilisantes	55
III.3.3 Propriétés photothermique et photodynamique	56
III.3.4 Effet d'augmentation de la perméabilité et de la rétention (EPR)	57

---

<b>IV. La surexpression des transporteurs du glucose dans le développement et le ciblage tumoral</b>	59
IV.1 Le transport du glucose dans l'organisme	60
IV.1.1 Les transporteurs GLUTs	61
IV.2 Les transporteurs GLUTs pour le ciblage actif des cellules tumorales	67
IV.2.1 Effet Warburg et surexpression tumorale des GLUTs	67
IV.2.2 L'utilisation de glycoconjugués en thérapie anti-cancer	69
<b>Objectif du travail de thèse</b>	73
<b>Contexte</b>	74
<b>Objectifs</b>	75
<b>Résultats</b>	78
<b>I. Synthèse et caractérisation de nanoclusters d'or</b>	78
I.1 Procédure de synthèse des nanoclusters d'or	80
I.2 Propriétés des nanoclusters d'or synthétisés	83
I.2.1 Taille des AuNCs	83
I.2.2 Charges des AuNCs synthétisés	84
I.2.3 Propriétés optiques	88
I.2.4 Diffusion des AuNCs à travers des membranes lipidiques artificielles	90
I.2.5 Cytotoxicité	93
I.3 Conclusion chapitre 1	95
<b>II. Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon</b>	96
II.1 Complexation de siARNs anti TRF2 aux nanoclusters d'or	97
II.1.1 Efficacité de complexation du siARN aux AuNCs	98
II.1.2 Evaluation de la taille et de la charge des complexes AuNCs/siARNs	100
II.1.3 Etude spectrale des complexes AuNCs/siARNs	102
II.2 Transfection du complexe AuNCs/siARNs anti TRF2 dans les cellules cancéreuses	106
II.2.1 Etude de la protection du siARN par les AuNCs	107
II.2.2 Etude de la pénétration cellulaire par microscopie confocale à fluorescence	108
II.2.3 Etude de l'inhibition de l'expression de la protéine TRF2 par les complexes AuNCs/siARNs et conséquence sur la survie cellulaire	112
II.3 Conclusion chapitre 2	117
<b>III. Synthèse de glycoconjugués pour l'optimisation du ciblage du nanosystème AuNCs/siARNs</b>	118
III.1 Synthèse des glycoconjugués	122
III.1.1 Généralités sur la chimie « click » ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC)	122
III.1.2 Synthèse des Glucoses propargylés en 1 et en 6	122
III.1.3 Synthèse d'une plateforme cyclodécapeptide (RAFT)	124
III.1.4 Synthèse des glycoconjugués monovalents	126

---

III.1.5	Synthèse des glycoconjugués tétravalents _____	128
III.2	Etude de l'interaction et de la pénétration cellulaire des glycoconjugués _____	133
III.2.1	Interaction des glycoconjugués avec des lignées cancéreuses pulmonaires _____	133
III.3	Formation du nanosystème AuNCs/siARNs/ glycoconjugués et étude de l'inhibition de TRF2 143	
III.3.1	Synthèse et caractérisations du nanosystème AuNCs/siARNs/glycoconjugués _____	143
III.4	Conclusion chapitre 3 _____	148
<b>Discussion et perspectives</b> _____		149
<b>Partie expérimentale</b> _____		163
1.	Synthèse des nanoparticules d'or _____	164
2.	Electrophorèse sur gel d'agarose _____	164
3.	Mesure de Potentiel Zêta et diffusion dynamique de la lumière (DLS) _____	165
4.	Mesures optiques _____	165
5.	Culture cellulaire et transfection de siARN anti TRF2 _____	165
6.	Cytotoxicité _____	166
7.	Western Blot _____	166
9.	Irradiation et test clonogénique _____	167
10.	Cytométrie en flux _____	168
11.	Synthèses chimiques _____	168
<b>Annexes</b> _____		187
<b>Remerciements</b> _____		190
<b>Table des figures</b> _____		193
<b>Bibliographie</b> _____		199

---

# Avant-propos



Mon projet de thèse intitulé « Développement d'une nouvelle approche théranostique ciblant la réponse télomérique dans les cellules cancéreuses radio-résistantes du poumon », encadré par le Dr. Virginie FAURE et co-encadré par le Pr. Olivier RENAUDET, s'est déroulé entre deux laboratoires à Grenoble d'octobre 2020 à septembre 2023. Le premier laboratoire est l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB, La Tronche) dans l'équipe « Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer » dirigée par le Dr. Jean-Luc COLL. Le second est le Département de Chimie Moléculaire (DCM NanoBio, campus universitaire de Grenoble) dans l'équipe « Ingénierie et Interaction Biomoléculaires » gérée par le Dr. Didier BOTURYN. Il s'agit d'un projet multidisciplinaire, qui englobe les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire, la chimie et la biophysique, ayant comme thème principal la thérapie anti-cancer.

Dans un contexte clinique actuel où des phénomènes de résistances à la radiothérapie sont trop souvent observés chez des patients atteints de cancer, et particulièrement du poumon, l'objectif de mon projet est de développer un système avec des propriétés radiosensibilisantes pour améliorer les traitements contre cette maladie. Ce système est basé sur l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) capables de vectoriser un petit ARN interférent (siARN) ciblant la protéine TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 2) impliquée dans les phénomènes de radiorésistance. Dans le but d'améliorer le ciblage des cellules tumorales spécifiquement, ce système est également modifié par l'ajout de glycoconjugués afin de cibler les transporteurs de sucres (GLUTs) surexprimés dans une large population de cellules cancéreuses.

Les AuNPs et les glycoconjugués ont été synthétisés et caractérisés au DCM avant d'être testés sur des cellules cancéreuses *in vitro* à l'IAB. Cela a été l'occasion pour moi de travailler à l'interface entre deux équipes scientifiques aux disciplines et aux modes de fonctionnement différents. La première année de ma thèse s'est principalement déroulée au DCM et a été consacrée à l'appropriation des différents aspects du projet, à la réalisation de formations Doctorales et à la maîtrise des outils qui m'ont permis de réaliser les synthèses chimiques. A partir de la deuxième année et jusqu'au terme, l'essentiel du travail a eu lieu à l'IAB où j'ai réalisé les expérimentations sur cellules avec des composés synthétisés au DCM en parallèle.

Ce manuscrit a été organisé en plusieurs parties. La première est une introduction bibliographique apportant les notions nécessaires à la compréhension du contexte général et à l'état de l'art. La deuxième partie présentera les principaux objectifs du projet ainsi que la manière dont il a été organisé. Ensuite, les résultats obtenus seront présentés sous forme de 3 chapitres. Le premier chapitre traitera des travaux réalisés sur les AuNPs seules, le deuxième abordera les tests cellulaires avec le nanosystème AuNPs/siARNs dirigé contre TRF2, puis le chapitre 3 traitera de la synthèse et de l'utilisation de glycoconjugués dans le cadre du ciblage des transporteurs de sucres. Finalement la dernière partie présentera la conclusion générale du projet ainsi que les perspectives que celui-ci apporte.

# Abréviations

## A

<b>AA</b>	Acide aminé
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>AuNPs</b>	Nanoparticules d'or
<b>AuNCs</b>	Nanoclusters d'or

## B

<b>Boc</b>	tert-Butoxycarbonyle
------------	----------------------

## C

<b>C</b>	Cystéine
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>CuAAC</b>	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre
<b>Cy5</b>	Cyanine 5

## D

<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DIPEA</b>	N,N-Diisopropyléthylamine
<b>DLS</b>	Dynamic Light Scatering
<b>DMF</b>	N,N-Diméthylformamide
<b>DOPC</b>	Dioleoylphosphatidylcholine
<b>DOPE</b>	Dioleoylphosphatidylethanolamine
<b>DOPS</b>	Dioleoylphosphatidylserine

## E

<b>EPR</b>	Enhanced Permeability and Retention
------------	-------------------------------------

## F

<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FITC</b>	Isothiocyanate de fluorescéine
<b>Fmoc</b>	Fluorénylméthoxycarbonyle

## G

<b>Glc</b>	Glucose
<b>Glu</b>	Acide glutamique
<b>GLUT</b>	Glucose transporter
<b>Gly</b>	Glycine

## H

<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry
<b>HRTEM</b>	High Resolution Transmission Electron Microscopy

## I

<b>IR</b>	Infrarouge
-----------	------------

## K

<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>Km</b>	Constante de Michaelis

## L

<b>LNP</b>	Nanoparticule lipidique
<b>Lys</b>	Lysine

## M

<b>MALDI</b>	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>MS</b>	Mass Spectrometry

## N

<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimide
<b>NIR</b>	Near Infrared

## P

<b>Pb</b>	Paire de base
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PL</b>	Photoluminescence
<b>Pro</b>	Proline
<b>PyBOP</b>	Benzotriazol-1-yl-oxytrypirrolidinophosphonium hexafluorophosphate

## R

<b>R</b>	Arginine
<b>RAFT</b>	Regioselectively Addressable Functionalized Template
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RP-HPLC</b>	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

## S

<b>SG</b>	Gluthation
<b>SGLT</b>	Sodium Glucose Linked Transporter
<b>shARN</b>	Petit ARN en épingle à cheveux
<b>siARN</b>	Petit ARN interférent
<b>SPPS</b>	Solid Phase Peptide Synthesis
<b>SPR</b>	Surface Plasmon Resonance
<b>SUV</b>	Standardized Uptake Value
<b>SWIR</b>	Short Wave Infrared

## Abréviations

---

### I

<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>THPTA</b>	Tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine
<b>TIS</b>	Triisopropylsilane
<b>TRF2</b>	Telomeric Repeat binding Factor 2

### U

<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>UV</b>	Ultraviolet

## Résumé

De nos jours, l'apparition de cellules tumorales du poumon résistantes aux traitements par radiothérapie représente un défi clinique majeur. Il a été montré que la déprotection des télomères sensibilise les cellules cancéreuses à la radiothérapie. L'un des principaux acteurs de la protection télomérique est la protéine TRF2 et une baisse de l'expression de cette protéine se traduit par des dommages à l'ADN ainsi que des cellules plus sensibles aux radiations ionisantes. Le développement de composés ciblant TRF2 combinés aux radiations ionisantes représente donc une approche prometteuse pour améliorer l'effet de la radiothérapie.

Notre projet propose le développement d'un système de radiosensibilisation pour lutter contre la radiorésistance des cellules tumorales. Nous utilisons des nanoparticules d'or (AuNPs), notamment connues pour être capables de pénétrer dans les cellules passivement (effet EPR) et pour être des agents radiosensibilisants. En raison de leur chimie de surface polyvalente, les AuNPs sont aussi utilisées comme nanoporteuses de biomolécules, et dans le cadre de notre projet, de siARN ciblant la protéine TRF2. Récemment, l'importance et l'existence de l'effet EPR ont fait l'objet de nombreux débats dans la communauté scientifique, et il s'avère que le mécanisme par lequel les nanoparticules pénètrent dans les tumeurs reste encore parfois controversé. Pour cette raison, nous avons cherché à apporter en plus un ciblage spécifique des cellules tumorales en greffant une partie glucidique à la surface des AuNPs afin de cibler les transporteurs GLUTs, qui sont surexprimés dans une large variété de cancers.

Nous avons décidé que la structure générale du nanosystème serait composée de deux parties : une partie AuNPs, constituée de chaînes de polyarginines apportant une charge globale positive, nécessaire à l'interaction avec un siARN, et une partie glucidique, que l'on viendrait par la suite greffer à la partie AuNPs. Après la synthèse et la caractérisation du nanosystème, des études cellulaires *in vitro* ont été initiées. Par la suite, des études de complexation des AuNPs avec des siARNs ont confirmé que les siARNs étaient capables de se lier aux AuNPs. La capacité d'interaction et de pénétration cellulaire des complexes AuNPs/siARNs a également été validée par FACS et microscopie confocale à fluorescence. L'efficacité du complexe au niveau de l'inhibition du gène codant pour TRF2 a été analysée par western blot et a montré une diminution significative du taux d'expression de cette protéine. Finalement, l'impact de l'inhibition de l'expression de TRF2 sur l'induction d'une radiosensibilité cellulaire a été évalué par des études de survie cellulaire qui ont montré des résultats préliminaires encourageants.

# Abstract

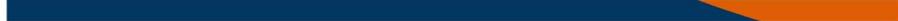
Nowadays, the emergence of lung cancer cells resistant to radiotherapy represents a major clinical challenge. Telomere deprotection has been shown to sensitize cancer cells to radiotherapy. One of the key players in telomere protection is the TRF2 protein, and reduced expression of this protein results in DNA damage and cells that are more sensitive to ionizing radiation. The development of compounds targeting TRF2 in combination with ionizing radiation therefore represents a relevant approach to improve the effect of radiotherapy.

Our project proposes the development of a radiosensitizing system to fight against the radioresistance of tumor cells. We are using gold nanoparticles (AuNPs), known in particular for their ability to penetrate cells passively (EPR effect) and as radiosensitizing agents. Thanks to their versatile surface chemistry, AuNPs are also used as nanocarriers for biomolecules, and in our project, for siRNAs targeting TRF2. Recently, the importance and existence of the EPR effect has been the subject of much debate in the scientific community, and it turns out that the mechanism by which nanoparticles penetrate tumors is more complex than previously thought. With this in mind, we sought to improve the specific targeting of tumor cells by grafting a carbohydrate moiety onto the surface of AuNPs in order to target GLUTs transporters, which are overexpressed in a wide variety of cancers.

We decided that the general structure of the nanosystem would be composed of two parts : a gold nanoparticle part, made of polyarginine chains providing the overall positive charge required for interaction with a siRNA, and a carbohydrate part, which would be added to the AuNPs part. Following the synthesis and characterization of the nanosystem, in vitro cellular studies were initiated. Subsequently, complexation studies of AuNPs with siRNAs confirmed that siRNAs were capable of binding to AuNPs. The ability of AuNPs/siRNAs complexes to interact and penetrate cells was also validated by FACS and confocal microscopy. The efficacy of the complex in inhibiting TRF2 was analyzed by western blot and showed a significant reduction in expression levels of this protein. Finally, the impact of TRF2 expression inhibition on the induction of cellular radiosensitivity was assessed by cell survival studies with encouraging preliminary results.

---

# **Introduction bibliographique**



---

## **I. Le cancer du poumon**

---

# I.1 Généralités

## I.1.1 La maladie et ses déclinaisons

Le cancer du poumon, aussi appelé carcinome pulmonaire, apparaît suite à des mutations au sein de certains gènes spécifiques à l'intérieur des cellules du tissu pulmonaire, en particulier des bronches ou des alvéoles pulmonaires. Ces mutations sont caractérisées par une altération du génome des cellules pulmonaires, altérant la synthèse de biomolécules clés pour la réparation des dommages à l'ADN et plus particulièrement dans le contrôle du cycle ou de la prolifération cellulaire. Cette perturbation génétique conduit finalement à une division incontrôlée et de manière quasi infinie des cellules dites alors « mutées ». Au cours du temps, une masse de ces cellules mutées appelée « tumeur » apparaît dans l'organe où se sont multipliées anarchiquement les cellules. Lorsque les cellules tumorales sont restreintes, on parle de tumeurs bénignes. En revanche si elles deviennent envahissantes pour les tissus environnants on parle alors de tumeurs malignes. Les tumeurs malignes forment un microenvironnement complexe composé de plusieurs types de cellules et entraînent progressivement la détérioration des fonctions physiologiques de l'organe (**Figure 1**).

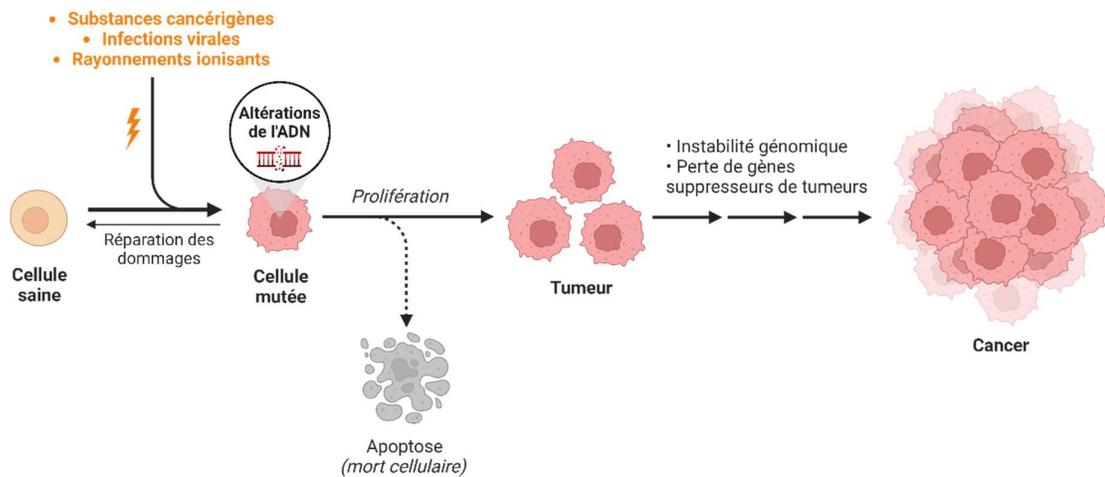


Figure 1 : Illustration simplifiée du développement d'un cancer.

Les facteurs de risques qui conduisent à ces mutations cellulaires à l'origine des cancers sont tous majoritairement dus à l'exposition chronique à des substances dites cancérigènes, donc susceptibles de provoquer un cancer en induisant des dommages à l'ADN des individus en contact avec celles-ci. Les sources de ces substances sont multiples et diffèrent principalement en fonction du niveau de développement des pays mais aussi de la géographie. En effet, la principale source est celle liée à la consommation directe ou indirecte de tabac, où les consommateurs s'exposent à plus de 60 cancérigènes connus [1], ce qui représente la principale cause de cancer du poumon [2]. On retrouve également ces substances nocives dans l'alimentation ou bien dans l'air que l'on respire. Les sources de ces substances

cancérogènes sont aussi liées aux activités industrielles à grande échelle (bâtiments, métallurgie et épandage agricole notamment) avec l'utilisation massive de matériaux ou produits chimiques toxiques, les transports quotidiens (aériens, maritimes et routiers) ou bien encore l'utilisation d'appareils de chauffage nécessitant des combustibles fossiles. A noter aussi que les risques de développer un cancer peuvent également être plus « naturels » et aléatoires, notamment provenant de mutations génomiques liées à certaines maladies infectieuses (papillomavirus, hépatites B et C), à l'exposition aux rayonnements ionisants terrestres (dérivés de l'uranium) ou bien en fonction de combinaisons de facteurs génétiques (héréditaires ou non).

Le cancer du poumon est une maladie hétérogène dont les caractéristiques cliniques et pathologiques sont très variées. En fonction de l'origine des cellules pulmonaires atteintes, le cancer du poumon est classé en deux principaux types [3] :

- **Le cancer du poumon dit « à petites cellules » (CPPC)**, qui représente environ 15% du total des cancers diagnostiqués.
  
- **Les cancers du poumon dits « à cellules non petites » (CPNPC)**, eux-mêmes divisés en trois catégories :
  - L'adénocarcinome pulmonaire : qui représente la forme la plus courante de cancer du poumon (40%). Il se développe dans les cellules de l'épithélium glandulaire situées dans la partie externe des poumons.
  - Le carcinome épidermoïde : il s'agit d'environ 30% de l'ensemble des cancers du poumon. Ils sont plus fréquents chez les hommes que chez les femmes et contrairement aux adénocarcinomes ils ont plus tendance à se développer au centre du poumon.
  - Le carcinome à grandes cellules : représentant finalement les 15% restants. Ces cancers ont tendance à se développer rapidement et passent généralement inaperçus jusqu'à ce qu'ils aient formé des métastases.

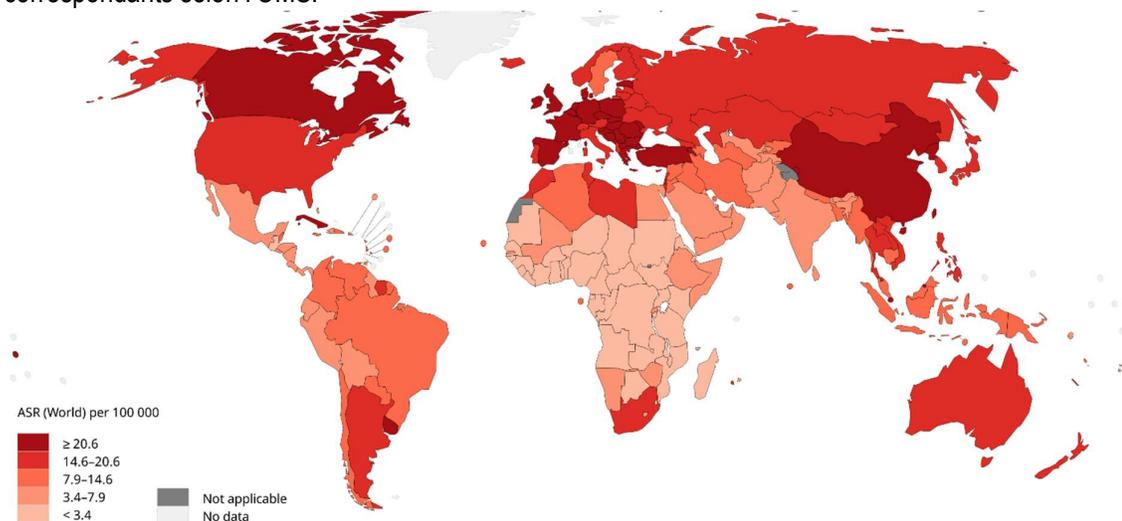
Une fois le type de cancer identifié, un processus dit de « stadification » permet de définir le stade de la maladie. Celui-ci décrit globalement l'état de développement de la maladie dans l'organisme du patient atteint et permet de déterminer la gravité du cancer ainsi que la meilleure façon de le traiter. On utilise également le stade d'un cancer lorsque l'on parle des statistiques de survie. En l'absence de traitement efficace, les cellules cancéreuses se propagent dans un premier temps dans les poumons en endommageant gravement les fonctions respiratoires, puis peuvent également s'implanter dans d'autres organes pour les altérer à leur tour, on parle alors de métastases.

Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons essentiellement sur les CPNPC. Selon la American Cancer Society (ACS), les CPNPC sont classés en 5 stades (0, I, II, III et IV) qui sont déterminés en fonction de la taille des tumeurs et de leur état de propagation dans l'environnement proche (ganglions lymphatiques) ou plus distant (métastases). Pour simplifier, on peut dire que plus le stade est élevé plus le cancer est développé et difficile à traiter, mais il faut garder à l'esprit que l'évolution de la maladie est unique pour chaque personne.

## I.1.2 Incidence

Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus répandus au monde et représente la première cause de décès liés au cancer dans le monde [4]. En 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé à 2 millions le nombre de nouveaux cas diagnostiqués et 1,8 million le nombre total de décès dans le monde. De nos jours en France, cela représente presque 50 000 nouveaux cas chaque année pour 37 000 décès.

Concernant l'incidence de cette maladie, il a été montré qu'actuellement elle variait en fonction du degré de développement d'un pays. Pour illustrer ce propos, la **Figure 2** représente une carte du monde où sont représentés les taux de mortalité liés aux cancers du poumon lors de l'année 2020 dans le monde et normalisés selon l'âge d'individus hommes et femmes confondus. Le taux de mortalité standardisé en fonction de l'âge est une moyenne pondérée des taux de mortalité par classes d'âge pour 100 000 personnes, où les pondérations sont les proportions de personnes dans les groupes d'âge correspondants selon l'OMS.



**Figure 2 : Taux de mortalité lié aux cancers du poumon dans le monde en 2020 normalisé selon l'âge d'individus hommes et femmes. ASR : Age-Standardized Rate. Issue de GLOBOCAN 2020.**

On remarque tout de suite la tendance d'une mortalité souvent plus élevée dans les pays développés, qui peut être directement en lien avec des expositions importantes à des substances cancérigènes dans

ces pays, mais aussi à la présence de certaines maladies infectieuses. Cela peut aussi être relatif à des populations plus vieillissantes dans ces pays-là. A noter toutefois que de nouveaux diagnostics de cancer du poumon continuent aussi d'augmenter dans les pays à faibles revenus, où les initiatives de santé publique en faveur du sevrage tabagique ont pris du retard et où l'accès aux soins de santé est limité [5].

## I.2 Les thérapies utilisées actuellement contre le cancer du poumon

La plupart des stratégies diagnostique et thérapeutique pour lutter contre le cancer ont été développées dans le but de contrôler, limiter et supprimer la croissance et la division des cellules cancéreuses qui détériorent peu à peu les tissus dans lesquels elles sont implantées. Dans le traitement du cancer, le plus important est son diagnostic précoce et précis, qui est généralement effectué par des techniques d'imageries médicales telles que la tomодensitométrie (CT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positrons (TEP) ou bien l'échographie [6]. Cependant, ces techniques d'investigation et d'imageries ne sont pas toujours assez polyvalentes pour fournir des informations cliniques complètes sur les différents types et stades des tumeurs, ce qui rend difficile la réussite du traitement et l'amélioration de l'état des patients [7]. L'une des principales difficultés est que le diagnostic est souvent trop tardif, jusqu'à ce que le cancer devienne métastatique et donc encore plus compliqué à traiter à cause de sa diffusion dans d'autres organes. En complément aux techniques d'imageries, d'autres outils pour la détection et la stadification existent, nous pouvons citer par exemple l'utilisation de certains biosenseurs, des systèmes portant des sondes fluorescentes et capables de reconnaître des biomarqueurs spécifiques du cancer [8].

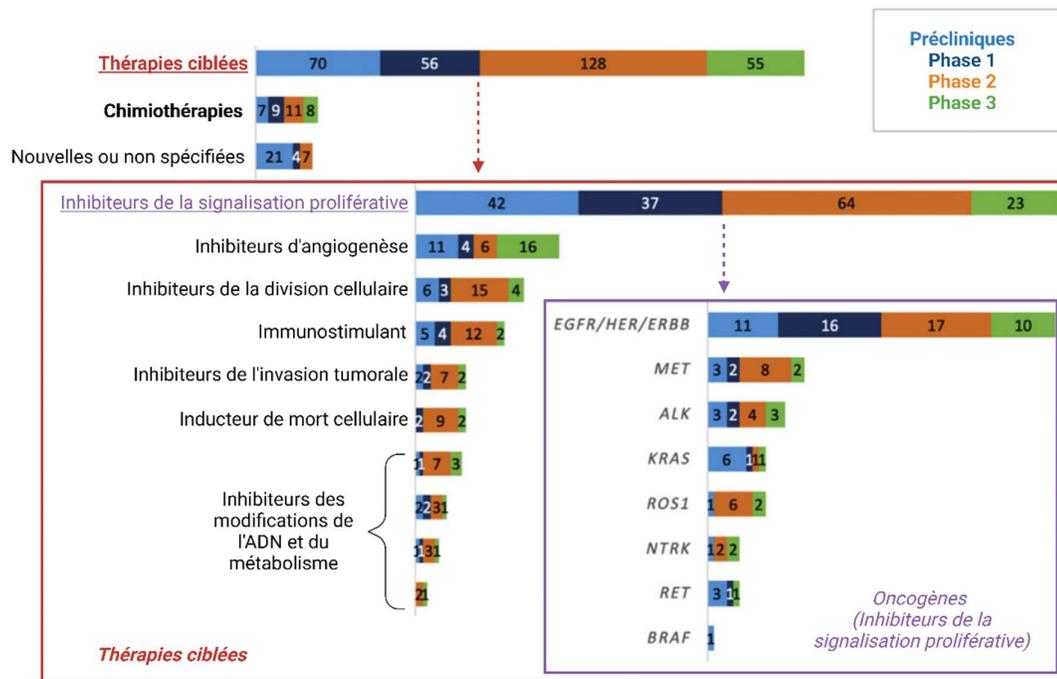
Finalement, en fonction du stade, de l'histologie, des altérations génétiques et de l'état du patient, les approches thérapeutiques sont multiples et complexes. Nous nous intéresserons dans cette partie surtout aux thérapies conventionnelles qui comprennent la chimiothérapie, l'immunothérapie, la chirurgie et la radiothérapie, chacune utilisée seule ou de manière combinée.

### I.2.1 Chimiothérapie et thérapies ciblées

La chimiothérapie est un traitement consistant en l'administration de substances médicamenteuses qui agissent sur les cellules cancéreuses, soit en induisant la mort cellulaire, soit en les empêchant de se multiplier davantage. En ce qui concerne les cancers du poumon, elle est surtout utilisée seule ou en complément à de la radiothérapie lors des stades III et IV notamment [9]. Il s'agit d'un traitement peu spécifique qui élimine non seulement les cellules cancéreuses à croissance rapide, mais aussi les cellules saines qui se développent et se divisent rapidement (cellules qui tapissent la bouche, les intestins ou bien celles qui assurent la croissance des cheveux). La chimiothérapie entraîne par conséquent une toxicité systémique et des effets indésirables non négligeables, tels que des lésions buccales, des nausées ou encore la perte des cheveux. Certaines drogues à base de métaux lourds tel que le cisplatine sont également utilisées, cependant les taux de rechute restent élevés et là encore une toxicité relativement importante est observée [10]. Finalement l'efficacité de la chimiothérapie dépend surtout du stade plus

ou moins avancé de la maladie, mais aussi du respect des posologies qui sont souvent très conséquentes et non sans séquelles physiques et sociales pour les patients.

Là où le spectre d'action de la chimiothérapie classique est large et peu spécifique, les thérapies ciblées anti-cancer quant à elles tendent à être plus spécifiques des cellules cancéreuses et visent des mécanismes moléculaires liés à la prolifération ou au cycle cellulaire. Ce type de thérapie est particulièrement moins cytotoxique et présente moins d'effets secondaires comparé à la chimiothérapie. La **Figure 3** résume les utilisations actuelles en essais cliniques de ces différentes thérapies médicamenteuses non basées sur l'immunothérapie pour lutter contre les CPNPC.



**Figure 3 : Thérapies médicamenteuses non basées sur l'immunothérapie et dirigées contre les cancers du poumon à cellules non petites.** Issue et adaptée de Dhruva Deb et al. 2022.

On remarque clairement l'intérêt grandissant pour les thérapies ciblées qui sont presque 10 fois plus utilisées comparé à la chimiothérapie classique. Elles sont principalement basées sur l'utilisation de drogues telles que des inhibiteurs de la signalisation proliférative et plus particulièrement de certains oncogènes avérés comme la famille EGFR/HER2/ERBB2, des facteurs de croissance épidermique [11].

### I.2.2 L'immunothérapie

L'immunothérapie antitumorale est basée sur l'exploitation du système immunitaire de l'hôte. L'un des objectifs de cette méthode est de stimuler le système immunitaire afin d'éliminer les cellules cancéreuses tout en ne produisant pas de réponses inflammatoires auto-immunes incontrôlées [12].

Brièvement, pour lutter contre les cellules tumorales le système immunitaire fait appel à plusieurs leucocytes provenant des immunités innée et adaptative. L'immunité innée se limite à la libération de cytokines qui recrutent des cellules immunitaires pour amorcer la réponse immunitaire non spécifique. Le système immunitaire adaptatif lui joue un rôle beaucoup plus important dans la réponse immunitaire aux cellules cancéreuses en raison de sa capacité à cibler spécifiquement certains antigènes. Parmi les cellules immunitaires les plus impliquées dans la dégradation des cellules tumorales on retrouve notamment les lymphocytes T cytotoxique ( $\gamma\delta$ ) et NK (natural killer). L'activation de ces lymphocytes est soumise à des points de contrôle immunitaires qui ont pour objectif de réguler la réponse immunitaire, empêchant par exemple le système immunitaire d'attaquer les cellules sans discernement (saines/affectées). La problématique est que certaines cellules cancéreuses ont la capacité de se protéger de l'élimination par le système immunitaire en stimulant les cibles de ces points de contrôle immunitaires, et donc d'empêcher l'activation des cellules immunitaires.

L'immunothérapie est par conséquent principalement basée sur l'emploi de principes actifs (anticorps monoclonaux, interféron ou cytokines), permettant de réduire la prolifération cellulaire et/ou de moduler l'activité de ces points de contrôle immunitaires responsables de l'activation ou de la répression des cellules immunitaires. Les plus connus sont les inhibiteurs anti PD-1/PD-L1 et anti CTLA4 qui permettent d'empêcher la répression des cellules immunitaires par les cellules tumorales [13].

Bien que l'immunothérapie se soit imposée comme un outil puissant dans l'arsenal de lutte contre le cancer, des effets indésirables liés à des phénomènes d'auto-immunité sont encore malheureusement souvent observés [14]. Cependant, il est à noter que malgré les effets indésirables, ces thérapies innovantes ciblant le système immunitaire sont généralement mieux tolérées que les agents chimiothérapeutiques traditionnels. De plus, il s'agit d'un domaine innovant qui continue de se développer à mesure que la recherche découvre de nouvelles cibles potentielles [15].

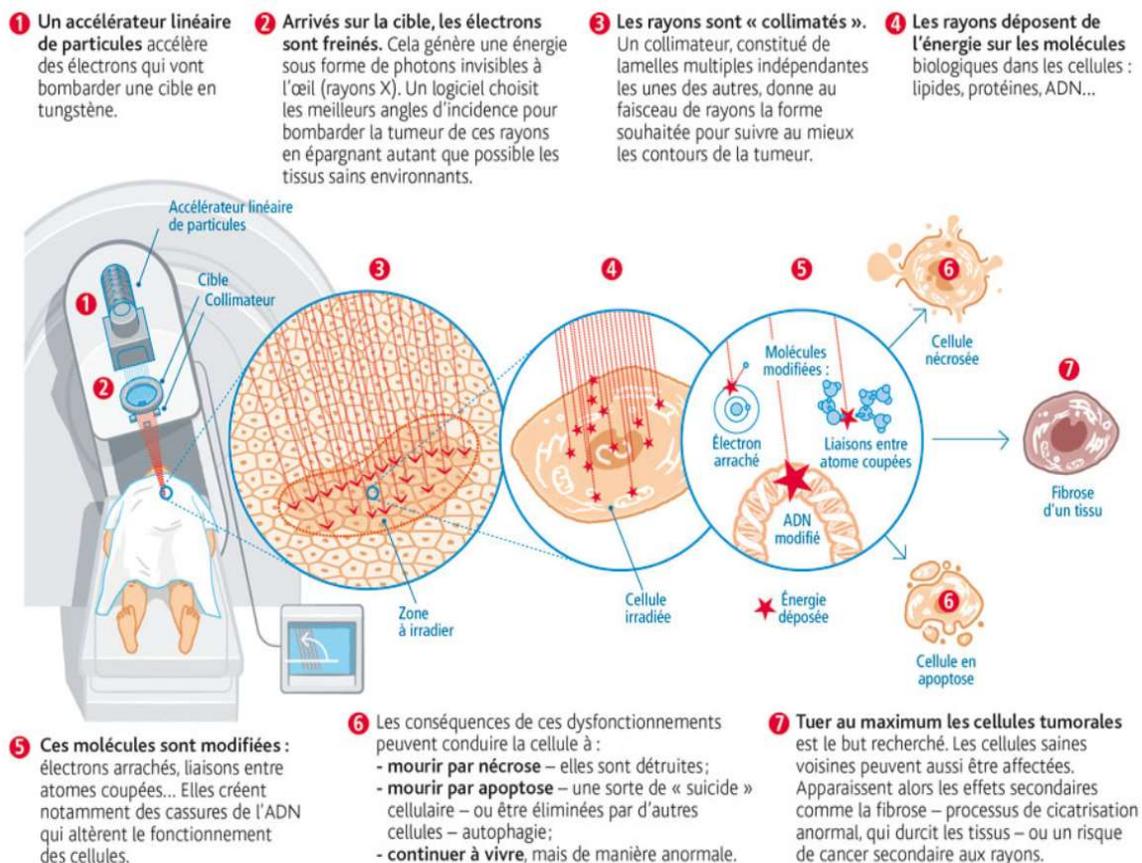
### I.2.3 La chirurgie

La résection chirurgicale à visée curative est surtout recommandée pour les patients médicalement aptes et présentant un cancer au stade précoce. Pour les CPNPC de stade I et II, la majorité des patients (69 %) subissent une intervention chirurgicale, et environ 25 % des cas chirurgicaux reçoivent également une chimiothérapie et/ou une radiothérapie en complément [9]. Récemment l'utilisation d'agents de contrastes, qu'on abordera plus en détail dans le chapitre 3, émettant notamment dans les régions de l'infrarouge en aide à la chirurgie, permet de mettre en évidence le microenvironnement tumoral pour assister le chirurgien lors de l'opération. Ceci permet d'éviter à la fois le « sur-découpage », c'est-à-dire

l'altération de tissus sains aux alentours de la tumeur, mais aussi le « sous-découpage », qui laisserait des cellules tumorales résiduelles qui se multiplieraient de nouveau après l'intervention.

## I.2.4 La radiothérapie

Dans le cadre de ce projet de thèse traitant de la problématique de radorésistance des cellules cancéreuses, une attention plus particulière sera portée à la radiothérapie. De plus, il s'avère que c'est la seule modalité de traitement pour laquelle il existe des indications à tous les stades de la maladie. La technique consiste à délivrer localement aux patients une dose de radiations ionisantes (composées notamment de faisceaux de rayons X et d'électrons de haute énergie) qui cause une accumulation de dommages au niveau de l'ADN des cellules tumorales et favorise leur élimination. Le principe général de ce genre d'intervention est résumé sur la **Figure 4**.



**Figure 4 : Principe et conséquences de la radiothérapie.** Figure issue de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).

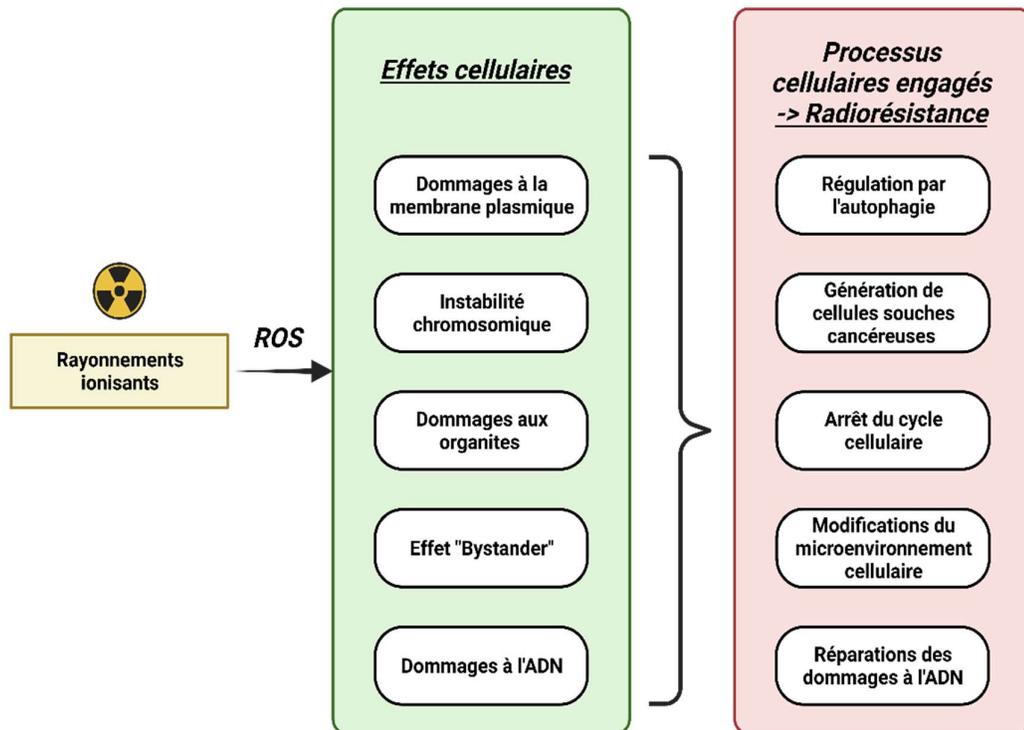
Les rayons traversent les tissus et induisent un stress oxydatif dans les cellules cancéreuses via la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) tels que des radicaux libres, des ions oxygénés ou des peroxydes. Ces composés sont chimiquement très réactifs en raison de la présence d'électrons de valence non appariés. Ils peuvent alors induire des cassures simple ou double brin qui perturbent la

structure de l'ADN et provoquent une instabilité chromosomique, déclenchant différents phénomènes de mort cellulaire (apoptose, nécrose et autophagie notamment). Outre le ciblage de l'ADN, les rayons peuvent également affecter la membrane plasmique et les organites subcellulaires, puis induire l'activation de gènes liés à la réponse au stress cellulaire et de voies de signalisation intracellulaires, déclenchant également la mort cellulaire [16]. Les cellules irradiées peuvent aussi affecter leurs voisines non irradiées par des effets de proximité notamment la transmission de signaux apoptotiques, ce qui les conduit à présenter des effets biologiques similaires.

Les récents progrès de la radiothérapie notamment en terme de technologies ont permis d'améliorer les résultats dans le traitement du cancer du poumon et des études ont montré qu'au niveau de la population atteinte de cette maladie, une utilisation optimale de la radiothérapie pourrait entraîner des gains de survie globale supplémentaires [17]. En effet, *via* l'utilisation de technique d'imagerie (notamment tomographie) ou en arrivant à s'affranchir des mouvements respiratoires du patient par exemple, il est désormais possible de délivrer une dose de rayonnements ionisants de manière localisée, limitant par la même occasion les effets secondaires indésirables. Cependant, malgré ces progrès technologiques, des problématiques telles que la radiorésistance et la récurrence tumorale restent des défis cliniques majeurs.

#### I.2.4.1 La radiorésistance : véritable frein aux traitements anti cancer

Bien que la radiothérapie soit considérée comme une option thérapeutique importante et efficace pour le traitements des CPNPC, certains patients présentent une résistance à la radiothérapie, ce qui conduit *in fine* à des rechutes peu après la fin des traitements [18]. La radiorésistance est un processus dans lequel les cellules ou les tissus tumoraux s'adaptent aux changements induits par la radiothérapie et développent une résistance au traitement [19]. Il s'agit de mécanismes complexes, impliquant de nombreux gènes et facteurs. Les processus responsables du développement de radiorésistance ont fait l'objet de nombreuses études et les principaux facteurs impliqués sont synthétisés dans la **Figure 5**.



**Figure 5 : Les effets cellulaires des rayonnements ionisants et les mécanismes de résistance déclenchés en réponse.**  
*Figure librement adaptée à partir de Tang et al. 2018.*

- On retrouve dans un premier temps des phénomènes d'autophagie, qui est une voie de recyclage métabolique impliquant une dégradation indépendante du protéasome de différents composants cellulaires. Elle a notamment pour fonction de préserver les organites endommagés [20] et peut également réduire le taux d'apoptose induit par les dommages à l'ADN (ROS). Ainsi, dans les cellules tumorales, elle apporte une résistance aux effets de la radiothérapie [21].
- La génération de cellules souches cancéreuses (CSCs) peut également représenter un mécanisme de résistance à la radiothérapie. En effet, au sein d'une tumeur, les CSCs sont des cellules cancéreuses indifférenciées à forte activité oncogène qui sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement et d'un potentiel de différenciation multidirectionnelle [22]. Elles présentent des réponses rapides aux lésions de l'ADN et sont notamment capables de se protéger des ROS, ce qui contribue aussi au développement de la résistance aux radiations [23].
- Il a également été montré qu'après détection de dommages à l'ADN induits par des rayonnements ionisants, certaines protéines impliquées dans la gestion du cycle cellulaire telles que celles de la famille des 14-3-3 pouvaient réguler et arrêter la progression du cycle cellulaire des cellules cancéreuses dans la phase G2/M [24].
- Des changements divers dans le microenvironnement tumoral peuvent aussi conduire au développement de radiorésistance. En effet, les microenvironnements tumoraux sont par

exemple connus pour être des zones hétérogènes aux conditions souvent très hypoxiques. Cette hypoxie favorise la radiorésistance des cellules tumorales *via* l'activation de la voie de signalisation du facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor), ce qui renforce l'activité de réparation des cassures double brin de l'ADN et stimule la glycolyse anaérobie, l'angiogenèse et la survie des cellules tumorales [25] [26].

- Finalement, après irradiation des cellules cancéreuses, plusieurs voies de signalisation peuvent réagir rapidement et initier la réparation de l'ADN. C'est le cas notamment des voies impliquant des kinases telle que PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) qui régule les niveaux de recombinaison homologue et favorise la réparation des lésions de l'ADN. On retrouve aussi certaines MAPK (Mitogen-activated protein kinases) impliquées dans la régulation de la réponse au stress oxydatif [27].

► Par conséquent, suite à ces différents mécanismes qui diminuent l'efficacité des traitements par radiothérapie, il est actuellement urgent de développer de nouvelles stratégies de radiosensibilisation tout en garantissant de faibles effets secondaires dans le traitement du CPNPC afin de prolonger la survie et la qualité de vie des patients. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons à une approche prometteuse pour induire une radiosensibilité accrue des cellules tumorales qui est relative à la réponse adaptative des télomères.

---

## **Introduction bibliographique**



---

### **II. Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique**

---

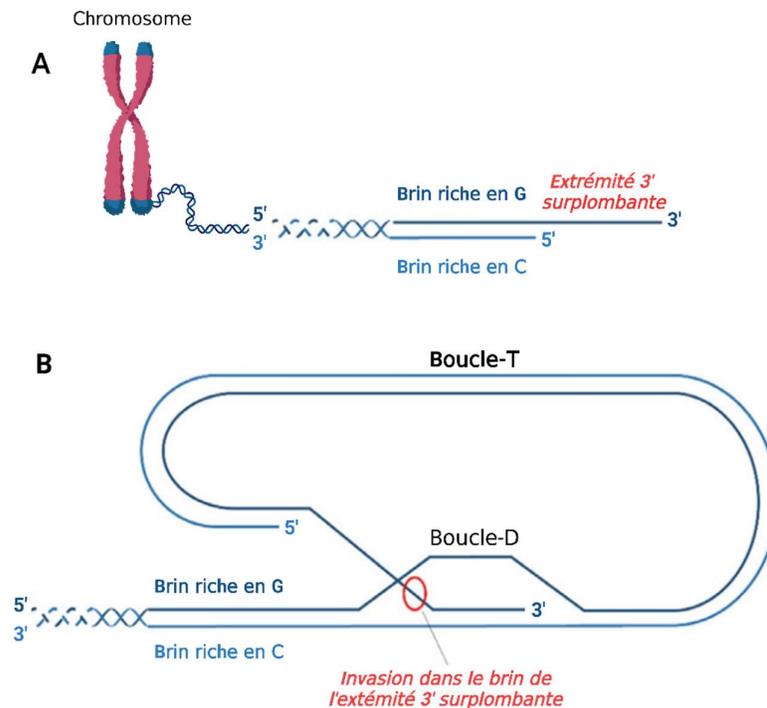
Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

Parmi les différents mécanismes impliqués dans la régulation de la radiosensibilité/radiorésistance cellulaire, la réponse télomérique adaptative a été récemment mise en évidence dans un nombre croissant d'études [28]. Dans cette partie, une introduction générale de la biologie des télomères sera d'abord présentée, puis nous verrons ensuite leur implication dans la radiorésistance des cellules du cancer du poumon.

## II.1 Biologie des télomères

### II.1.1 Structure

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques présentes au niveau des extrémités des chromosomes eucaryotes et qui les protègent, entre autres, contre l'instabilité génomique. Chez l'Homme, les télomères sont constitués d'une séquence d'ADN double brin hexamérique (TTAGGG/AATCCC) d'une longueur allant de 9 000 à 15 000 paires de bases (pb), non codante, répétée en tandem et hautement conservée, ainsi que d'une extrémité simple brin en 3' du chromosome riche en guanine (G) d'environ 150-300 bases (**Figure 6-A**).



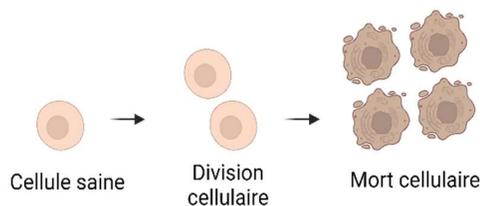
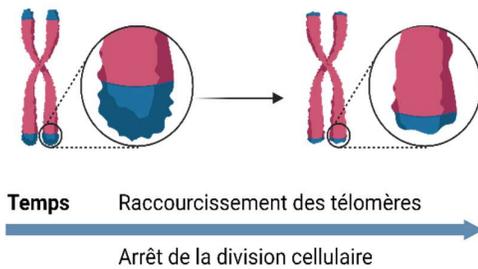
**Figure 6 : Représentation schématique de la structure des télomères présents au niveau des extrémités des chromosomes eucaryotes. A)** Représentation de l'ADN télomérique. Le brin 3' est riche en guanine (G) et surplombe le brin 5' riche en cytosine (C) opposé. **B)** Représentation de l'ADN télomérique sous forme de boucle T. *Figure issue de Giardini et al. 2014.*

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

L'ADN télomérique peut adopter 2 conformations particulières : une forme linéaire et une structure en boucle, dite boucle-T. Les télomères adoptent une forme linéaire lors de leur réplication. A l'issue de celle-ci, la structure télomérique change et forme une boucle qui vient coiffer les extrémités des chromosomes pour empêcher leur dégradation et différencier les extrémités du chromosome d'une cassure double-brin de l'ADN qui pourrait être reconnue par les systèmes de réparation de l'ADN. Cette configuration en boucle-T résulte de l'invasion de l'extrémité simple brin 3' dans l'ADN double brin télomérique en amont, formant une boucle-D interne (**Figure 6-B**) [29].

Dans les cellules saines, au fil des divisions cellulaires il y a un raccourcissement progressif des télomères, ce qui conduit *in fine* à une limitation de la capacité de division de la cellule, l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence. En revanche, dans le cadre du cancer, les cellules tumorales contrebalancent cette limitation de division cellulaire par deux mécanismes principaux (**Figure 7**). Le premier est l'activation d'une enzyme clé, la télomérase, qui a pour fonction d'ajouter des séquences télomériques aux extrémités des chromosomes. Le deuxième est l'utilisation d'une voie particulière dite de prolongation alternative des télomères (ALT), qui conduit au rallongement des télomères par des mécanismes de recombinaison [30]. Les cellules tumorales assurent de cette manière leur multiplication invasive et incontrôlée.

#### Biologie des télomères chez des cellules saines



#### Biologie des télomères chez des cellules cancéreuses

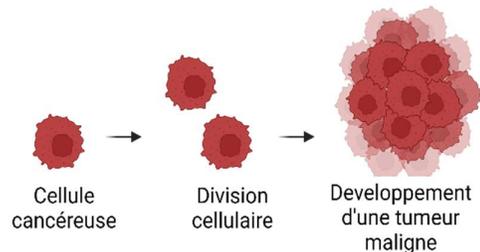
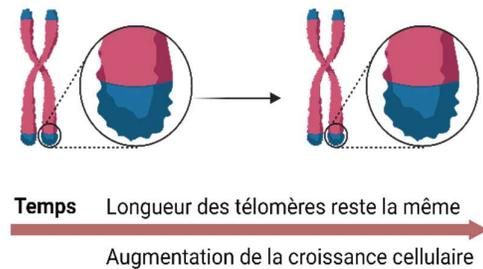
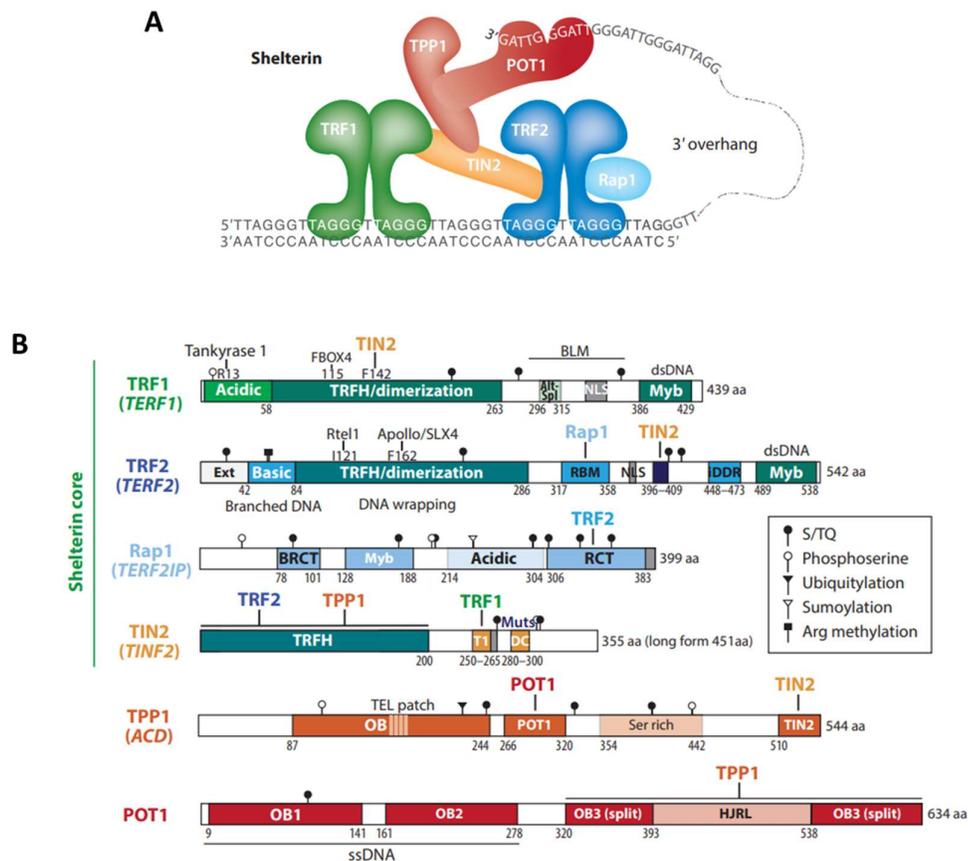


Figure 7 : Illustration de la biologie des télomères chez des cellules saines vs chez des cellules cancéreuses.

## II.1.2 Le complexe shelterin (ou télosome)

La formation de la boucle-T au niveau des télomères est rendue possible grâce à l'action d'un complexe protéique appelé shelterin. Ce complexe est constitué de six protéines que sont TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 et POT1. Ces protéines interagissent les unes avec les autres et ont un rôle capital pour l'homéostasie des télomères. En effet, TRF1 et TRF2 sont liées entre elles par l'intermédiaire de TIN2. TIN2 se lie également à TPP1, qui à son tour se lie à POT1. Finalement Rap1 se lie à TRF2, complétant ainsi le complexe de six sous-unités (**Figure 8**) [31].



**Figure 8 : Structure du complexe shelterin et de ses six sous-unités.** A) Représentation du complexe shelterin humain associé à l'ADN télomérique double brin et simple brin. B) Domaines protéiques des six sous-unités du complexe shelterin et leurs interactions entre elles et l'ADN télomérique. *Figure issue et adaptée de de Lange 2018.*

TRF1 et TRF2 (Telomere Repeat binding Factor 1 and 2) se lient aux séquences TTAGGG de l'ADN télomériques et sont responsables du recrutement des quatre autres sous-unités sur le télomère. Elles participent à la réplication des télomères et à la prévention du blocage de la fourche de réplication. La protéine TRF1 agit sur la régulation de la longueur du télomère. TRF2 lui est particulièrement impliqué dans la formation des boucles-T télomériques et empêche également la reconnaissance des télomères comme étant des cassures double brin de l'ADN par les systèmes de réparation de la cellule.

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

Rap1 (Repressor / Activator Protein 1) a une influence sur l'interaction de TRF2 avec l'ADN et l'empêche notamment de s'engager dans des interactions indépendantes de la séquence avec l'ADN, augmentant ainsi la spécificité de TRF2 pour les répétitions TTAGGG [31].

TIN2 (TRF1- et TRF2-Interacting Nuclear Protein 2) a surtout un rôle de stabilisation en se liant aux TRF1 et 2, puis au complexe TPP1-POT1. Elle assure ainsi un lien entre les unités attachées à l'ADN double brin et les sous unités attachées à l'ADN simple brin.

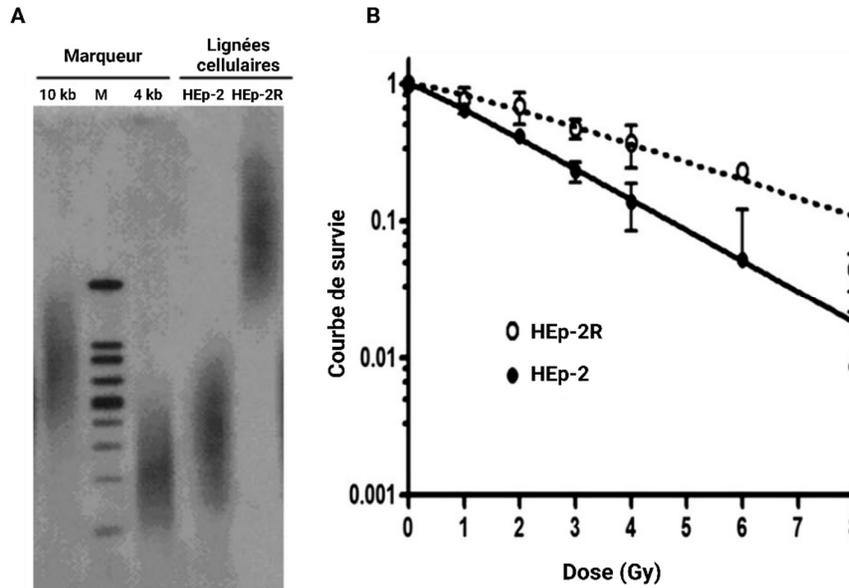
TPP1 (ACD Shelterin Complex Subunit And Telomerase Recruitment Factor) est associée à POT1 et a un rôle dans la régulation de la longueur des télomères *via* le recrutement de la télomérase. En stabilisant l'interaction TRF1-TIN2-TRF2, c'est également un élément clé dans la médiation de l'assemblage du complexe shelterin.

Finalement, POT1 (Protection du télomère 1) se lie préférentiellement à l'ADN télomérique simple brin et est associé à TPP1 notamment grâce à des motifs de type oligonucléotide/oligosaccharide (OB, **Figure 8-B**) et *via* des jonctions de Holliday [32]. Il participe ainsi à la protection de l'extrémité 3' simple brin du télomère des dégradations de l'ADN par des nucléases.

### II.1.3 La réponse télomérique et la radiosensibilité cellulaire

La radiosensibilité est traditionnellement liée à des défauts dans les différentes voies cellulaires impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN ce qui est à l'origine de cellules plus sensibles aux radiations. Récemment, les télomères sont apparus comme étant un nouveau facteur important modulant les réponses des cellules aux rayonnements ionisants chez l'homme [33]. En effet, plusieurs études ont montré qu'il y avait une corrélation directe entre la longueur et l'état de dysfonctionnement des télomères avec la radiosensibilité cellulaire [34] [35].

Des travaux chez l'Homme ont montré que des télomères courts, c'est-à-dire  $\leq 7000$  pb (au lieu de 9000 à 15 000), étaient liés à une sensibilité aux radiations ionisantes [36] [37]. Cette corrélation serait due au fait qu'un raccourcissement des télomères est associé à des aberrations chromosomiques. Ces aberrations conduiraient à une radiosensibilité *via* des changements de structure de la chromatine qui limitent notamment l'accès à la protéine ATM (Ataxia Telangiectasa Mutated), impliquée dans la réparation des cassures doubles brins [38] [39] [40]. Ce phénomène a aussi été illustré par plusieurs autres études chez l'Homme ou chez l'animal. En effet, la **Figure 9** montre les résultats d'une étude de 2007 où la survie cellulaire après irradiation a été évaluée chez deux lignées cancéreuses humaines (issues de carcinome squameux) possédant des télomères de longueurs différentes.



**Figure 9 : Impact de la longueur des télomères sur la radiosensibilité cellulaire. A)** Longueur moyenne des télomères dans des cellules cancéreuses HEP-2 et HEP-2R déterminée par analyse de fragments de restriction. **B)** Courbes de survies issues d'essais clonogéniques. Issue et adaptée de Zhong et al. 2007.

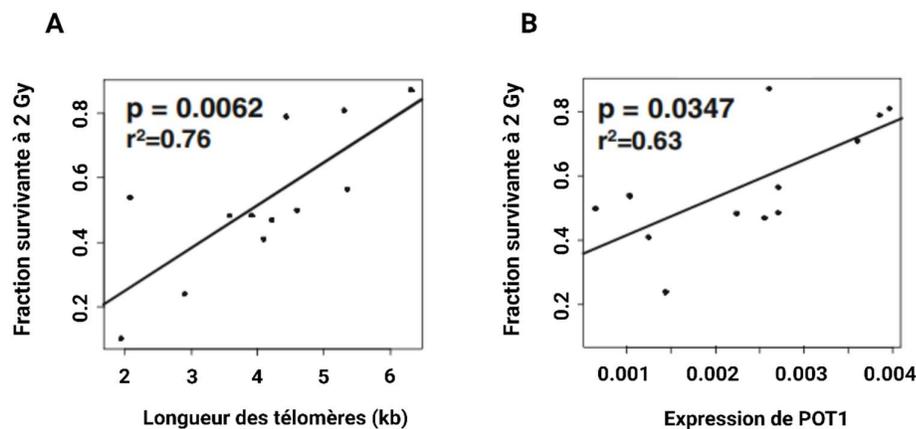
Sur la **Figure 9-A** on peut voir que la lignée cellulaire cancéreuse HEP-2 possède des télomères de tailles  $\leq 7000$  pb là où ils sont au-delà de 10 000 pb pour la lignée HEP-2R. Pour conséquence on remarque sur la **Figure 9-B** une survie cellulaire après irradiation bien moins importante chez la lignée HEP-2 qui présente des télomères plus courts. On peut aussi citer une autre étude qui a été réalisée sur des individus présentant des syndromes d'instabilité génomique et une hypersensibilité aux rayonnements ionisants, et chez lesquels des télomères significativement plus courts ont été détectés par rapport aux individus normaux [41]. La relation entre la longueur des télomères et la radiosensibilité a également été démontrée dans des études *in vivo* avec des souris mutées au niveau de l'activité de la télomérase. Plus particulièrement, ces souris dont les télomères sont 40 % plus courts que ceux des souris sauvages montraient une hypersensibilité aux doses cumulées de rayons et présentaient des dommages chromosomiques plus importants associés à des niveaux d'apoptose plus grands que les souris témoins [42].

La fonction des télomères ne dépend pas seulement de la longueur de l'ADN télomérique, mais aussi des protéines et des facteurs nécessaires à la formation d'une boucle-T fonctionnelle. On a vu précédemment que les télomères sont protégés par le complexe shelterin, composé de protéines télomériques interagissant les unes avec les autres et qui participent à la fois au maintien et à la protection des télomères. Il a été montré que des perturbations au niveau de ces protéines télomériques conduisaient à des dysfonctionnements télomériques à l'origine de phénomènes de radiosensibilité. Par exemple, suite à l'étude de 2007 citée plus haut (**Figure 9**), la même équipe a observé plus tard en 2014 que l'expression

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

de la protéine télomérique TPP1 était plus élevée dans les lignées cellulaires HEP-2R que dans les lignées HEP-2, et que sa suppression augmentait la radiosensibilité en induisant un dysfonctionnement télomérique [43]. D'autres recherches ont aussi montrées que la surexpression de TPP1 entraînait une radiorésistance et un allongement des télomères dans les cellules de cancer colorectal [44].

Un autre exemple est celui de la protéine POT1, qui est également impliquée dans la régulation de la radiosensibilité des cellules [45]. En effet l'expression de POT1 est aussi en corrélation avec la longueur des télomères et des patients ayant un niveau élevé de POT1 possèdent de longs télomères ainsi qu'une meilleure résistance aux rayonnements ionisants (**Figure 10**) [46].



**Figure 10 : Corrélation entre la longueur des télomères et l'expression de la protéine télomérique POT1 sur la radiosensibilité cellulaire. A)** Fraction de cellules survivantes après irradiation à une dose de 2 Gy en fonction de la longueur de leurs télomères. **B)** Fraction de cellules survivantes après irradiation à une dose de 2 Gy en fonction de leur expression relative en protéine télomérique POT1. *Issue de Ferrandon et al. 2013.*

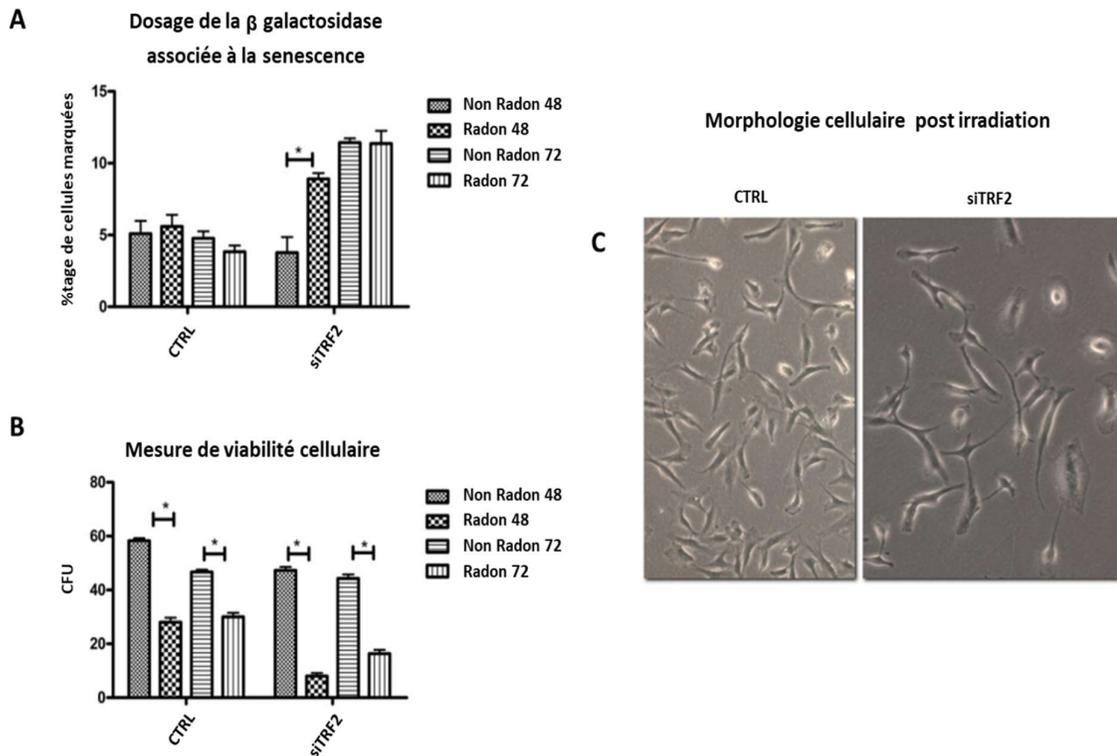
La **Figure 10-A** montre que chez des lignées cellulaires issues de patients atteints de glioblastome, la longueur des télomères est proportionnelle aux taux de survie cellulaire après irradiation à 2 Gy. Ceci est tout à fait corrélé avec les niveaux d'expression relative de la protéine télomérique POT1 qui sont eux aussi proportionnels aux taux de survie (**Figure 10-B**).

Les exemples mentionnés ci-dessus ne sont pas exhaustifs et d'autres acteurs responsables de dysfonctionnements télomériques existent. Par exemple, l'absence de la protéine kinase ADN-PKcs qui intervient dans le coiffage des télomères provoque des instabilités chromosomiques [41]. Une autre protéine télomérique faisant partie du complexe shelterin a tout particulièrement attiré notre attention et a été sélectionnée dans le cadre de mon projet de thèse visant à induire une radiosensibilité cellulaire. Il s'agit de la protéine TRF2.



Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

De manière très intéressante, des travaux en 2015 ont montrés que TRF2 était aussi impliqué dans le processus de radiorésistance des cellules tumorales. En effet, la baisse d'expression partielle de TRF2 dans des cellules permet d'augmenter les dommages à l'ADN, la sénescence, et réduit la survie cellulaire en réponse à des radiations ionisantes [51] (**Figure 12**).

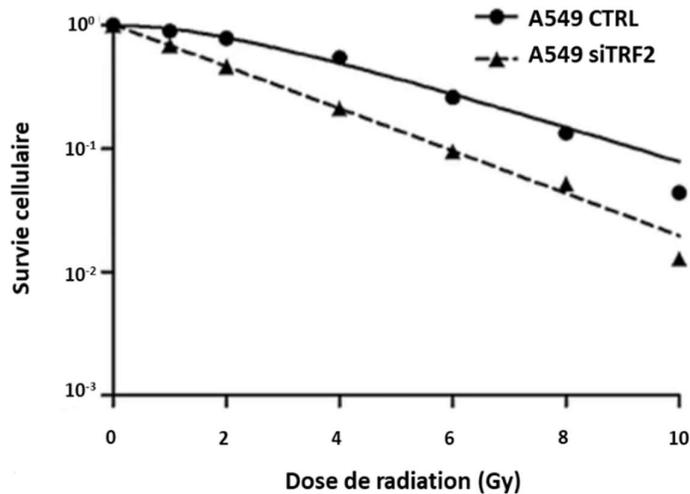


**Figure 12 : Evaluation de l'impact de l'inhibition de la protéine TRF2 sur la radiosensibilité cellulaire. A)** Dosage de l'enzyme bêta galactosidase chez des cellules irradiées et traitées ou non avec un siARN anti-TRF2. **B)** Mesure de la viabilité cellulaire par essai clonogénique chez des cellules irradiées et traitées ou non avec un siARN anti-TRF2 POT1. **C)** Clichés de microscopie comparant la morphologie de cellules traitées ou non avec un siARN anti-TRF2 après irradiation. *Figure issue et adaptée de O. Orun et al. 2015.*

Dans cette étude, des cellules ont été traitées ou non avec un petit ARN interférent (siARN) anti-TRF2 qui a pour fonction d'inhiber l'expression de la protéine TRF2 de manière transitoire. Les deux populations de cellules ont ensuite été comparées par des dosages de bêta-galactosidase, une enzyme associée à la sénescence, des mesures de survie cellulaire par des tests clonogéniques de CFU (colony forming unit) ainsi que par étude morphologique. Il a été montré que les cellules où la protéine TRF2 a été inhibée par un siARN présentaient un niveau plus élevé en bêta-galactosidase associée à la sénescence mais aussi une survie cellulaire significativement réduite après irradiation aux radons 48 et 72 (**Figure 12-A et B**). Morphologiquement, les cellules présentant des niveaux réduits d'expression de TRF2 apparaissent globalement plus grosses, plus isolées et moins nombreuses après irradiation comparées aux cellules non traitées (**Figure 12-C**), ce qui atteste d'une radiosensibilité accrue de ces cellules.

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

TRF2 a également été décrite directement comme une protéine impliquée dans la radiorésistance dans des cellules de la lignée A549 de carcinome pulmonaire humain [52] (**Figure 13**). Les cellules où l'expression de TRF2 a été réduite présentent des taux de survie plus faibles que des cellules exprimant un niveau normal de TRF2 après irradiation à des doses croissantes de 2 à 10 Gray.



**Figure 13 : TRF2 participe à la radiorésistance des cellules tumorales de poumon.** Evaluation de la survie cellulaire après irradiation à des doses croissantes des cellules A549 traitées (siTRF2) ou non (CTRL) avec un siARN anti TRF2. Figure issue et adaptée de X. Yang et al. 2015.

Par conséquent, le développement de composés ciblant TRF2 en association avec les radiations ionisantes représente une approche tout à fait pertinente pour améliorer les effets de la radiothérapie dans le cadre du CPCNP et pour réduire la dose de rayonnement délivrée aux patients, minimisant les effets secondaires sur les tissus sains qui sont également sensibles aux radiations.

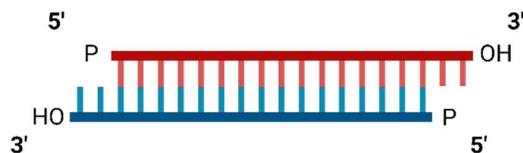
► Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons décidé de développer une nouvelle stratégie de radiosensibilisation des cellules tumorales du poumon en combinant la radiothérapie et le ciblage de la réponse télomérique avec un système de vectorisation de siARN plus performant. Cette stratégie a pour objectif d'améliorer l'efficacité des traitements de radiothérapie actuels et de minimiser les doses d'irradiation et par conséquent les effets secondaires pour les patients. Avant de discuter plus en détails de cette stratégie, la partie suivante présente une vue d'ensemble quant au fonctionnement des siARNs ainsi que leur utilisation en thérapie.

## II.2 Les siARNs pour la thérapie

### II.2.1 Structure et fonction des siARNs

L'interférence par ARN est un processus biologique dans lequel des ARNs dits interférents (ARNi), non codants et généralement double brins, suppriment l'expression d'un gène particulier. Il existe deux types d'ARNi, les petits ARNi (siARN) et les micros ARNi (miARN). Dans la cellule, les ARNi sont reconnus et liés à des complexes protéiques dans le but d'être transportés spécifiquement jusqu'à une séquence d'ARN messager (ARNm) complémentaire et d'induire une dégradation de celle-ci. La dégradation de l'ARNm empêche sa traduction et conduit à une diminution transitoire (3 à 4 jours généralement) de la protéine putativement traduite. L'ARNi joue ainsi un rôle important pour la suppression et l'étude de l'activité d'un gène.

Les siARNs ont une taille généralement comprise entre 20 et 24 paires de bases (pb). Chaque extrémité surplombe l'autre de deux nucléotides, la 5' étant phosphorylée alors que la 3' est quant à elle hydroxylée (**Figure 14**).



**Figure 14** : Structure simplifiée d'un siARN double brin.

Les siARNs sont à distinguer des miARNs qui eux reconnaissent plusieurs ARNm cibles, là où les siARNs sont spécifiques d'un seul ARNm.

La dégradation d'un ARNm cible par un siARN se réalise en plusieurs étapes (**Figure 15**).

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

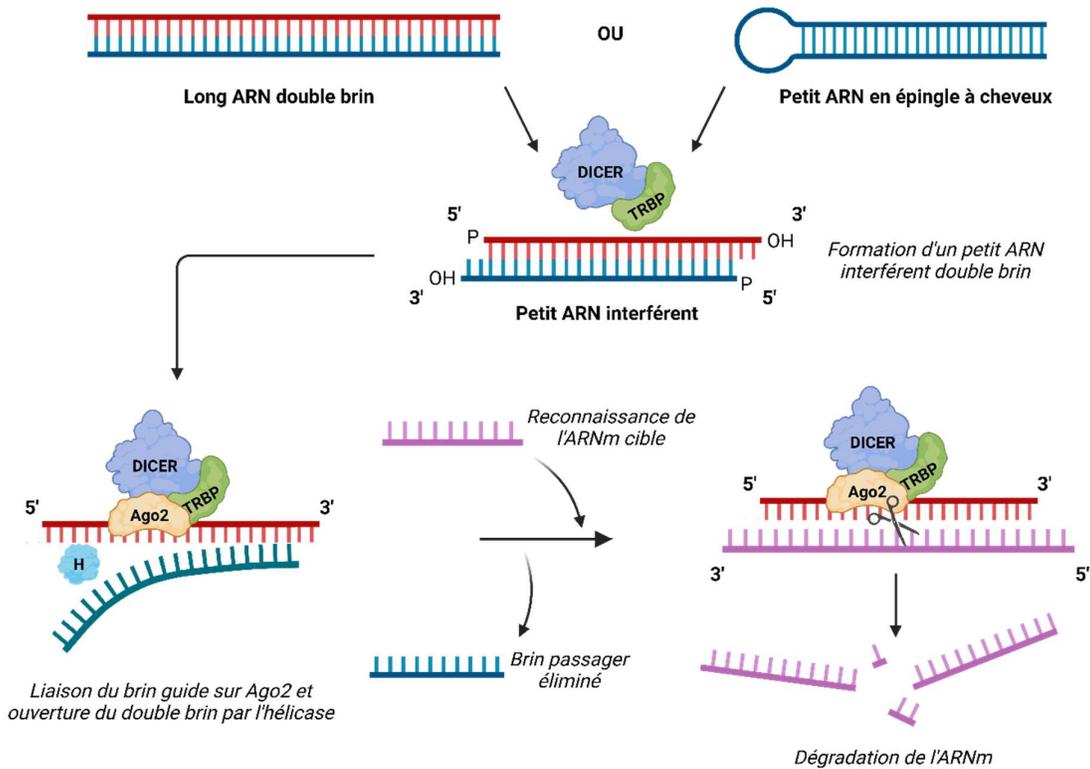
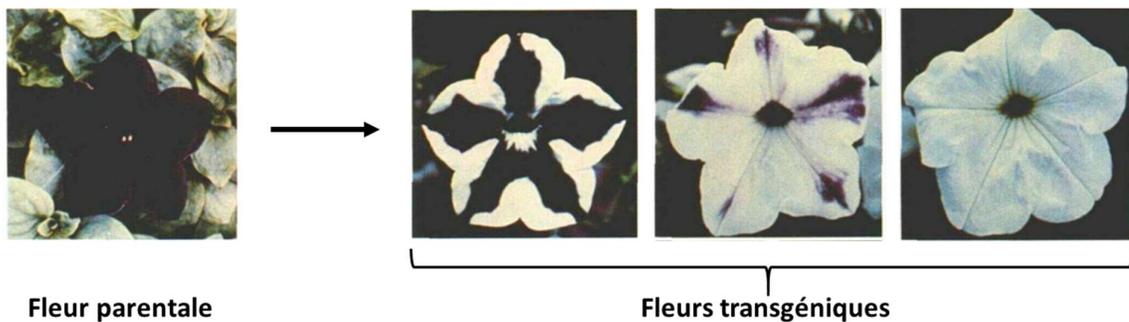


Figure 15 : Illustration du processus de formation des petits ARNs interférents (siARNs) et dégradation d'un ARN messenger (ARNm) cible.

Dans un premier temps, des ARNs longs double brin ou des petits ARNs non codants en forme d'épingle à cheveux (shARNs) préalablement transcrits dans le noyau passent *via* les pores nucléaires (exportine) pour se retrouver dans le cytoplasme. Ces ARNs sont ensuite reconnus par un complexe protéique appelé Dicer-TRBP (Transactivation Response element RNA-Binding Protein) qui va les couper grâce à une activité de type RNase III de manière à former des siARNs double brin. Le complexe va ensuite se lier à une protéine Argonaute-2 (Ago2) et une hélicase (H) pour former une structure multi protéique appelée RISC (RNA-induced silencing complex). Par la suite, l'hélicase permet la séparation des deux brins du siARN. Le brin guide (anti-sens, en rouge sur la **Figure 15**), dont l'extrémité 5' est thermodynamiquement moins stable comparé au brin passager (sens, en bleu), est sélectionné par la protéine Argonaute-2 [53]. Les argonautes sont des protéines essentielles dans l'interférence par ARN et possèdent deux domaines distincts. Un domaine PAZ, qui lie l'ARN simple brin (guide), et un domaine PIWI ayant une activité endonucléase similaire aux RNase H. L'autre brin du siARN non lié à Argonaute-2 (brin passager), est quant à lui dégradé. Le brin guide toujours lié au complexe RISC par l'intermédiaire de Ago-2 va alors pouvoir reconnaître une séquence complémentaire d'ARNm par appariement complet des bases Watson-Crick, en vue de sa dégradation par l'activité endonucléase d'Ago-2.

## II.2.2 Découvertes et avancées

Initialement, l'interférence par ARN fut découvert de manière inattendue dans les années 90 lors d'études de pigmentations chez des pétunias. Dans ces expériences, Richard Jorgensen et ses collaborateurs avaient pour objectif d'augmenter les taux de pigmentations *via* l'introduction d'un transgène pour surexprimer la chalcone synthase (CHS), une enzyme responsable de la biosynthèse de flavonoïdes responsables de la pigmentation. Cependant, c'est le résultat inverse qui s'est produit et au lieu d'une surexpression de la pigmentation, des fleurs transgéniques moins pigmentées que les fleurs parentales ont été observées [54] (**Figure 16**).



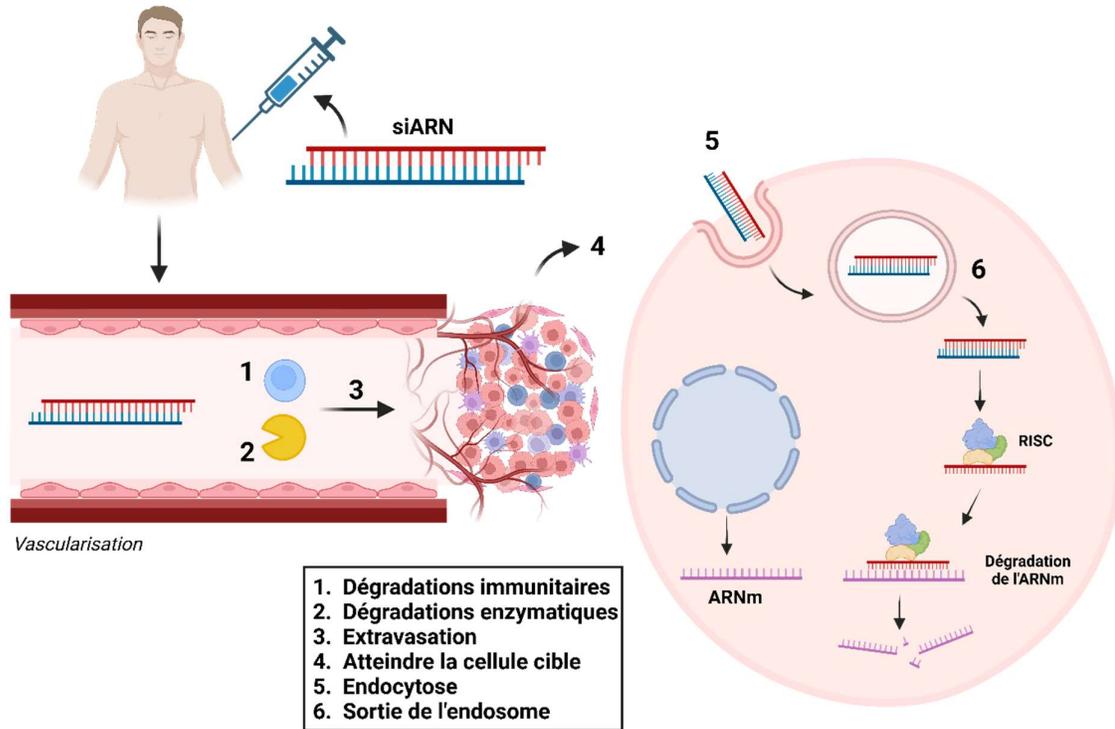
**Figure 16 : Observation de la différence de phénotypes chez des fleurs transgéniques comparé aux fleurs parentales.** La perte progressive de la pigmentation chez les fleurs transgéniques illustre le phénomène d'interférence par ARN. Issue de Jorgensen et al. 1990.

C'est en 1998 que les siARNs sont réellement découverts par Fire et Mello au travers d'expériences d'inhibitions de l'expression de gènes chez *Caenorhabditis elegans*.

Ils ont depuis fait l'objet de nombreuses études à visée thérapeutique et s'avèrent être notamment de très bons candidats pour les thérapies anti-cancer. En effet comme on l'a vu précédemment, un siARN est spécifique d'une séquence nucléotidique particulière et permet donc un ciblage précis d'un gène d'intérêt. Il limite drastiquement les effets secondaires, comme on peut l'observer pour certaines drogues à spectre large utilisées en chimiothérapie conventionnelle ou bien pour certains anticorps utilisés en immunothérapie. Actuellement, de nombreux gènes impliqués dans la survie, la prolifération, le cycle et la croissance cellulaire en générale, mais aussi la vascularisation tumorale, les métastases et la résistance aux médicaments sont des cibles pertinentes pour les thérapies anti cancer. En ce qui concerne le cancer du poumon, on peut citer notamment des thérapies utilisant des siARNs dirigés contre certains oncogènes connus tels que PLK-1, Bcl-2, Akt1, BIRC5/CCNB, WT-1 ou MDM2 [55]. Parmi les thérapies commerciales à base de siARN les plus abouties actuellement et approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et la Commission Européenne (CE), nous pouvons citer le Patisiran (ONPATRO®) pour le traitement de l'amylose héréditaire à transthyrétine avec polyneuropathie ou bien encore le Givosiran (GIVLAARI™) pour le traitement des adultes atteints de porphyrie hépatique aiguë [56].

## II.2.3 Les contraintes à l'utilisation de siARN en thérapie et les solutions envisagées

Bien que l'outil siARN soit précis et efficace, son utilisation n'en est malheureusement pas pour autant dénuée d'obstacles (**Figure 17**) [57] [58].



**Figure 17 :** Illustration des principaux défis rencontrés lors de l'administration de siARN à visée thérapeutique *in vivo*. Inspirée de Artiga et al. 2019.

En effet, une fois injectés dans l'organisme, les siARNs ont un temps de demi vie relativement court et sont sujets à des dégradations par des enzymes (nucléases et phosphatases notamment) naturellement présentes dans le sérum, une clairance rénale rapide ou bien encore une élimination médiée par le système immunitaire (TLR). Ils doivent ensuite atteindre la cellule cible et être internalisés pour effectuer leur action dans le cytoplasme. Compte tenu de leur structure, les siARNs sont hydrophiles et ont une charge hautement négative. Ils ont une longueur d'environ 7-8 nm avec un diamètre de 2 à 3 nm et un poids moléculaire global autour de 13 kDa ce qui limite drastiquement leur diffusion à travers les membranes cellulaires qui sont elles globalement chargées négativement [59]. Ainsi, le plus souvent, la pénétration cellulaire des siARNs se réalise par endocytose, *via* différentes voies : phagocytose, macropinocytose ou bien médiée par les clathrines ou les cavéolines [60]. De manière plus secondaire, l'introduction d'ARN exogène dans la cellule peut également perturber les processus d'interférences et entraver la machinerie cellulaire recrutée pour l'extinction de certains gènes. Finalement, des travaux ont montrés qu'il n'est pas totalement impossible qu'un siARN reconnaisse une mauvaise séquence

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique  
nucléotidique cible et que cette reconnaissance était corrélée à la stabilité thermodynamique du duplex formé entre la région du brin guide du siARN et son ARNm cible [61].

Par conséquent, les applications thérapeutiques avec des siARNs nécessitent de mettre au point des solutions afin de protéger le siARN des dégradations enzymatiques, améliorer son absorption cellulaire et faire en sorte qu'il atteigne et inhibe correctement sa cible sans induire d'effets indésirables. Pour cela on peut citer des solutions largement utilisées actuellement en recherche (**Figure 18**) :

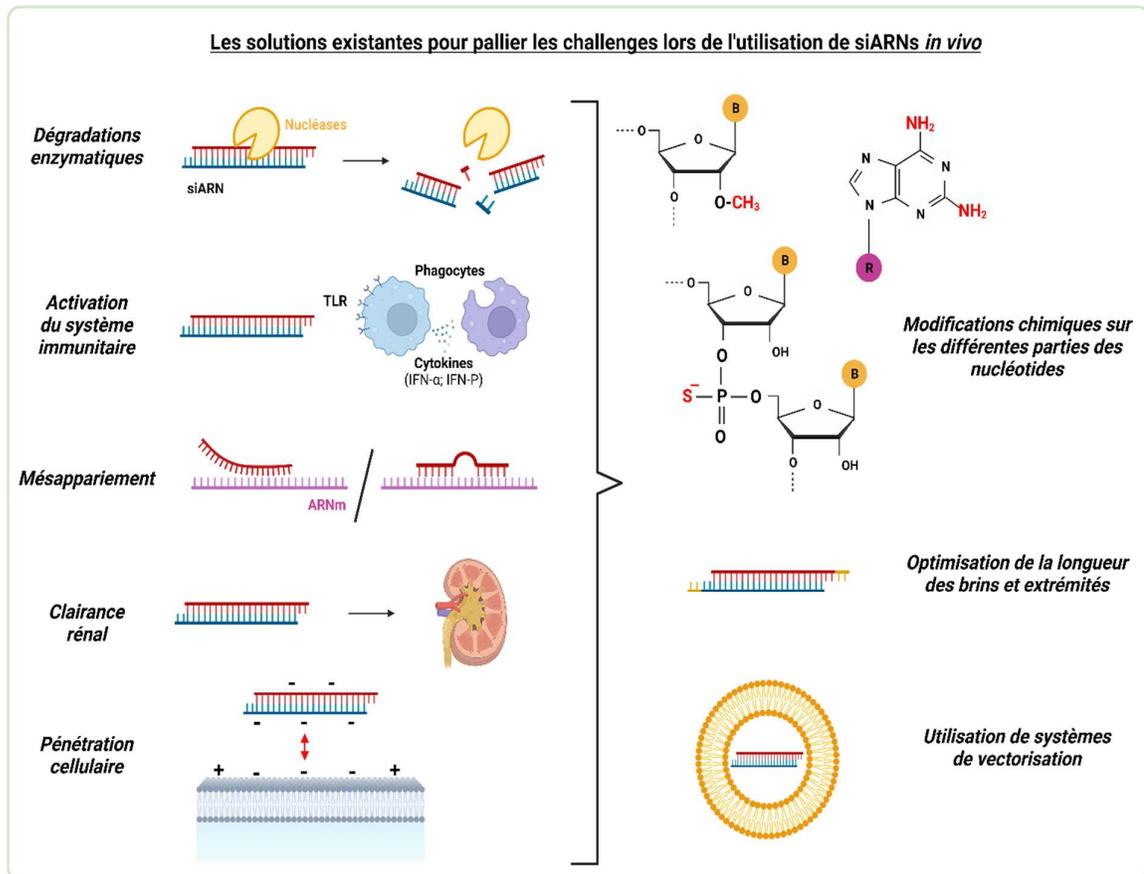


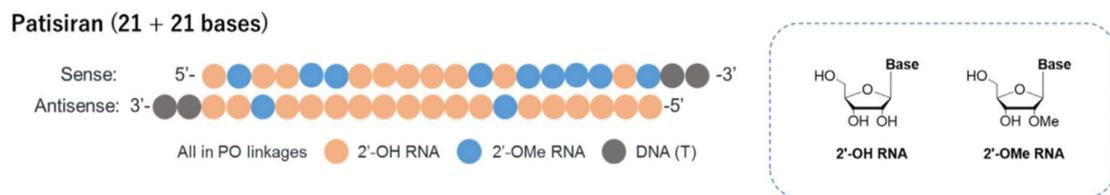
Figure 18 : Illustration des défis rencontrés lors de l'utilisation de siARN en thérapie et les solutions envisagées.

1. **Apporter des modifications chimiques** au niveau de la structure même du siARN. Ces modifications peuvent se faire à différents niveaux en fonction de la protection que l'on souhaite apporter [62].
  - a. Des études ont montré que généralement, les siARNs d'une taille de 21-22 nucléotides étaient plus proches de ceux qu'on retrouve de manière endogène [63] et mettaient en évidence de meilleurs effets d'inhibition de gènes [64].
  - b. L'interférence peut aussi être améliorée en facilitant la liaison du siARN avec la protéine Ago-2 *via* l'ajout de nucléotides (adénine) en position 3' des brins sens et anti-sens [64].

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

- c. Concernant les protections contre les dégradations enzymatiques, les modifications chimiques se réalisent le plus couramment au niveau des riboses ou des liaisons phosphodiesters, mais c'est également possible au niveau des bases azotées. Pour les riboses, les modifications les plus connues sont les substitutions des groupements OH en position 2' ou 4' par un groupement méthyl ou un fluor [65]. Concernant les liaisons phosphodiesters, on peut citer notamment la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre pour former une liaison phosphorothioate [66]. En bloquant ces positions, on limite la fixation de certaines nucléases et phosphatases sériques responsables des dégradations enzymatiques de la plupart des siARNs.

En reprenant l'exemple du Patisiran cité précédemment comme thérapie actuelle connue utilisant des siARNs, on remarque effectivement que la longueur du siARN utilisé dans ce traitement est de 21 paires de bases et que des modifications chimiques de type 2'-OMethyl ont été apportées pour limiter les dégradations enzymatiques (**Figure 19**) [67].



**Figure 19 : Structure du siARN modifié utilisé dans le cadre du traitement Patisiran.** Plusieurs groupements OH en positions 2' des riboses constituant les nucléotides du siARN ont été substitués par des groupements méthyl (Me) afin d'améliorer la protection contre les dégradations enzymatiques. *Figure directement issue de Suzuki et al. 2021.*

2. **Utiliser un système de vectorisation** pour améliorer encore la protection et l'intégrité de la structure du siARN mais aussi et surtout favoriser sa vectorisation jusqu'à l'ARNm cible. Nous aborderons plus en détail les différents systèmes plus bas en 2.

## II.2.4 Les systèmes de diffusion des siARNs pour la thérapie

Les matériaux les plus souvent utilisés pour assurer la bonne administration des siARNs en thérapies peuvent être classés en deux types principaux : les vecteurs viraux ou non viraux. Ceux-ci peuvent aussi bien envelopper entièrement le siARN pour assurer sa protection, ou bien lui apporter des propriétés physico-chimiques différentes afin de modifier son comportement dans l'organisme ou le système étudié. Une attention plus particulière sera portée aux vecteurs non viraux, puisque c'est cette catégorie qui a été utilisée dans ce projet de thèse.

### II.2.4.1 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont utilisés comme alternative à l'utilisation d'acides nucléiques nus et démontrent une bonne efficacité de transfection des gènes [68] [69]. En effet, au cours de leur évolution, les virus ont développé divers mécanismes performants pour entrer dans les cellules de l'hôte afin d'y introduire leur matériel génétique et ces capacités peuvent être utilisées dans le cadre de la génération de variants recombinants pour la thérapie génique [70]. Ainsi il est possible de s'en servir comme véhicules pour la vectorisation d'ADN ou d'ARN dans la cellule selon le type de virus utilisé. Pour des raisons de sécurité, les gènes viraux peuvent être retirés et le vecteur modifié dans le seul but d'amener le matériel génétique voulu dans la cellule.

Les virus utilisés dépendent du matériel à transporter (ADN ou ARN) et ont été largement étudiés comme étant sûrs d'utilisation chez l'Homme. Les plus connus sont les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés et les lentivirus. En s'intéressant seulement à la vectorisation dans le cadre d'un siARN, le matériel génétique est alors enveloppé dans la capsid virale qui assure sa protection et son entrée dans la cellule. La **Figure 20** représente un schéma simplifié de la vectorisation virale d'un ADN qui permet la transcription d'un petit ARN en épingle à cheveux (shARN), précurseur d'un siARN comme on l'a vu ultérieurement. Presque tous les virus enveloppés pénètrent dans les cellules hôtes par endocytose et la libération du matériel génétique s'effectue après dégradation de la capsid par des protéases lysosomales [71].

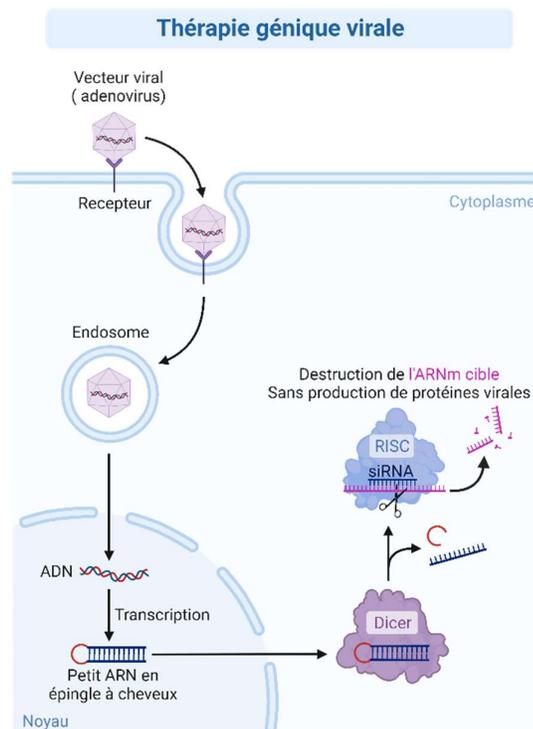


Figure 20 : Illustration reprenant un exemple de dégradation d'ARNm cible par un siARN en utilisant un vecteur viral.

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

---

Nous pouvons citer un exemple d'une autre méthode utilisée dans une étude de 2018 qui s'est servi du virus de la mosaïque du tabac (TMV) comme vecteur. Ce dernier est un virus végétal en forme de bâtonnets qui possède une structure bien définie et où il est possible de réaliser une fonctionnalisation sélective avec un siARN. En effet les résidus de tyrosine sur la surface extérieure du TMV fournissent des sites chimiquement réactifs pour à la fois la décoration de peptides pouvant pénétrer dans les cellules (CPP), et la fixation du siARN [72].

Bien qu'efficaces dans la délivrance de gènes, l'utilisation de ces vecteurs viraux en thérapie présente cependant des obstacles majeurs en raison de leur immunogénicité inhérente, leur pathogénicité et leur intégration chromosomique probable [73] [74].

#### II.2.4.2 Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux pour la thérapie génétique sont divers et variés. On retrouve notamment des nanoparticules (NPs), des peptides, des anticorps, des aptamères ou bien des glycoconjugués. Dans le cadre de ce projet de thèse nous nous focaliserons essentiellement sur le cas des NPs, qui par ailleurs représente également la classe de vecteurs la plus utilisée de nos jours pour la vectorisation de siARN [75] [76]. En effet les nanoparticules sont utilisées en thérapie pour le diagnostic et le traitement de diverses maladies, dont le cancer. Elles sont capables de lier, d'absorber et de transporter des biomolécules à visée thérapeutique comme par exemple de l'ADN, de l'ARN ou des peptides, vers le site pathologique cible améliorant ainsi l'efficacité des agents thérapeutiques utilisés. Elles sont surtout développées dans le but de surmonter les limites de certaines thérapies en ce qui concerne la protection, le ciblage et l'administration des médicaments à l'endroit souhaité.

Leurs capacités sont surtout basées sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques particulières liées à leur structure de taille nanométrique, généralement comprise entre 1 et 1000 nm. En raison de cette taille nanométrique, les NPs ont des effets de surface et des propriétés différents de leurs homologues de plus grande dimension [77]. Ces différences s'expliquent d'abord par le fait que les NPs sont très réactives puisqu'elles possèdent un ratio surface/volume élevé, ce qui leur permet d'être conjuguées avec diverses molécules. Ces caractéristiques affectent par exemple directement leur température de fusion, le point de fusion de nanoparticules d'or étant inférieur de 407°C par rapport au point de fusion de l'or à l'état brut (équation de Gibbs-Thomson) [78]. Toujours par rapport à leur taille nanométrique, les NPs sont aussi capables de franchir la plupart des barrières biologiques de l'organisme et permettent la vectorisation de médicaments dans les cellules et dans divers compartiments cellulaires qui sont normalement difficiles d'accès. On peut citer notamment les noyaux cellulaires, la barrière hémato-encéphalique ou bien certains microenvironnements cellulaires hétérogènes tumoraux.

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

En fonction du matériau de base utilisé, il existe différents types de NPs. Bien que différentes en raison de leur composition, elles partagent toutes néanmoins des caractéristiques communes en matière d'utilisation en thérapie pour la vectorisation de drogues [79]. Dans un premier temps elles peuvent être synthétisées en grande quantité et à des coûts de production relativement faibles. Elles sont la plupart du temps biocompatibles, biodégradables et faiblement immunogènes. Finalement elles peuvent être modifiées et fonctionnalisées chimiquement avec divers ligands afin de moduler leurs paramètres physico-chimiques et permettre la préservation de l'intégrité du médicament utilisé, mais aussi optimiser son ciblage et sa délivrance à l'endroit de l'organisme souhaité.

Les matériaux les plus couramment utilisés pour la formulation de NPs peuvent être d'origine biologique (lipides, dextran, chitosane...) ou avoir des caractéristiques plus "chimiques" comme les polymères à base de carbone, de silice ou certains métaux de transitions. Il en découle ainsi de multiples façons de classer les différentes NPs existantes, en fonction de leur composition, taille, forme, porosité, dimension, réactivité...

Voici ci-dessous un classement en trois catégories : les NPs qui sont formées à partir de composés organiques, inorganiques ou carbonées (**Figure 21**).

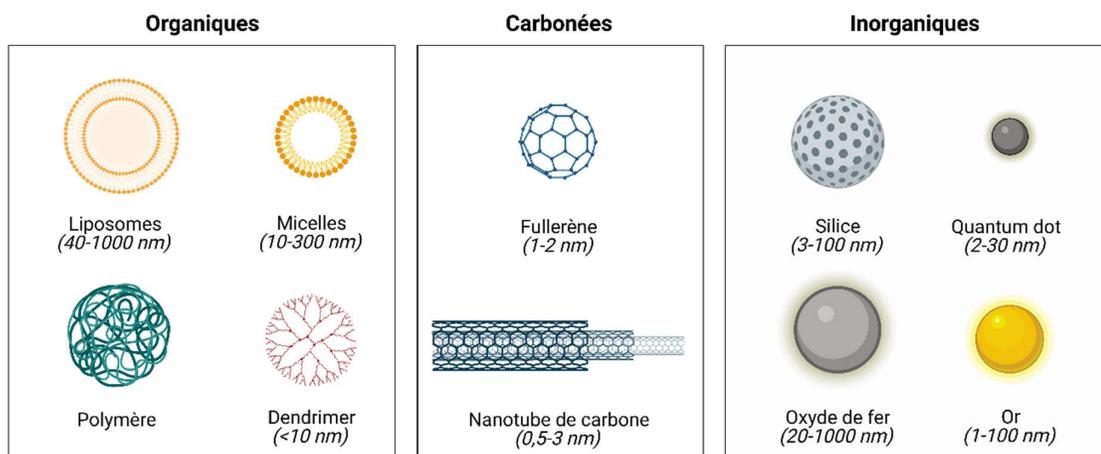


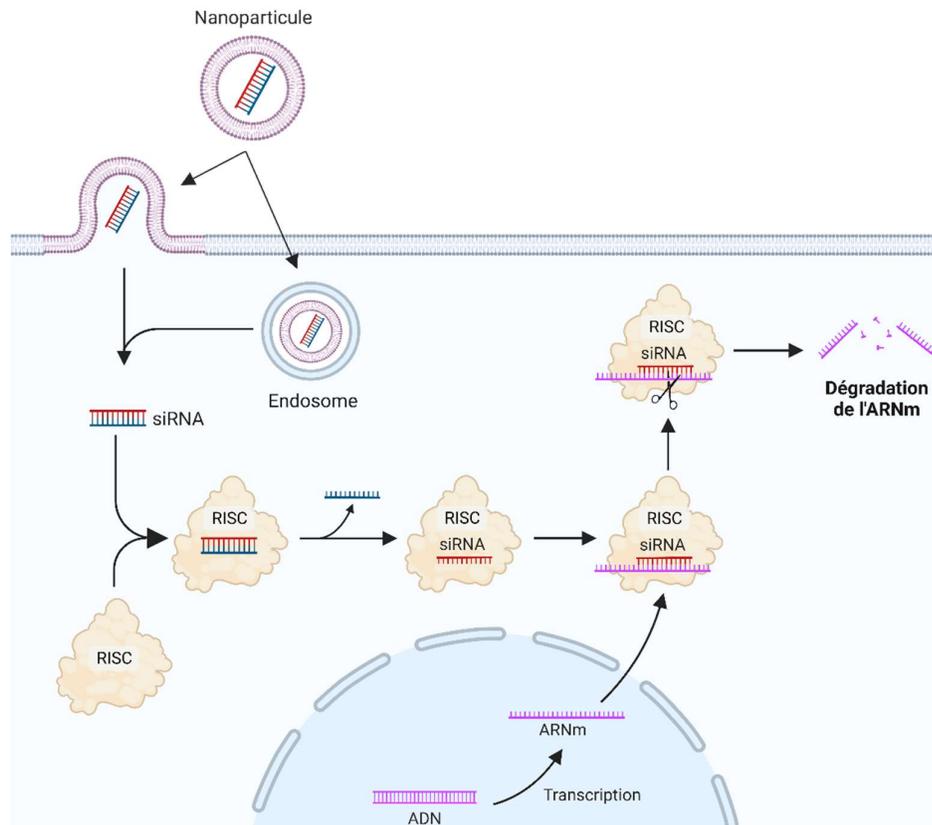
Figure 21 : Illustration des différents types de nanoparticules pour la vectorisation de biomolécules.

### 1. Les nanoparticules organiques :

Les NPs organiques sont celles constituées de protéines, peptides, de carbohydrates (aussi nommés sucres ou glucides), de lipides, de polymères ou de tout autre composé organique [80]. Elles ont comme avantages d'être thermodynamiquement très stables et leur formulation est simple et facilement adaptable. Ces NPs peuvent être obtenues à partir de ressources naturelles ou bien être synthétisées chimiquement, ce qui permet l'obtention d'une multitude de vecteurs potentiels et appropriés à la drogue à vectoriser. Les exemples les plus marquants de cette classe sont notamment les liposomes et les

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

micelles : on parle alors de nanoparticules lipidiques (LNPs) [81]. Nous pouvons également citer les NPs formées à partir de diverses protéines naturelles (telles que l'albumine ou le collagène) ou synthétiques (élastine ou soie) ainsi que de polymères peptidiques [82]. Avec une composition adéquate, elles permettent notamment d'assurer la protection ainsi que la vectorisation d'oligonucléotides. La **Figure 22** illustre un exemple de vectorisation d'un siARN utilisant une LNP qui encapsule le siARN et qui pénètre dans la cellule soit par fusion avec la membrane plasmique soit par endocytose à l'instar des vecteurs viraux.

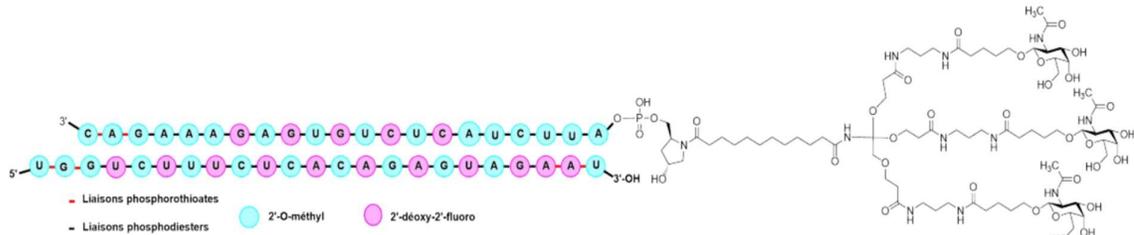


**Figure 22** : Illustration reprenant un exemple de dégradation d'ARNm cible par un siARN vectorisé par une nanoparticule de type lipidique.

Les nanoparticules organiques sont notamment employées pour les traitements Patisiran et Givosiran précédemment cités. En effet pour le Patisiran, ce sont des LNPs qui sont utilisées pour complexer un siARN. L'encapsulation complète par ces LNPs protège l'ARN de la digestion par les nucléases. De plus, les LNPs utilisées dans ce traitement ne sont pas chargées à pH physiologique grâce à l'association d'un lipide ionisable et d'un polyéthylène glycol (PEG), ce qui réduit les interactions non spécifiques des LNPs avec les protéines sériques. Par la suite ce lipide-PEG se dissocie des LNPs ce qui permet aux cellules de les absorber notamment par endocytose. Finalement, à cause du pH endosomal acide, les LNPs sont protonées ce qui induit un changement de structure venant perturber sa membrane et libérer le siARN dans le cytoplasme pour qu'il assure sa fonction de dégradation de l'ARNm cible.

Une nouvelle cible pour lutter contre la radiorésistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

En ce qui concerne le Givosiran, celui-ci utilise comme système de diffusion un ligand synthétique de type N-acétylgalactosamine (**Figure 23**) [83]. Dans le cadre du traitement contre la porphyrie hépatique aiguë, son objectif est de cibler spécifiquement les hépatocytes *via* l'endocytose médiée par les récepteurs de glycoprotéines désialylées que l'on retrouve en grande quantité lors de troubles hépatiques [84]. Une fois internalisé, le siARN est incorporé dans le complexe RISC pour assurer sa fonction.



**Figure 23 : Structure du système de diffusion de siARN Givosiran.** Issue de Majeed et al. 2022 et dictionnaire.acadpharm.org.

Bien que largement utilisées, les nanoparticules organiques rencontrent parfois quelques limitations liées au fait qu'elles peuvent être sensibles aux rayonnements thermiques et électromagnétiques tels que la chaleur et la lumière [85] et parfois avoir des taux d'encapsulation de la drogue souhaitée relativement faibles [86]. Finalement, une autre limitation à l'efficacité des siARNs vectorisés par LPNs est celle provenant de l'échappement des endosomes [87].

## 2. Les nanoparticules carbonées :

On retrouve ensuite les NPs uniquement composées d'atomes de carbone. Les exemples les plus connus sont les fullerènes et les nanotubes de carbone, mais on retrouve aussi des quantum dots de carbone (**Figure 21**). Elles possèdent notamment des propriétés uniques en matière de conductivité électrique, de solidité et sont très affines en électrons. Ces caractéristiques physiques, chimiques et électroniques particulières sont étroitement liées à la conformation structurelle et à l'état d'hybridation du carbone utilisé dans ces NPs [88]. En raison de ces particularités, elles sont utilisées dans un large éventail d'applications (même hors biologie), mais elles sont surtout attrayantes en tant que vecteurs de médicaments [89].

## 3. Les nanoparticules inorganiques :

En plus des propriétés communes précédemment citées, les NPs inorganiques possèdent des caractéristiques physiques uniques, à savoir électriques, magnétiques, radioactives, plasmoniques et optiques. Ces propriétés sont surtout propres au matériau de base utilisé. Les plus connues sont les nanoparticules à base d'or, d'argent, de silice, ou bien magnétiques (à base de fer, cobalt ou encore de nickel) ainsi que les quantum dots. De fait, elles sont très variables en taille, structure et géométrie. Ce sont des nanoparticules particulièrement qualifiées pour des applications inaccessibles aux matériaux organiques telles que l'imagerie et les thérapies photothermiques. Toutefois, leur application clinique est

Une nouvelle cible pour lutter contre la radio-résistance des cellules du cancer du poumon : la réponse télomérique

---

parfois limitée par une faible solubilité et des problèmes de toxicité, en particulier dans les formulations utilisant des métaux lourds [86].

► On remarque donc que pour utiliser de manière optimale des siARNs en thérapie, il faut faire appel à des systèmes de vectorisation adaptés. Nous avons vu que ces systèmes étaient variés, selon si l'on veut privilégier la protection et l'intégrité de la structure, favoriser sa vectorisation au bon endroit, ou bien les deux. Par la suite, et dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous focaliserons essentiellement sur le cas des NPs inorganiques comme système de diffusion, et plus particulièrement, une sous-famille de nanoparticules d'or (AuNPs) : les **nanoclusters** d'or (AuNCs).

---

## **Introduction bibliographique**



---

### **III. Les nanoclusters d'or pour la thérapie anti-cancer**

---

Dans le cadre de ma thèse, je me suis tout particulièrement intéressé aux nanoparticules d'or (AuNPs), des NPs de type inorganique, et qui sont développées au sein de mon laboratoire.

Les NPs à base de métaux nobles, en particulier l'or (Au) et l'argent (Ag), sont largement utilisées pour des applications biomédicales notamment en raison de leur excellente compatibilité avec les systèmes biologiques [90]. Les AuNPs sont considérées comme des candidats prometteurs de vectorisation des siARNs en thérapie anti-cancer de par leur inertie chimique, leurs propriétés optiques et physico-chimiques, et leurs capacités à fonctionnaliser des molécules d'intérêts thérapeutiques [91]. Elles peuvent également permettre un relargage contrôlé des siARNs *via* stimuli endogènes (enzyme, pH, réaction redox) ou extérieurs (lumière, rayons X, champ magnétique).

### III.1 Généralités

Une AuNP est généralement constituée de quelques dizaines à quelques centaines d'atomes d'or et a une taille finale comprise entre 3 et 200 nm. Il est important de noter que les propriétés des AuNPs varient drastiquement en fonction de leur structure, et plus particulièrement de leur taille, de leur forme ainsi que de la nature des ligands utilisés pour les synthétiser définissant leur chimie de surface (**Figure 24**).

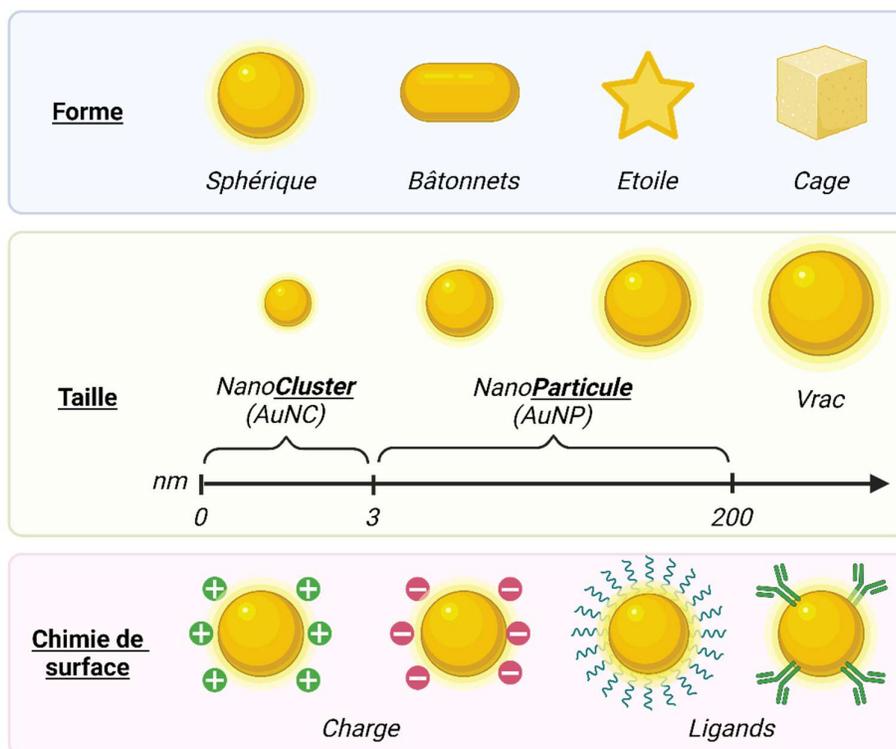


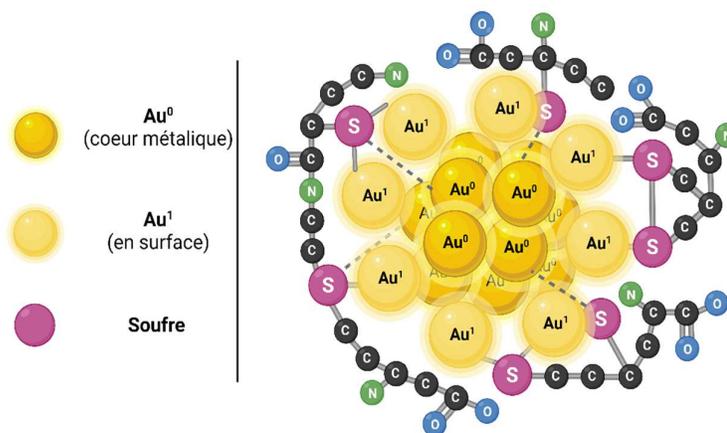
Figure 24 : Illustration des différents paramètres impactant les propriétés physico-chimiques des AuNPs.

Par exemple, les AuNPs sphériques représentent la forme la plus courante en raison de leur facilité de synthèse [92]. La méthode repose sur un processus de nucléation et de croissance notamment *via* des

réactions chimiques utilisant des agents réducteurs à partir de sels d'or qu'on abordera précisément dans la partie résultats [93]. Elles sont largement utilisées en raison de leur faible cytotoxicité, leur taille uniforme, leur bonne biocompatibilité, leur perméabilité tissulaire élevée ainsi que leurs modifications de surface qui sont relativement simples à réaliser [94]. Celles en forme de bâtonnets plus allongées présentent quelques disparités par rapport à leurs homologues sphériques. En effet, il a été montré que ces AuNPs possédaient notamment des propriétés de fluorescence dans les régions de l'infrarouge proche particulièrement intéressantes pour des utilisations en bio-imagerie [95]. Les nanocages d'or quant à elles peuvent par exemple être utilisées pour encapsuler des petites molécules à visée thérapeutique [96].

Ainsi, bien qu'ayant des propriétés communes à toutes les NPs de type inorganique présentées ci-dessus, les applications des AuNPs diffèrent en fonction des objectifs à atteindre et le choix en amont de la forme, de la taille et de la chimie de surface revêt une importance capitale. Pour ce projet de thèse, nous avons utilisé des AuNPs de taille inférieure à 3 nm et appelées Nano**Cluster** d'or (AuNCs).

Lors de la synthèse des AuNCs, des molécules organiques ou des biomolécules (peptides, oligonucléotides ou aptamère par exemple) contenant des thiols sont utilisées afin de stabiliser ces particules formées et apporter des propriétés physico-chimiques particulières. On appelle alors communément ces molécules stabilisatrices « ligands ». Au niveau topologique, les ligands se retrouvent surtout à la périphérie de la AuNP où ils se lient aux atomes d'or en surface par des liaisons covalentes. Ainsi, la structure de base consiste en un noyau (ou cœur métallique) composé d'atomes d'or à l'état fondamental ( $Au^0$ ), entouré d'un revêtement d'atomes d'or oxydés ( $Au^1$ ) en surface et liés aux ligands. Dans la grande majorité des cas, les ligands utilisés sont composés de soufre et sont liés aux atomes d'or *via* une liaison Au-S, formant des groupements thiolates (**Figure 25**).



**Figure 25 : Représentation simplifiée d'un nanocluster d'or entouré et stabilisé par des ligands peptidiques à base de soufre.**

En raison de leur taille très petite, les AuNCs présentent des propriétés sensiblement différentes de leurs homologues de plus grandes tailles.

## III.2 Les propriétés optiques des AuNCs

### III.2.1 Photoluminescence

Les AuNPs de taille supérieure à 3 nm absorbent et diffusent la lumière avec une grande efficacité. Ce phénomène est dû au fait que les électrons libres à la surface du métal subissent une oscillation collective lorsqu'ils sont excités par des radiations électromagnétiques à des longueurs d'onde spécifiques. Cette oscillation collective est connue sous le nom de résonance plasmonique de surface (SPR) et fait que les intensités d'absorption et de diffusion de la lumière des AuNPs sont beaucoup plus élevées que celles d'autres nanoparticules de taille identique dites alors « non plasmoniques » [97]. Basées sur la propriété SPR, différentes techniques ont émergé telles que des études d'interactions moléculaires, où des variations de l'intensité du faisceau réfléchi en fonction de liaisons Or-Molécules peuvent être collectées et quantifiées par un détecteur.

En ce qui concerne les AuNCs, de taille inférieure à 3 nm, certains présentent des propriétés de photoluminescence (PL) dans la large fenêtre de l'infrarouge très intéressantes [98] [99] [100]. La PL est un phénomène physique par lequel une molécule absorbe des photons avant de les réémettre soit sous forme de phosphorescence (restitution lente) soit sous forme de fluorescence (restitution plus rapide). Cependant, malgré des années de travaux utilisant différents modèles de AuNCs, le mécanisme précis de la PL des AuNCs reste toujours à élucider [101]. Une pléthore d'études a été réalisée en utilisant notamment des AuNCs de différentes tailles, et il a été montré que la taille et la chimie de surface des AuNPs jouent un rôle capital sur l'intensité et la longueur d'ondes de PL [102]. Les phénomènes de PL des AuNCs qui proviennent du cœur métallique ont été attribués à la différence d'organisation de leurs niveaux d'énergies (confinement quantique) déterminée en utilisant le modèle simple de Jellium relatif à la matière condensée qui montre une discrétisation de leurs niveaux d'énergies comparé aux particules de plus grandes tailles [103] [104] (**Figure 26**).

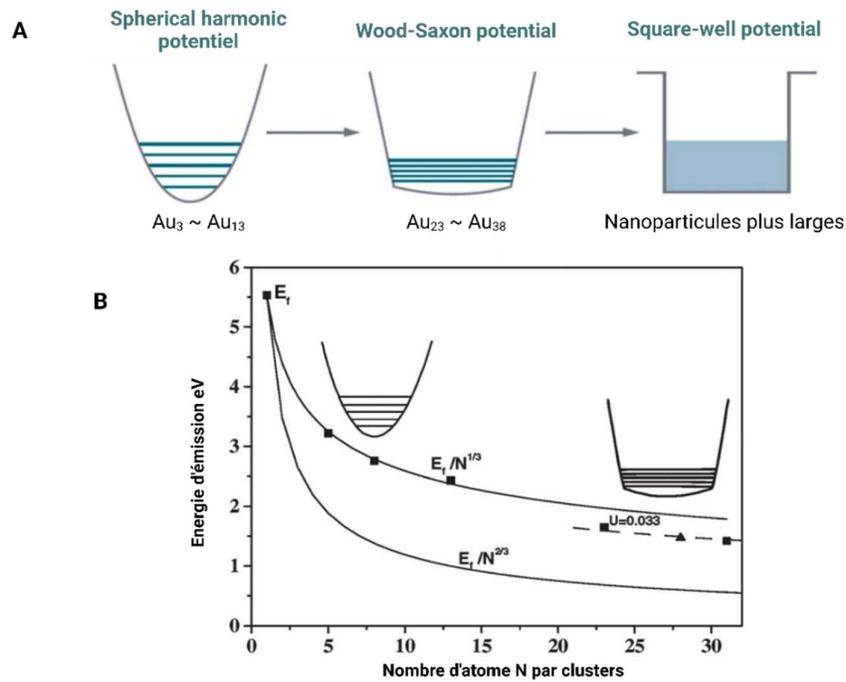


Figure 26 : Illustration schématique de la variation des potentiels de surface de AuNPs en fonction de leur taille (A) corrélée à l'énergie d'émission (B). Issue de Zheng et al. 2012.

C'est-à-dire que plus le nombre d'atomes d'Or (N) qui composent le cœur métallique des AuNCs est faible, plus l'espace entre les niveaux d'énergie est grand (**Figure 26-A**). La **Figure 26-B** montre la corrélation entre l'énergie d'émission et le nombre d'atome N par AuNC. On remarque que l'énergie d'émission diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes.

A noter que le nombre d'atome d'Or présent dans le cœur métallique ne représente pas la seule raison des variations de la PL. En effet, ces variations de la PL seraient aussi fonction de la chimie de surface, et plus particulièrement de la nature des ligands utilisés, de la conformation spatiale, de l'état de valence des atomes d'Or en surface et de la rigidité (compacité) de la couche de ligand [105] [106]. De plus, la PL a été observée à la fois chez des AuNPs non plasmoniques (AuNCs) et plasmoniques.

Suite à ces constats, les AuNPs peuvent être divisés comme représenté ci-dessous (**Figure 27**).

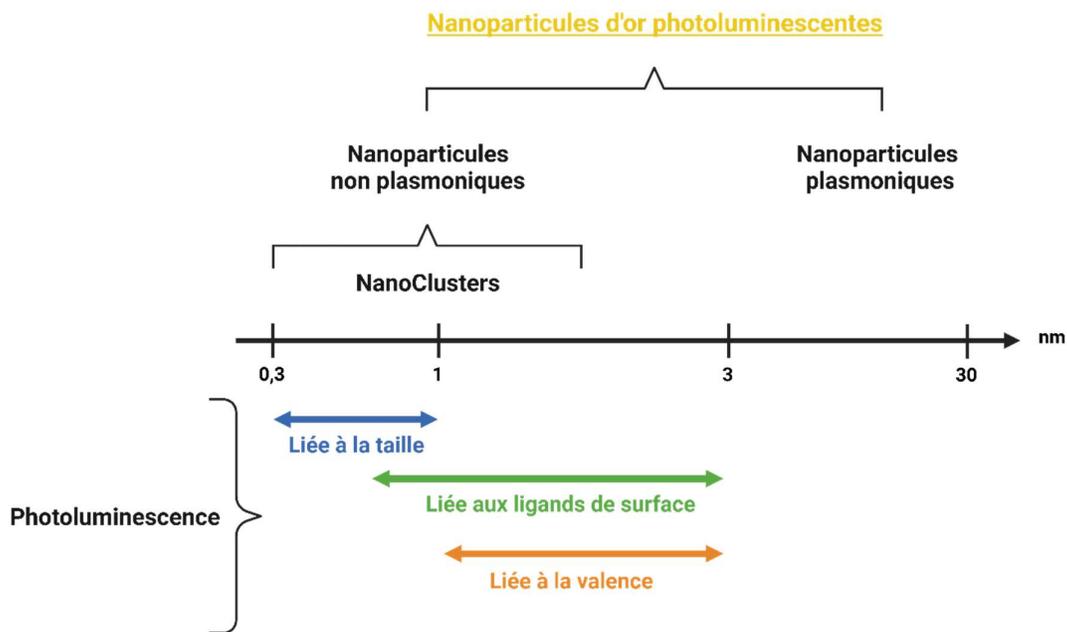


Figure 27 : Arborescence reprenant l'origine des principales sources de la photoluminescence des AuNPs plasmoniques et non plasmoniques. Adaptée de Zheng et al. 2021.

Ces propriétés uniques de PL des AuNCs sont particulièrement intéressantes pour permettre leur suivi par imagerie de fluorescence et notamment leur détection par microscopie.

### III.2.2 Les AuNCs comme agents de contraste

Grâce à leurs propriétés de PL dans le domaine de l'infrarouge, les AuNCs sont utilisés en bio-imagerie et notamment comme agent de contraste dans le cadre de chirurgie anti-cancer assistée par fluorescence.

Comme déjà abordé dans la partie 1, lors des interventions chirurgicales, le surdécoupage des tumeurs peut conduire à l'ablation indésirable de tissus sains environnant. A l'inverse, le sous-découpage laisse des cellules cancéreuses derrière lui, ce qui entraîne une récurrence de la tumeur au fil du temps [107] [108] [109] [110]. Ces dernières années, les techniques d'imageries telles que la tomodensitométrie, l'imagerie par résonance magnétique, la tomographie par émission de positrons ou bien l'échographie ont fait des progrès considérables permettant de produire des images complètes qui peuvent grandement aider les chirurgiens. Cependant, elles ne peuvent pas toujours être utilisées dans le cadre de procédure chirurgicale en temps réel car elles présentent un certain nombre d'inconvénients. Effectivement elles sont d'abord limitées à la détection des tumeurs qui ont atteint un certain seuil de taille, c'est-à-dire quelques millimètres (ou environ 10 millions de cellules) [111], ce qui signifie que de nombreuses tumeurs ne sont pas détectées. Ensuite elles nécessitent souvent l'utilisation de rayonnements ionisants associés à un équipement d'imagerie important (tomodensitométrie ou IRM). Pour finir, la construction d'images prend du temps, a un coût élevé et nécessite un opérateur spécialisé [112].

A l'inverse, l'utilisation de AuNCs photoluminescents dans le cadre d'imagerie de fluorescence présente un certain nombre d'avantages et notamment le fait que l'équipement nécessaire est relativement peu coûteux et portable. Ceci permet de les intégrer en tant que fluorophores en temps réel au cours d'une opération [113]. Le fait que les AuNCs exhibent une fluorescence dans les domaines de l'infrarouge (NIR-I, 700-900 nm et NIR-II, 1000-1700 nm) présente aussi un autre avantage très intéressant. En effet dans les tissus biologiques, de nombreux composés vitaux, tels que l'hémoglobine, les mélanines, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) réduit et des acides aminés tels que le tryptophane et la phénylalanine, contiennent un système de liaison p conjugué [114] [115]. En raison de ce degré de conjugaison, ces composés absorbent intensément la lumière dans la partie UV-visible du spectre électromagnétique ce qui conduit à un rapport signal/bruit de fond non optimal, on parle alors de phénomène d'autofluorescence des tissus. En revanche, ce phénomène est plus faible dans les régions de l'IR. Cette faible autofluorescence associée à une plus faible diffusion de la lumière dans les tissus vivants à de grandes longueurs d'ondes rend donc cette fenêtre biologique très attractive pour l'imagerie optique non invasive en profondeur [116] (**Figure 28**).

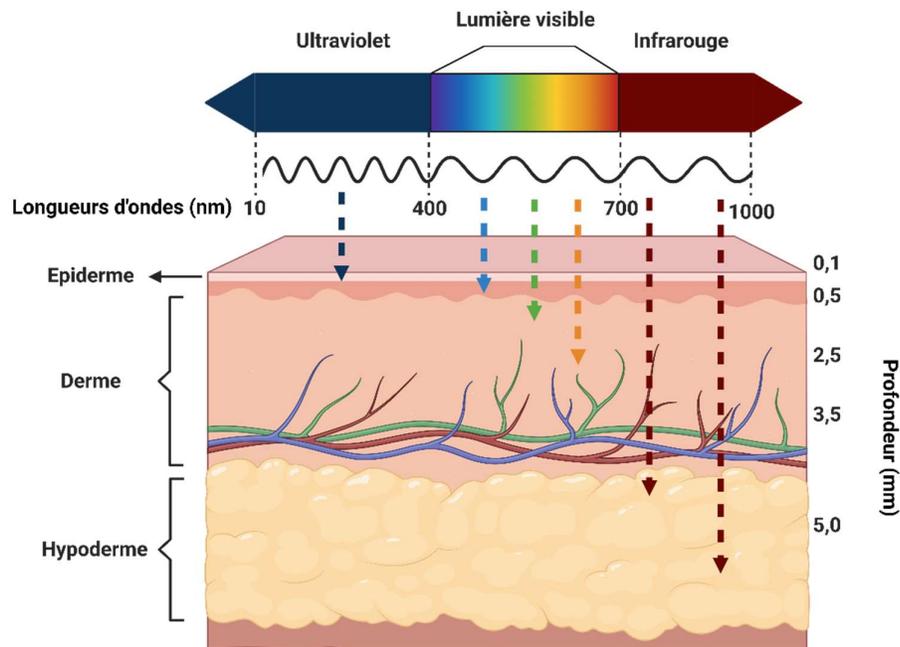
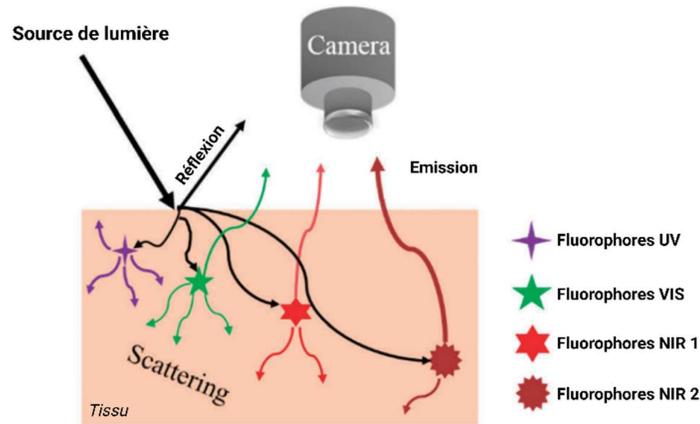


Figure 28 : Illustration des niveaux de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde. Adaptée de Joyce et al. 2020.

De plus, il a été montré que les fluorophores qui émettent dans les domaines de l'infrarouge présentaient une dispersion de la lumière plus faible que leurs homologues qui émettent dans l'UV-visible (**Figure 29**) [117].



**Figure 29** : Illustration des différents niveaux de dispersion de la lumière en fonction de différents fluorophores. Issue de Shuqing He et al. 2018.

Finalement, dans le but d'améliorer ces limitations liées à l'autofluorescence des tissus en imagerie de fluorescence de nouvelles sondes émettant dans l'infrarouge sont de plus en plus développées de nos jours. On retrouve notamment des nanoparticules dites à « luminescence persistante » (PLNP), dotées d'une capacité de luminescence durable dans l'infrarouge et permettant de réaliser des images optiques sans excitation et donc sans autofluorescence [118].

### III.3 Les propriétés des AuNCs pour la thérapie

#### III.3.1 Vectorisation de biomolécules

Les AuNCs sont capables de vectoriser des molécules. Ceci est possible grâce à leur rapport surface/volume élevé, ce qui leur permet de lier et d'être recouvertes par une quantité importante de composés. En effet, comme déjà abordé plus haut, la plupart des AuNPs sont composées de ligands qui sont localisés en surface pour stabiliser la particule. Ces ligands sont très variables et apportent des propriétés physico-chimique particulières aux AuNPs [119]. De plus ils permettent à la particule d'avoir une chimie de surface complètement modifiable. En d'autres termes, cela signifie qu'en fonction du ligand utilisé lors de la synthèse des AuNPs, il est possible de les fonctionnaliser avec des molécules à intérêt thérapeutique ou diagnostique telles que des peptides, des carbohydrates, des anticorps, des oligonucléotides, des polymères ou des fluorophores par exemple [120].

Cette fonctionnalisation peut être réalisée par lien covalent ou par post-fonctionnalisation des ligands présents à la surface des AuNPs par des méthodes chimiques (couplages peptidiques, chimie click ou couplage EDC notamment). Elle peut aussi être obtenue par interactions électrostatiques ou hydrophobes là encore en fonction des ligands utilisés (**Figure 30**).

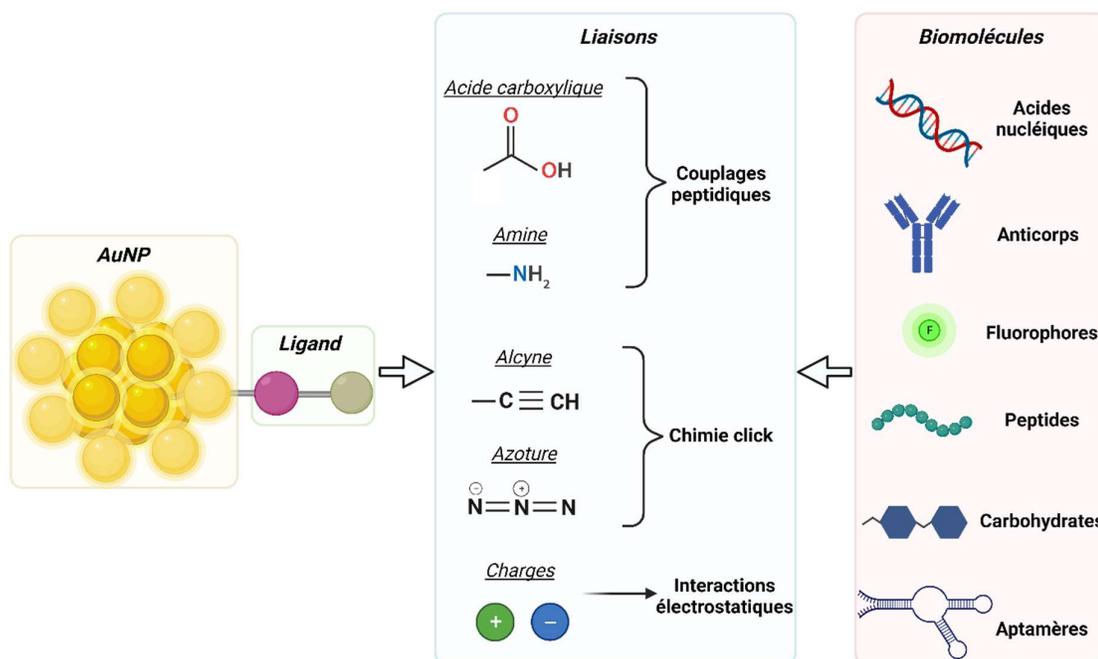


Figure 30 : Illustration de quelques exemples de fonctionnalisation de AuNPs avec des biomolécules d'intérêt thérapeutique ou diagnostic.

Dans le cadre de ce projet nous nous intéresserons plus particulièrement à la vectorisation de siARN grâce aux AuNPs. Comme illustré **Figure 30** il y a plusieurs méthodes pour lier un siARN sur une AuNP notamment en modifiant les propriétés des AuNPs (utilisation de ligands particuliers), mais comme on l'a

indiqué précédemment (II.2.3) il est aussi possible de modifier la structure du siARN pour lui apporter des groupements chimiques (amine, acide carboxylique, azoture ou alcynes par exemple) permettant la liaison. En fonction de l'objectif à atteindre, on peut donc adapter le type de liaison (plus ou moins forte) entre les deux espèces et par conséquent avoir aussi un certain contrôle du relargage du siARN dans le site cible. Selon le type de liaison utilisée, le relargage peut avoir lieu selon plusieurs mécanismes impliquant des modifications du pH, des changements de température, l'apport de lumière, des clivages enzymatiques ou par des réactions rédox par exemple.

Finalement, le **Tableau 1** ci-dessous regroupe quelques exemples de siARNs utilisés en thérapie anti-cancer et vectorisés grâce à des nanoparticules d'or [121] :

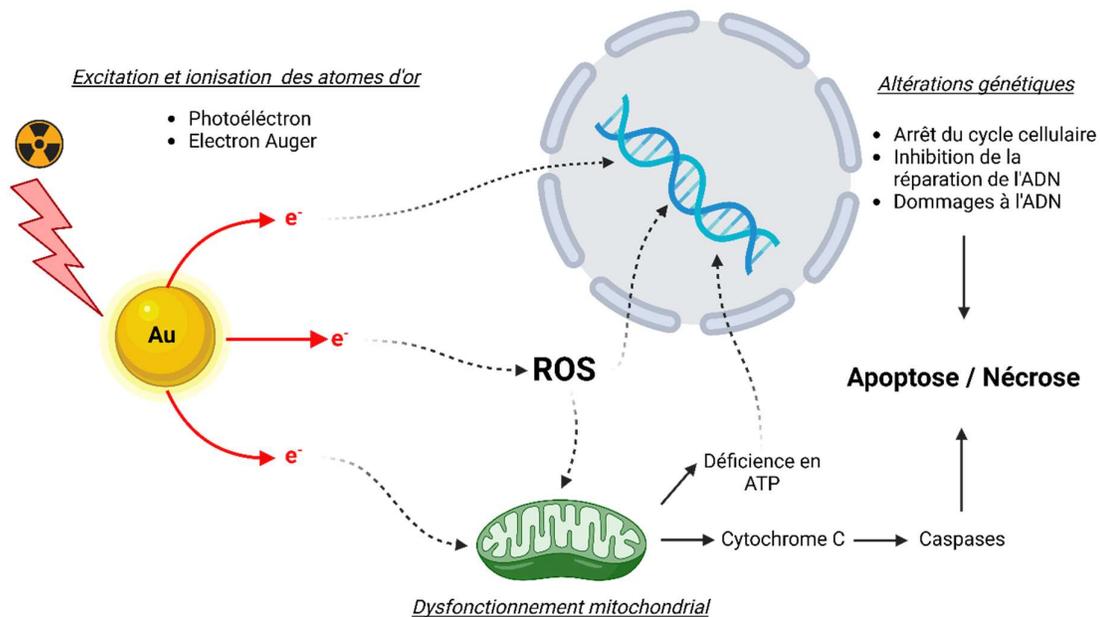
Composés anticanciers	Tissus / Lignées cellulaires	Résultats principaux	Type de AuNP	Références
siARN anti protéines BCL (anti-apoptotique)	Adénocarcinome cervical (HeLa) ; Adénocarcinome colorectal (Caco-2) ; Leucémie (THP-1) ; Lymphome (U937)	Complexation et protection efficace du siARN. Diminution de l'expression des protéines BCL.	Sphérique, liée à des dendrimères et de taille comprise en 120 et 800 nm.	[122]
siARN anti NGF (facteur de croissance)	Pancréas (Panc-1)	Augmentation de la stabilité du siARN dans le sérum et du temps de circulation. Amélioration de l'accumulation tumorale et diminution de l'expression du NGF.	Stabilisée avec des ligands glutathion ou oligoarginine avec des tailles comprises entre 15 et 80 nm.	[123]
siARN anti erbB2 (facteur de croissance épidermique)	Cancer ovarien (SK-OV-3)	Ciblage tumoral et activité anti tumorale efficace. Biodistribution élevée.	Sphérique et liée à une protéine recombinante d'une centaine de nm.	[124]
siARN anti EGFR (facteur de croissance épidermique)	Adénocarcinome cervical (HeLa)	Bonne accumulation tumorale. Inhibition de EGFR et de l'invasion tumorale.	Stabilisée avec un ligand de type polyéthylèneimine avec une taille d'environ 170 nm.	[125]

**Tableau 1 : Exemples de siARNs vectorisés à l'aide de AuNCs en thérapie anti-cancer. Adapté de Yafout et al. 2021.**

A noter que les AuNCs sont aussi tout à fait utilisable pour la vectorisation d'autres drogues telles que des composés chimiques ou à base de métaux lourds. En ce qui concerne les cancers du poumon, des résultats prometteurs ont notamment été obtenus avec des composés comme le methotrexate [126], l'oxaliplatine [127], l'etoposide [128] ou bien encore la doxorubicine [129].

### III.3.2 Propriétés radiosensibilisantes

En raison de son numéro atomique élevé ( $Z=79$ ), l'or est reconnu comme un agent capable de sensibiliser les cellules aux effets des radiations. En effet les matériaux à  $Z$  élevés ont un coefficient d'absorption d'énergie massique plus élevés comparé à ceux à  $Z$  faibles [130]. Par conséquent, en introduisant ce genre de matériau dans les tissus, l'effet local du rayonnement est considérablement renforcé. Il a été montré que cet effet de radiosensibilisation lié à l'or provenait d'une cascade de phénomènes biochimiques qui découlait de l'interaction physique entre un rayonnement ionisant composé de photons et le matériau [131]. Lorsqu'ils vont atteindre les atomes d'or, les photons incidents vont alors être absorbés ou déviés en fonction de l'énergie du rayonnement utilisé. L'énergie de rayonnement absorbée par les atomes d'or est alors libérée localement par l'émission de photons, d'électrons à faible énergie (photoélectrons) ou d'électrons Auger *via* différents mécanismes tels que les effets photoélectrique et Compton ou bien de création de paires. Ces électrons de faible énergie peuvent alors soit causer des dommages directs aux organites biologiques situés à proximité telles que les mitochondries, soit produire des radicaux libres de l'oxygène et causer des dommages indirects aux molécules biologiques *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 31**) [132] [133].



**Figure 31** : Illustration des différents mécanismes induisant une radiosensibilité cellulaire *via* l'utilisation de AuNPs. Inspirée de Chen et al. 2020.

Cet effet de radiosensibilisation permet donc d'augmenter localement la dose délivrée afin de surmonter l'hétérogénéité de la réponse notamment dans les microenvironnements tumoraux où l'hypoxie et la prolifération cellulaire sont importantes [134].

### III.3.3 Propriétés photothermique et photodynamique

En raison de leur résonance plasmonique de surface, lorsque les AuNPs sont excitées par une lumière incidente de longueurs d'onde comprises entre 700 et 800 nm, elles sont capables d'absorber l'énergie lumineuse et de la convertir en chaleur. En effet lorsque de la lumière polarisée est appliquée sur une tumeur contenant des nanoparticules d'or, les particules se réchauffent rapidement ce qui provoque une augmentation locale des températures dans le micro environnement ce qui cause la mort des cellules tumorales [135]. Cette capacité est à l'origine de leur utilisation dans le cadre de la traitement par photothérapie (PTT) pour éliminer les cellules cancéreuses [136] [137]. Il s'agit d'une modalité de traitement attrayante en raison de la possibilité d'applications répétées et des effets secondaires moins pesant par rapport à d'autres traitements conventionnels du cancer [138]. Bien que les AuNPs sphériques soient largement étudiées, c'est surtout les AuNPs en forme de bâtonnets qui sont les principales nanostructures utilisées en PTT en raison de leur forte absorption dans la région du proche infrarouge, là où celles sphériques absorbent principalement la lumière visible [139] [140].

En outre, cette capacité photosensibilisante est souvent utilisée en association avec un autre type de technique basée sur la lumière qui est la thérapie photodynamique (PDT). L'objectif de cette dernière est d'utiliser des molécules photosensibilisantes, devenant toxiques pour la cellule et son environnement *via* notamment la libération d'oxygène singulet (ROS) lorsqu'elles sont irradiées. Ainsi la chaleur générée par la PTT a dans un premier temps pour effet d'améliorer la perméabilité des tissus et des membranes cellulaires, ce qui permet d'augmenter l'administration et l'absorption par les cellules des agents photodynamiques qui ont souvent une courte durée de vie et un rayon d'action limité (**Figure 32**) [141].

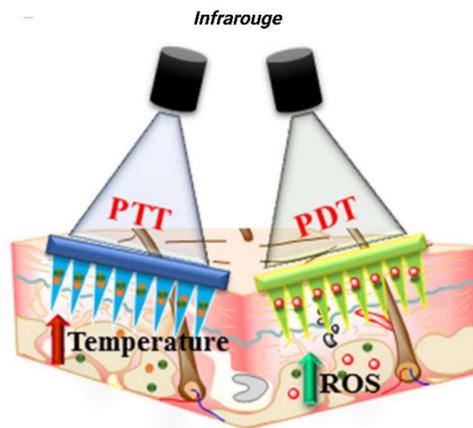
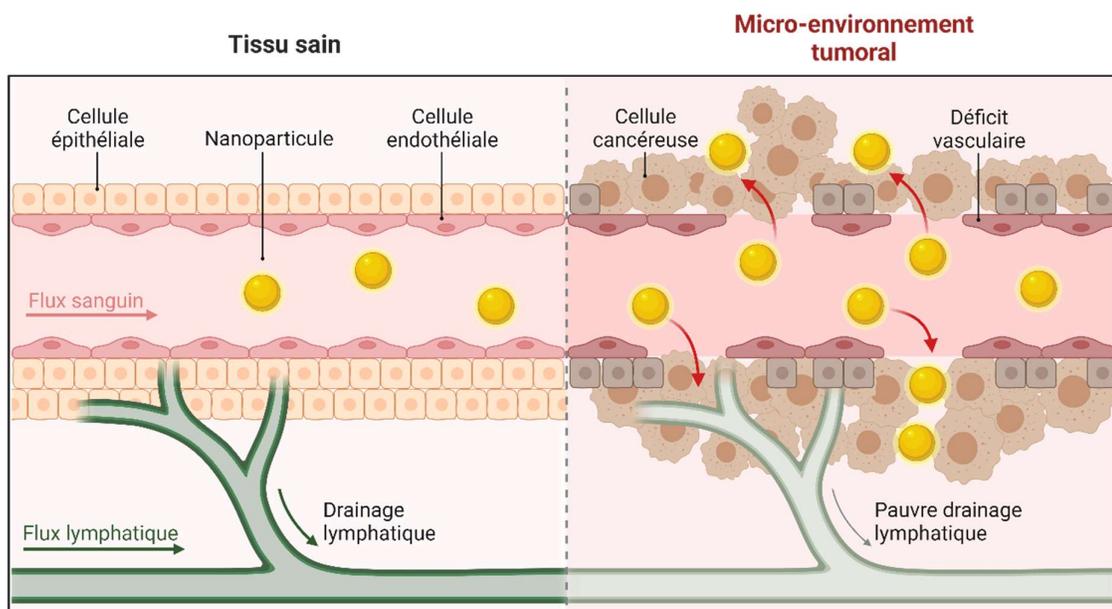


Figure 32 : Illustration de l'utilisation combinatoire de la photothérapie (PTT) et de la thérapie photodynamique (PDT).  
Issue de Zhi et al. 2020.

### III.3.4 Effet d'augmentation de la perméabilité et de la rétention (EPR)

La dernière propriété des AuNPs que nous allons aborder dans cette partie concerne leur capacité à s'accumuler passivement dans le micro environnement tumoral. En effet, dans le cadre du développement de certaines tumeurs, les phénomènes de néoangiogenèse augmentent ce qui conduit à une désorganisation de l'endothélium environnant. Les tumeurs solides contiennent ainsi des vaisseaux sanguins non étanches et pouvant présenter des espaces de jonction cellulaire allant de 100 nm à 780 nm [142]. Ceci conduit alors à une vascularisation altérée, poreuse et plus perméable, et il a été montré que des AuNPs circulantes d'une certaine taille avaient la capacité de passer à travers cet endothélium fenestré pour s'accumuler passivement dans les sites tumoraux (**Figure 33**).



**Figure 33** : Illustration de l'effet d'amélioration de la pénétration et de la rétention de nanoparticules au sein d'un micro-environnement tumoral (effet EPR).

Les propriétés, et notamment la taille, des AuNPs utilisées ont alors un impact direct sur l'efficacité de cet effet. Effectivement il a été montré que des particules de taille d'une centaine de nanomètres étaient considérées comme optimales pour pénétrer dans les tumeurs solides tout en échappant aux systèmes de filtration au niveau de la glande hépatique ou de la rate [143]. Paradoxalement, des études récentes ont montré que les AuNPs de petites tailles (< 6 nm) étaient éliminées par excrétion rénale en quelques minutes, et que les nanoparticules plus grosses étaient capturées par le système réticulo-endothélial [144].

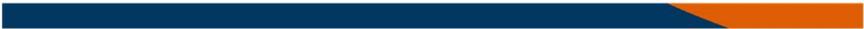
Cependant, malgré l'intérêt bénéfique de cet effet EPR pour le ciblage tumoral passif des AuNPs, de nombreux débats dans la communauté scientifique subsistent concernant ce sujet. En effet, bien que les AuNPs puissent être capables d'atteindre passivement les sites tumoraux, il existe encore des limites

d'accessibilité en raison de l'hétérogénéité dans les différents types de cancers due par exemple à la vascularisation ou à l'état de maturité des tumeurs [145] [146] [147]. Plus particulièrement il a été démontré que les variations de l'épaisseur et de la densité de la matrice extracellulaire, la distribution inégale du flux sanguin et la perméabilité disproportionnée des vaisseaux affectent l'efficacité de cet effet EPR [148]. Ces facteurs varient considérablement d'une tumeur à l'autre et même au sein de la même tumeur à mesure de son développement au cours du temps. On peut parler notamment de lignées cancéreuses EPR « positives » ou « négatives ». Un autre facteur qui vient alimenter les débats sur cet effet controversé provient des variations des propriétés physicochimiques du vecteur de médicament lui-même, dans notre cas les AuNPs. Effectivement à l'échelle nanométrique, la taille, la forme et l'élasticité, contribuent aussi à l'hétérogénéité de l'effet EPR [149] [150]. Finalement, il faut aussi mentionner que la compréhension actuelle de l'effet EPR est principalement basée sur des données issues d'études sur animaux, en particulier sur des modèles de xénogreffes à croissance rapide chez la souris, ce qui laisse parfois un flou quant aux propriétés de cet effet chez l'Homme.

► Par conséquent, le développement d'un système de vectorisation composé de AuNCs et ayant des propriétés de ciblage spécifique de sites de croissance tumorale est d'un grand intérêt et permettrait de s'affranchir des effets controversés de l'EPR. Le prochain et dernier chapitre de cette introduction bibliographique sera donc dédié au développement d'un ciblage actif des AuNCs, en s'intéressant notamment aux transporteurs des sucres qui sont surexprimés dans une large variété de cellules cancéreuses.

---

## **Introduction bibliographique**



---

### **IV. La surexpression des transporteurs du glucose dans le développement et le ciblage tumoral**

---

## IV.1 Le transport du glucose dans l'organisme

Le glucose (Glc) est un aldohexose considéré comme la principale source d'énergie dans les organismes vivants. Chez l'Homme il est principalement apporté par des glucides alimentaires qui contiennent de grandes quantités de Glc principalement sous forme de monosaccharides, d'oligosaccharides et de polysaccharides, tels que le maltose, l'amidon et le glycogène [151]. En tant que carburant principal de la glycolyse et des voies en aval de la respiration aérobie et anaérobie, l'utilisation du Glc est ubiquitaire et est responsable de la génération d'une grande partie du potentiel énergétique sous forme d'ATP, nécessaire à la croissance et au développement des organismes [152]. C'est par exemple un carburant essentiel pour le cerveau chez l'Homme avec une consommation d'environ 25% des apports totaux en Glc pour un adulte. Il sert également de précurseur pour la synthèse de nombreuses biomolécules et joue un rôle important dans la signalisation cellulaire.

En raison des rôles métaboliques et énergétiques essentiels du Glc ainsi que sa nature hydrophile, il existe de multiples transporteurs responsables d'assurer les mouvements transmembranaires de ce sucre dans les divers tissus de l'organisme. A ce jour, trois familles de transporteurs ont été identifiées pour le transport du Glc mais aussi d'autres sucres de manière générale :

1. Les GLUTs (Glucose Transporter), qui est la famille la plus largement étudiée.
2. Les SGLT (Sodium Glucose Linked Transporter), des symports de Glc pilotés par le sodium.
3. Les SWEET (Sugars Will Eventually be Exporter Transporter), récemment caractérisés surtout chez les plantes.

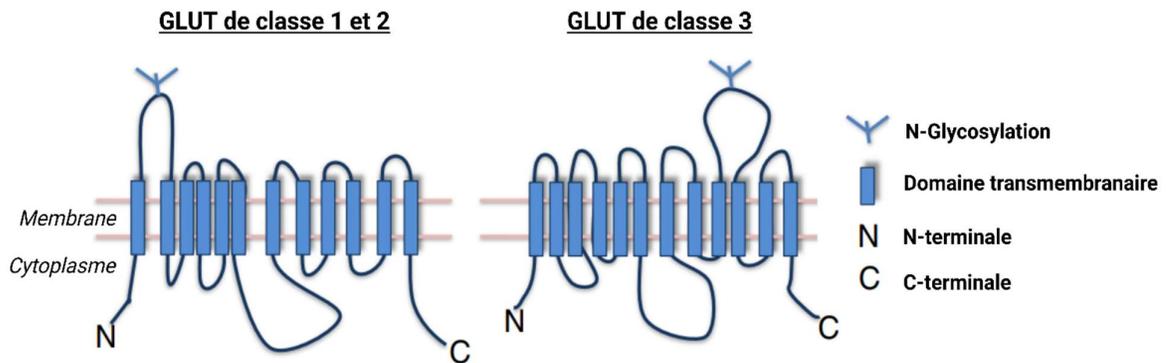
Ces transporteurs ont des rôles physiologiques et des mécanismes de fonctionnement bien distincts, dans un contexte physiologique ou de cancer. Afin d'élucider leurs mécanismes et d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le développement de médicaments, les structures de ces transporteurs ont été largement étudiées. Parmi les trois familles de transporteurs citées ci-dessus, l'étude structurale des GLUTs est la plus avancée actuellement avec notamment les structures résolues pour les GLUT1 et GLUT3 humains [153] [154]. Pour les SGLT et les SWEET, seules les structures des homologues bactériens, vSGLT et SemiSWEETs, ont été obtenues [155] [156].

Mon projet de thèse s'est tout particulièrement intéressé aux transporteurs GLUTs.

## IV.1.1 Les transporteurs GLUTs

### IV.1.1.1 Structures et répartition dans l'organisme

Les GLUTs sont des transporteurs ubiquitaires de type uniport. Ils appartiennent à la superfamille majeure de facilitateurs (MFS) qui regroupe un grand nombre de transporteurs membranaires impliqués dans la circulation de petites molécules dissoutes en fonction du gradient de concentration. Ils sont généralement composés d'environ 500 acides aminés et permettent le passage bidirectionnel par diffusion facilitée (ou passive, donc sans énergie) d'une molécule de Glc à travers une membrane. Actuellement on dénombre quatorze transporteurs GLUTs, chacun différent compte tenu de leur affinité avec les différents sucres et de leur expression tissulaire. Malgré ces différences, ils restent structurellement proches et sont organisés en trois classes (**Figure 34**) [157].



**Figure 34 : Modèles bidimensionnels des GLUTs de classe I, II et III.** Les extrémités N et C terminales sont orientées vers le cytoplasme et des structures d'oligosaccharides liées par N-glycosylation sont orientées vers l'espace extracellulaire. Issue de Uldry M. et Thorens B. 2004.

La classe 1 comprend les GLUTs 1-4 et 14, la classe 2 les GLUTs 5, 7, 9 et 11 tandis que la classe 3 les GLUTs 6, 8, 10, 12 et 13 (HMIT). Chaque GLUT est composé de douze hélices transmembranaires dont les extrémités N et C terminales se retrouvent dans le cytoplasme de la cellule, avec une boucle contenant un site de N-Glycosylation du côté extracellulaire. Dans les GLUTs de classe 1 et 2, cette boucle se trouve entre les domaines transmembranaires 1 et 2, tandis que dans ceux de la classe III, elle se trouve entre les domaines 9 et 10 [158].

Comme expliqué un peu plus haut, la détermination de la structure précise de ces transporteurs est très complexe et a surtout été étudiée en se basant sur les transporteurs bactériens. En raison de son ubiquité, de nombreuses études ont notamment été portées sur le GLUT1. La **Figure 35** ci-dessous fournit une structure globale du transporteur de Glc humain GLUT1 qui a été cristallisé et modélisé assez récemment à partir de l'étude de la diffraction de rayons X et de données issues de ses homologues bactériens XylE et GlcP [153].

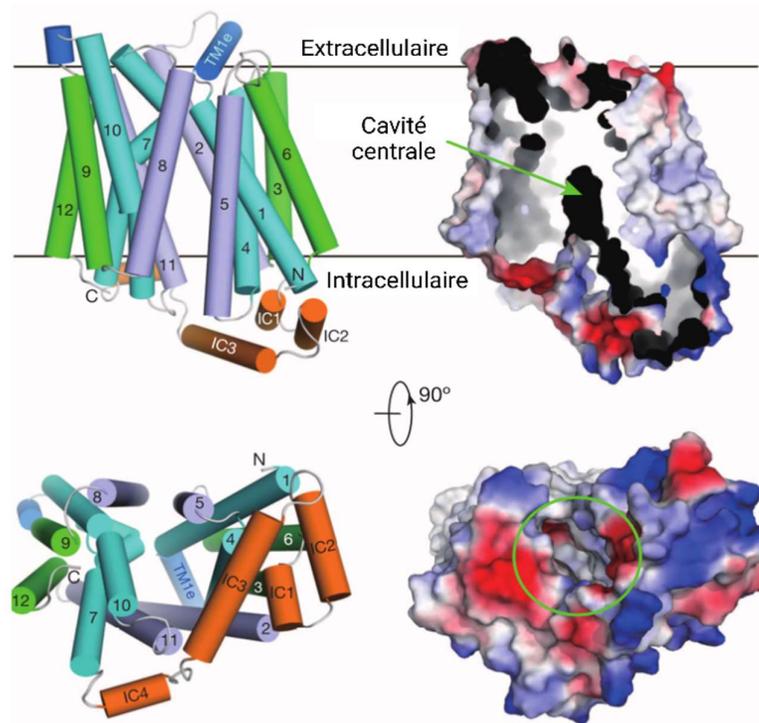
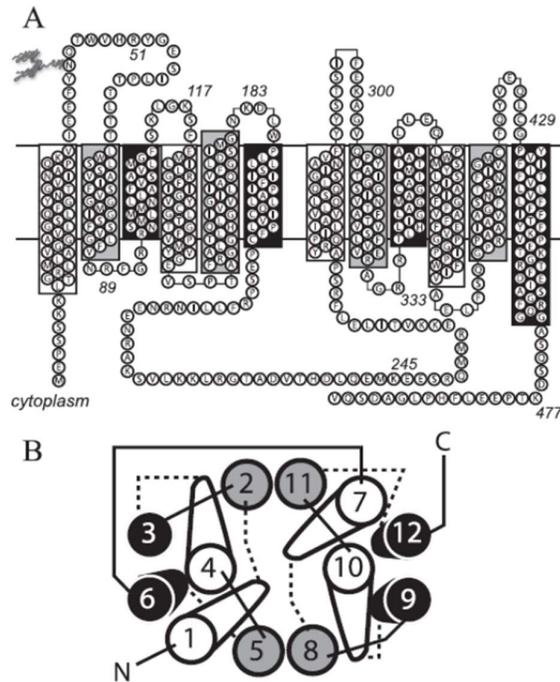


Figure 35 : Modélisation de la structure du transporteur de glucose humain GLUT1. Issue de Deng et al. 2014.

Sur cette représentation, le transporteur adopte une conformation ouverte vers l'intérieur de la cellule avec des vues latérales et cytoplasmiques. Les extrémités N et C entourent une cavité centrale du côté intracellulaire et sont reliées par un faisceau hélicoïdale composé de 4 petites hélices  $\alpha$  intracellulaires (IC) qui a été nommé « ICH » (Intracellular Helical Bundle ; en orange sur la **Figure 35**). Curieusement, le domaine ICH a également été observé dans les structures des homologues bactériens XylE et GlcP, mais pas dans d'autres transporteurs de la famille des MFS, ce qui suggère que ce domaine pourrait être une caractéristique unique des GLUTs [159].

Il a été montré que la composition en acides aminés des 12 domaines transmembranaires composant les GLUTs variait, rendant certains d'entre eux plus hydrophiles que d'autres. Cette différence serait à l'origine de l'organisation particulière de la cavité centrale du transporteur, où les domaines seraient arrangés de manière à former un canal hydrophile permettant le passage des sucres (**Figure 36**) [160] [161].



**Figure 36 : Topologie putative du transporteur GLUT1 et organisation structurale de sa cavité centrale.** Issue de Blodgett et al. 2008.

Ainsi les domaines 1, 4, 7 et 10 notamment formeraient une voie de translocation hydrophile pour le passage des ligands, tandis que les autres domaines seraient plus impliqués dans l'architecture du transporteur et son intégration à la bicouche lipidique [162].

Le **Tableau 2** ci-dessous résume finalement les différentes propriétés par transporteurs GLUTs ainsi que leurs principaux sites d'expression dans l'organisme :

Transporteurs	Isoforme (aa) / Poids (kDa)	Substrats	Sites d'expression	Références
<b>GLUT1</b> (SLC2A1)	492/54	Glucose (Km 3 mmol/L); Galactose (Km 17 mmol/L); Mannose (Km 20 mmol/L); Glucosamine (Km 2.5 mmol/L); DHA (Km 1.1 mmol/L)	Ubiquitaire	[163] [164] [165]
<b>GLUT2</b> (SLC2A2)	524/55	Glucose (Km 17 mmol/L); Galactose (Km 92 mmol/L); Mannose (Km 125 mmol/L); Glucosamine (Km 0.8 mmol/L); Fructose (Km 76 mmol/L)	Reins, intestins, glande hépatique et pancréas	[163] [166]
<b>GLUT3</b> (SLC2A3)	496/45	Glucose (Km 1.4 mmol/L); Galactose (Km 8.5 mmol/L); Mannose; Xylose; DHA	Cerveau, testicule	[167] [168]

La surexpression des transporteurs du glucose dans le développement et le ciblage tumoral

<b>GLUT4</b> (SLC2A4)	509/55	Glucose (Km 5 mmol/L); DHA (Km 0.98 mmol/L); Glucosamine (Km 3.9 mmol/L)	Muscle, tissu adipeux et cœur	[169] [170]
<b>GLUT5</b> (SLC2A5)	501/55	Fructose (Km 6 mmol/L)	Intestins, reins et testicules	[171] [172]
<b>GLUT6</b> (SLC2A6)	507/46	Glucose	Rate, cerveau et leucocytes	[173]
<b>GLUT7</b> (SLC2A7)	524/53	Glucose (Km 0.3 mmol/L); Fructose (Km 0.2 mmol/L)	Intestins, colon, testicules et prostate	[174] [175]
<b>GLUT8</b> (SLC2A8)	477/51.5	Glucose (Km 2 mmol/L)	Testicules, cerveau, glande surrénale, glande hépatique, rate, tissu adipeux et poumons	[176]
<b>GLUT9</b> (SLC2A9)	GLUT9a 511/66/ GLUT9b 540/46	Glucose (Km 0.61 mmol/L); Fructose (Km 0.42 mmol/L); Urate (Km 0.9 mmol/L)	Glande hépatique, reins, placenta et pancréas	[177] [178]
<b>GLUT10</b> (SLC2A10)	541/57	2-deoxy-D-glucose (Km 0.3 mmol/L); Galactose	Cœur, poumons, cerveau, glande hépatique, muscle, pancréas, placenta et reins	[179] [180]
<b>GLUT11</b> (SLC2A11)	496/54	Glucose (Km 0.16 mmol/L); Fructose (Km 0.16 mmol/L)	GLUT11-A- cœur, muscle, reins; GLUT11-B- placenta, tissu adipeux, reins; GLUT11-C-cœur, muscle, tissu adipeux, pancréas	[181] [182]
<b>GLUT12</b> (SLC2A12)	617/67	Glucose	Muscle, cœur, tissu adipeux, intestins, prostate, placenta	[183] [184]
<b>HMIT</b> (GLUT13, SLC2A13)	618/629/69	Myoinositol (Km 0.1 mmol/L)	Cerveau	[185]
<b>GLUT14</b> (SLC2A14)	497/520/N/A	N/A	Testicules	[186]

Tableau 2 : Tableau synthétisant les isoformes, le poids moléculaire, l'affinité avec certains substrats ainsi que la répartition tissulaire des différents GLUTs. Issu de Carly C. Barron 2015.

L'affinité apparente des différents GLUTs pour les sucres est souvent donnée *via* des mesures de constante de Michaelis « Km ». Il s'agit d'une constante cinétique exprimée en mole/litre qui représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale. Elle est reliée à la constante de dissociation « Kd » d'une enzyme pour son substrat. Dans la plupart des études mentionnées ci-dessus cette constante est déterminée lors d'expériences d'absorption de sucres associés à un marqueur radioactif (fluor ou tritium par exemple) à différentes concentrations.

#### IV.1.1.2 Mécanisme de transport

Bien qu'encore relativement nouvelles, des études de dynamiques moléculaires ont été effectuées afin de déterminer le mécanisme de passage des sucres (notamment Glc) à travers GLUT1. Ces travaux ont été réalisés *via* plusieurs tests de modélisations, et notamment des études de :

- Passage de Glc à travers le transporteur en fonction de son orientation (ouverte vers l'extérieur, fermée, ouverte vers l'intérieur).
- Mesure des positions énergétiquement favorables et des temps d'interactions du Glc avec des résidus d'acides aminés présents sur les faces extérieure et intérieure du transporteur.
- L'impact de mutations de certains résidus d'acides aminées composant le transporteur sur l'interaction ou la diffusion du Glc.

D'une manière générale, la fixation de Glc sur le transporteur se traduit par un dynamisme structurel médié par les domaines transmembranaires et ICH (**Figure 37**).

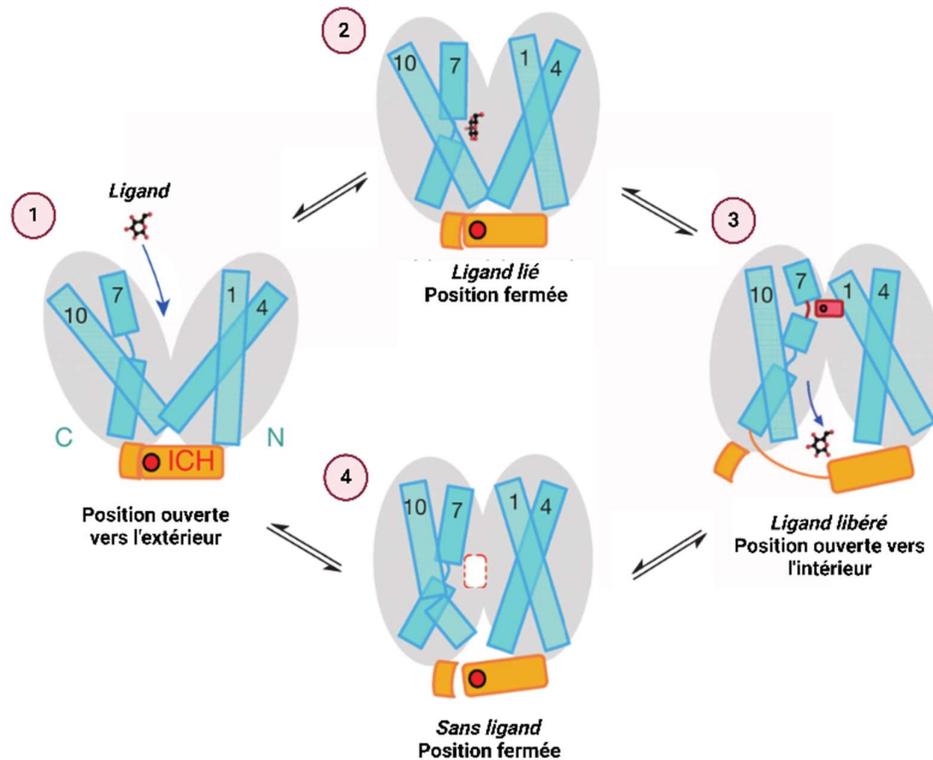


Figure 37 : Modèle envisagé pour le transport de molécules médié par GLUT1. Issue de Deng et al. 2014.

Dans ce modèle, le domaine ICH est illustré comme un loquet qui renforce la partie intracellulaire dans les conformations tournées vers l'extérieur. Il a été montré que l'on retrouvait bien l'implication de certains domaines hydrophiles précédemment cités (1, 4 et 7 notamment, **Figure 36**) pour le passage du Glc qui forme des liaisons hydrogènes fortes avec certains résidus d'acides aminés (Val69, Arg126, Asn34, Tyr292 notamment) [187]. Le Glc forme ensuite des liaisons hydrogènes avec d'autres résidus d'acides aminés, ce qui entraîne une réorientation des chaînes latérales hydrophobes, se traduisant par son passage dans la cavité centrale et son entrée dans le milieu intracellulaire. L'isomérisation des sucres auraient également un impact sur la liaison et le passage à travers le transporteur. Nous aurons l'occasion d'en discuter dans la partie résultats.

## IV.2 Les transporteurs GLUTs pour le ciblage actif des cellules tumorales

Comme énoncé précédemment, le ciblage spécifique pour l'éradication des cellules cancéreuses sans affecter les cellules et les tissus normaux reste un défi important en matière de thérapie anti-cancéreuse. Certains biomarqueurs étant spécifiques des cellules tumorales, la plupart des stratégies consiste à conjuguer une molécule pouvant cibler ces biomarqueurs avec une autre molécule ayant une action cytotoxique. On peut citer notamment des conjugués anticorps ou aptamères couplés à une drogue, ciblant des antigènes ou des séquences nucléotidiques d'intérêt spécifiques à la tumeur [188] [189].

Dans cette partie, et pour ce projet de thèse, nous nous intéresserons aux conjugués glucide-drogue, qu'on appellera par la suite « Glycoconjugués ». En effet les glucides présentent un grand intérêt pour les thérapies ciblées contre le cancer depuis les découvertes majeures du scientifique Allemand, Otto Warburg, à l'origine de la description d'un effet portant son nom [190].

### IV.2.1 Effet Warburg et surexpression tumorale des GLUTs

Otto Warburg a observé une différence marquée quant au métabolisme du Glc entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. Effectivement les cellules cancéreuses, hautement prolifératives, exigent une quantité considérablement accrue de Glc comme source d'énergie pour croître et continuer de se multiplier. L'effet Warburg décrit qu'en conditions aérobiques, contrairement aux cellules saines qui utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP, les cellules cancéreuses utilisent elles quasi exclusivement la glycolyse (**Figure 38**).

Par rapport à la phosphorylation oxydative qui génère jusqu'à 36 moles d'ATP par molécule de Glc, la glycolyse en aérobie produit de l'ATP avec un rendement beaucoup plus faible, seulement 4 moles d'ATP par molécule de Glc [191].

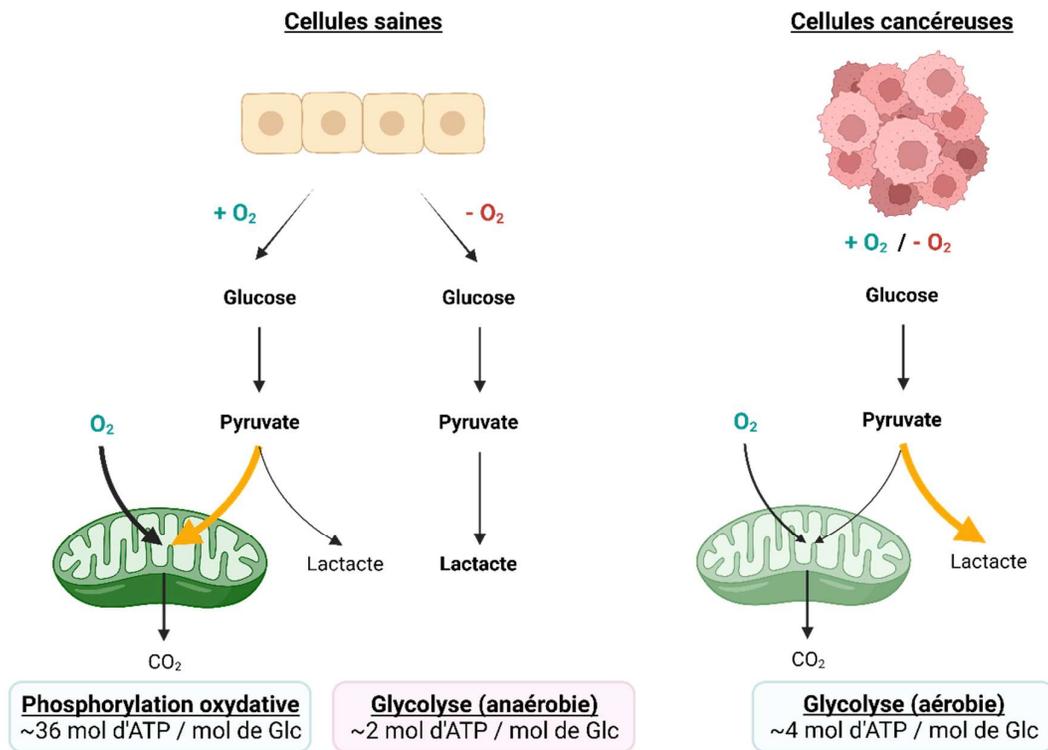


Figure 38 : Illustration de l'effet Warburg. Adaptée de Heiden et al. 2012..

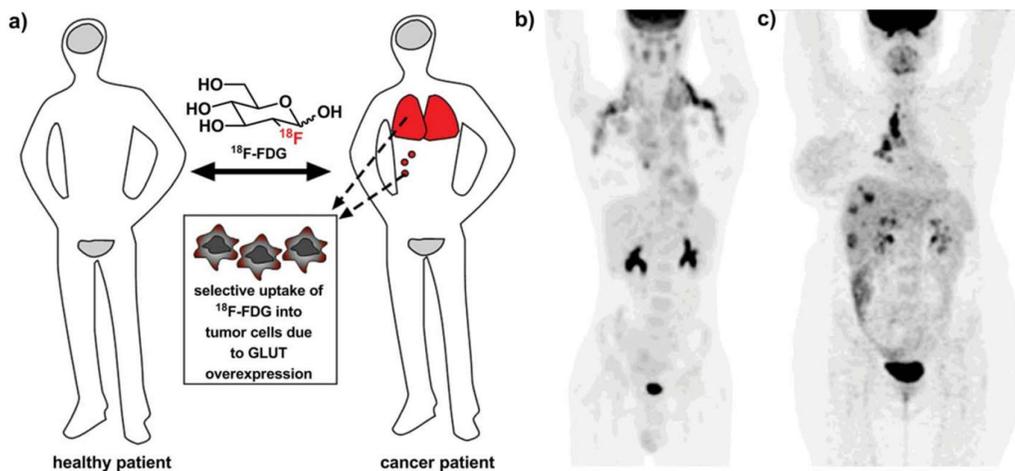
Ce changement métabolique préférentiel des cellules cancéreuses pour la glycolyse qui est énergétiquement bien moins favorable se traduit par une demande en Glc toujours plus grande. Pour répondre à cette forte demande, les cellules cancéreuses vont alors exprimer des taux relativement élevés de GLUTs à la surface de leurs membranes cellulaires. Effectivement, de nombreuses études ont montrées que des niveaux élevés de GLUTs étaient observés dans des échantillons de biopsies tumorales, et surtout, étaient en corrélation avec un mauvais pronostic du cancer [192] [193] [194] [195] [196]. Concernant ce projet de thèse, cette surexpression des GLUTs est également bien présente dans les cancers du poumon [197] [198] [199].

Dans la littérature, la surexpression de GLUT1 dans les CPNPCs peut être mise en évidence *via* la quantification de valeurs d'internalisation tumorale standardisée (SUV) de glucose radioactif (2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose). Ces valeurs de SUV représentent le rapport entre la concentration tissulaire maximale d'éléments radioactifs et la dose d'élément injectée dans le corps. Dans de nombreuses études cliniques chez des patients atteints de cancer du poumon, de grandes valeurs de SUV ont été observées et corrélées avec une absorption importante de Glc *via* les GLUTs (particulièrement GLUT1) ainsi qu'à la taille de la tumeur [200] [201] [202]. Finalement, d'autres études ont montré que l'expression des GLUTs (notamment 1, 3 et 5) était plus élevée dans des sites métastatiques du cancer du poumon que dans le cancer du poumon primaire et dans les tissus pulmonaires normaux, ce qui indique une relation avec la croissance rapide et la propagation de la tumeur [203].

## IV.2.2 L'utilisation de glycoconjugués en thérapie anti-cancer

La conception de glycoconjugués pour exploiter la surexpression des transporteurs de Glc dans les tissus cancéreux pour administrer spécifiquement divers médicaments anticancéreux, fluorophores ou radiotraceurs a donc fait l'objet de plusieurs recherches [204] [205] [206].

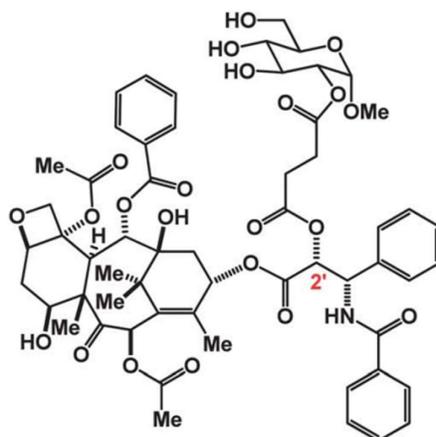
Comme énoncé juste au-dessus, on peut citer par exemple l'utilisation de Glc radioactivement marqué pour le diagnostic et la stadification de divers types de cancers [207]. C'est le cas du Glc marqué avec du fluor radioactif 2-deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) qui s'accumule dans les tissus cancéreux et qui peut être visualisé par tomographie (**Figure 39**).



**Figure 39** : Clichés de tomographie par émission de positons pour la visualisation de sites tumoraux marqués au glucose radioactif. Issue de Calvaresi et Hergenrother 2013.

Chez un patient sain, une accumulation de  $^{18}\text{F}$ -FDG sera visualisée que dans les tissus qui consomment du Glc de manière constitutive, comme c'est le cas pour le cerveau et la vessie notamment. Chez un patient cancéreux, les cellules tumorales captent alors préférentiellement le  $^{18}\text{F}$ -FDG comme expliqué plus haut, ce qui permet aux cliniciens d'identifier les sites des tumeurs et des métastases, de déterminer le stade du cancer et de surveiller la réponse au traitement.

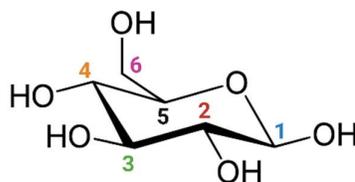
Des sucres conjugués à divers médicaments ou molécules anti-cancers comme le paclitaxel, l'adriamycine, l'azomycine ou bien certains métaux lourds comme le platine, peuvent également être utilisés afin d'introduire des propriétés de ciblage des tumeurs [208] [209] [210] [211]. La **Figure 40** représente par exemple la structure du paclitaxel (Taxol), un anti cancéreux connu pour inhiber la division cellulaire, conjugué avec une molécule de Glc dans l'objectif de cibler plus spécifiquement les sites tumoraux.



**Figure 40** : Molécule de paclitaxel chimiquement conjuguée à une molécule de glucose. La conjugaison a lieu au niveau du carbone 2 du glucose. Issue de Calvaresi et Hergenrother 2013.

Dans l'utilisation des glycoconjugués, il est important de garder à l'esprit que la cible finale souhaitée est *in fine* un transporteur de sucre (GLUT principalement). Comme on l'a abordé plus haut, les GLUTs sont des transporteurs passifs et bidirectionnels à la dynamique particulière et avec des taux d'affinité différents en fonction du substrat/sucre. Il a été montré qu'en plus de la nature du sucre en lui-même, l'affinité variait aussi en fonction du site de conjugaison, c'est-à-dire la position par laquelle le sucre est lié de manière covalente à la drogue. En effet, des études de cinétiques et de modélisations utilisant des analogues du Glc tendent à montrer que certains groupes hydroxyles sont plus ou moins impliqués dans la stabilisation des interactions hydrogènes avec les acides aminés clés du transporteur. Ce serait notamment le cas pour les groupes hydroxyles en positions 1 et 3, où une étude a montré que le 1-désoxy-D-glucose et le 3-désoxy-D-glucose présentaient des constantes d'inhibition presque 10 fois plus élevées que le D-glucose dans des études de compétition avec des GLUT1 humains [212] [213].

Ainsi, la substitution de ces groupements hydroxyles par une drogue peut affecter significativement l'affinité du glycoconjugué avec le transporteur (**Figure 41**).



**Figure 41** : Représentation du  $\beta$ -D-Glucose en forme pyranose ainsi que ses différents sites de substitutions possibles.

Concernant le Glc dans sa conformation la plus thermodynamiquement stable (forme pyranose), ce sont surtout les substitutions en C1, C2 et C6 qui ont été les plus étudiées à ce jour, celles en C3 et C4 sont globalement moins répertoriées et doivent faire l'objet d'études plus approfondies. Les substitutions sur la position C5 ne contenant pas de groupe hydroxyles sont quant à elles chimiquement non envisageables [214]. D'autres études portant sur les mesures de constantes d'association et de dissociation tendent à

dire que les hydroxyles en C2, C4 et C6 ne forment pas de liaison hydrogène avec le transporteur GLUT1 [208]. La conjugaison avec des drogues à ces positions peut donc être tolérée et c'est effectivement le cas des molécules précédemment citées **Figure 39 et Figure 40**. De manière intéressante, il a aussi été montré que des composés portant des substituants en C6 du Glc présentaient une affinité équivalente, voire supérieure, comparé à un Glc non substitué en tant que substrats pour GLUT1 [212] [215] [216].

Par conséquent, la reconnaissance et l'efficacité de la translocation de Glc par les transporteurs varient en fonction des différents isomères de position d'un glycoconjugué. L'étude systématique des activités biologiques de ces divers isomères pour un glycoconjugué donné est donc cruciale, car elle permettrait d'identifier le groupe hydroxyle approprié du glucose auquel attacher une molécule à visée diagnostic ou thérapeutique.

#### IV.2.2.1 Glycoconjugaison de nanoparticules d'or

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'en fonction des ligands utilisés lors de la synthèse de AuNPs, il était ensuite possible de lier à la surface des AuNPs une large gamme de biomolécules. Les hydrates de carbone, et plus particulièrement le Glc, en font partie et sont utilisés dans l'objectif d'apporter un ciblage spécifique des GLUTs surexprimés dans les cancers.

Pour illustrer ce propos nous pouvons citer cette étude réalisée en 2019 qui utilise des AuNPs glycoconjuguées pour la vectorisation dans des cellules cancéreuses d'un siARN dirigé contre des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (**Figure 42**) [217].

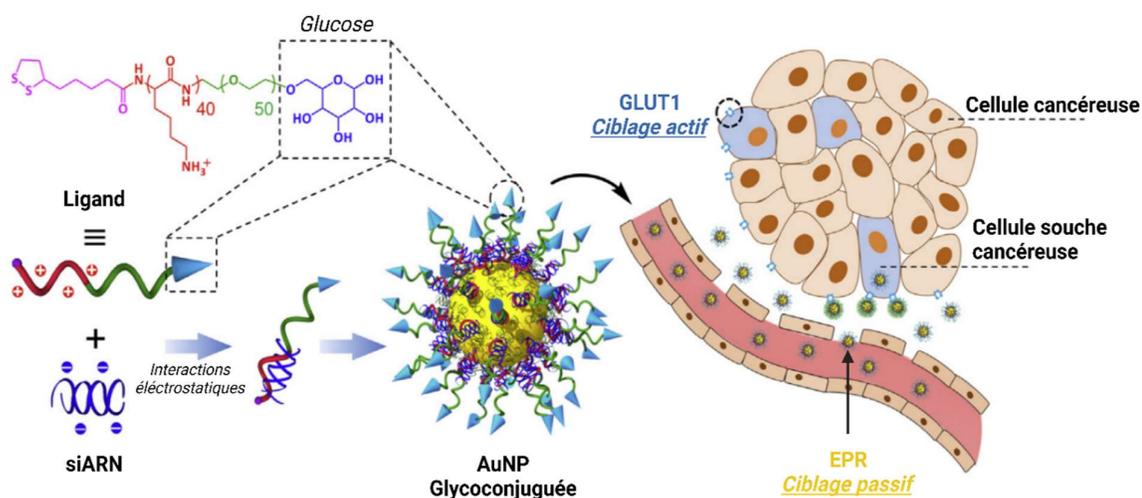


Figure 42 : Illustration de la préparation de AuNPs glycoconjuguées pour vectoriser un siARN dans un microenvironnement tumoral. Issue et adaptée de Yi et al. 2019.

Ici le ligand utilisé est une chaîne PEG (Polyéthylène glycol) composée de 40 résidus lysine. Ce ligand est fonctionnalisé d'une part avec un glucose via le C6 (position préférentielle comme on vient de le voir) pour le ciblage de GLUT1, et de l'autre côté avec un acide lipophile qui possède un pont disulfure

permettant le lien avec la AuNP via la formation d'une double liaison Au-S. Grâce à cette stratégie, les auteurs apportent en plus du ciblage passif du microenvironnement tumoral via effet EPR, un ciblage actif médié par la reconnaissance des glucoses fonctionnalisés sur la AuNP par GLUT1.

► Par la suite, nous nous sommes donc intéressés dans ce projet de thèse à la fonctionnalisation de AuNPs par glycoconjugaison afin d'avoir un ciblage plus spécifique des cellules tumorales en plus de l'effet EPR. Une attention toute particulière a été portée sur le choix de la structure du glycoconjugué permettant la meilleure interaction et pénétration cellulaire.

---

## **Objectif du travail de thèse**



## **Contexte**

Les traitements par radiothérapie couplés à la chirurgie constituent actuellement les principaux moyens de lutter contre le cancer du poumon à cellules non petites, qui représente la cause n°1 de mortalité liée au cancer dans le monde [4]. Cependant, on observe chez plusieurs patients des progressions tumorales rapides peu après la fin de leur thérapie, se traduisant par des rechutes. Les principales causes de ces échecs proviennent du développement de résistances à la radiothérapie ainsi qu'à la formation de métastases. Il est donc urgent de mettre en place de nouvelles stratégies de radiosensibilisation avec de faibles effets secondaires pour prolonger la survie et la qualité de vie des patients.

Parmi les différents mécanismes impliqués dans la régulation de la radiosensibilité/radorésistance cellulaire, la réponse télomérique adaptative a été mise en évidence dans un nombre croissant d'études. Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques protégeant les extrémités des chromosomes en maintenant leur intégrité génomique. L'un des principaux acteurs de la protection télomérique est le Facteur de liaison de Répétition Télomérique 2 (TRF2), dont l'implication dans la radorésistance des cellules du cancer du poumon a été démontrée. Une baisse de l'expression de TRF2 entraîne un dysfonctionnement télomérique, se traduisant par des dommages à l'ADN et des cellules plus sensibles aux radiations ionisantes [49] [50] [51] [52]. Par conséquent, le développement de composés permettant de cibler TRF2 combiné à l'utilisation de radiations ionisantes représente une approche pertinente, permettant d'améliorer l'effet de la radiothérapie et de réduire la dose de rayonnement délivrée aux patients.

De nos jours il existe plusieurs méthodes permettant d'inhiber l'expression d'une protéine et pour ce projet de thèse le choix s'est orienté vers l'interférence par ARN. Ce choix se justifie, entre autres, par une volonté d'induire une réduction post transcriptionnelle transitoire des niveaux endogènes de TRF2, afin de réduire d'éventuels effets indésirables sur le long terme. Cependant, dans le cadre d'une thérapie, un siARN seul (nu) doit faire face à de nombreuses contraintes physiologiques avant d'atteindre sa cible et induire son action. Pour lutter contre ces contraintes, l'utilisation d'un vecteur capable de protéger le siARN et d'assurer sa délivrance au bon endroit sans impacter sa fonction est primordiale.

## **Objectifs**

Mon projet de thèse est dédié au développement d'un système de radiosensibilisation innovant à base de nanoparticules d'or (AuNPs), permettant de transporter des molécules siARNs ciblant la protéine TRF2 au cœur des cellules tumorales du poumon, pour lutter contre la radiorésistance.

Les particules utilisées dans ce projet sont une sous-famille de AuNPs ultra petites (<3nm) également appelées « NanoClusters d'or » (AuNCs), qui présentent des propriétés thérapeutiques multiples. En effet comme on a pu l'énoncer dans la partie introduction, les AuNCs sont capables de pénétrer dans les cellules passivement (effet EPR) et ils sont naturellement photoluminescents dans les fenêtres optiques de l'infrarouge, ce qui permet des suivis non-invasifs par imagerie optique de fluorescence et par imagerie photoacoustique sur modèles murins. De plus, le numéro atomique de l'Or étant élevé ( $Z=79$ ), les AuNCs absorbent les rayons X de manière significative, faisant d'eux des agents radiosensibilisants qualifiés pour amplifier localement la radiothérapie. En raison de leur rapport surface/volume élevé et de leur chimie de surface polyvalente, nous utilisons les AuNCs comme nanoporteurs de petits ARNs interférents (siARNs) ciblant la protéine TRF2. Couplés aux siARNs anti-TRF2, les AuNCs permettront également de rendre plus radiosensibles les cellules tumorales ciblées.

Il a été montré que dans le contexte des tumeurs solides, les nanoparticules présentent un effet d'amélioration de la perméabilité et de la rétention (EPR) au niveau des cellules tumorales. Cependant, récemment, l'importance et l'existence de l'effet EPR chez les patients humains ont fait l'objet de nombreux débats au sein de la communauté scientifique [218] [219] [220]. En effet, il s'avère que le mécanisme par lequel les nanoparticules pénètrent dans les tumeurs solides est plus complexe que ce que l'on pensait auparavant. Suite à ce constat, nous avons décidé d'essayer d'améliorer le ciblage spécifique des cellules tumorales en greffant du glucose à la surface des AuNCs. L'ajout de ce sucre a pour objectif de cibler le transporteur GLUT1, qui est surexprimé à la surface des cellules tumorales dans une large variété de cancers, y compris du poumon [192] [193] [194] [195] [196]. GLUT1 est également responsable du transport basal du Glc dans tous les types de cellules et il a été démontré que son niveau d'expression est corrélé avec le degré d'invasion et le potentiel métastatique des cancers.

Afin de mettre en place un tel système, mon projet de thèse a été organisé en 4 grands axes :

- **Axe 1** : La synthèse chimique de AuNCs pouvant se lier avec un siARN anti-TRF2.
- **Axe 2** : La mise au point des paramètres expérimentaux permettant la complexation *in vitro* d'un siARN anti-TRF2 aux AuNCs, et la caractérisation de l'assemblage ainsi formé.

- **Axe 3** : L'étude de l'internalisation cellulaire et de l'efficacité du système AuNCs/siARN sur l'inhibition de la protéine TRF2 et ses conséquences sur la viabilité cellulaire avant ou après irradiation de cellules tumorales de poumon.
- **Axe 4** : Synthèse des glycoconjugués à greffer sur le nanosystème et étude de leur efficacité de ciblage des cellules cancéreuses surexprimant GLUT1.

Les travaux effectués pour l'axe 1 seront abordés dans le chapitre I, ceux sur les axes 2 et 3 dans le chapitre II et finalement l'axe 4 dans le chapitre III.

La **Figure 43** représente un schéma simplifié de l'organisation générale de mon projet de thèse.

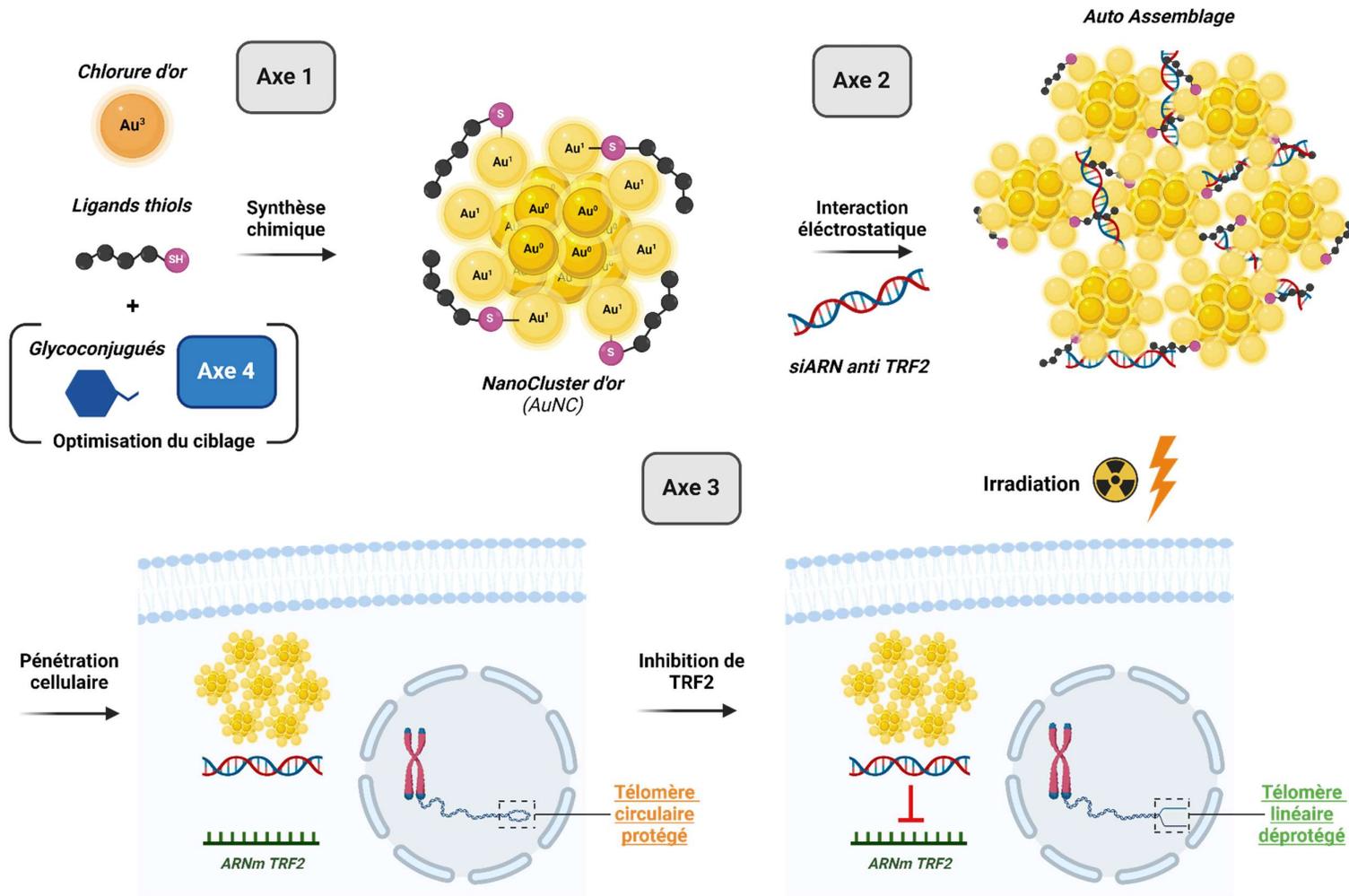


Figure 43 : Représentation schématique de l'organisation générale du projet de thèse.

---

# Résultats



---

## I. Synthèse et caractérisation de nanoclusters d'or

---

Le but de cette partie était de réaliser la synthèse chimique de nanoclusters d'or (AuNCs) avec des propriétés permettant une complexation avec un siARN anti-TRF2. Notre choix s'est porté sur une interaction électrostatique entre le siARN chargé négativement et les AuNCs associés à des ligands peptidiques de type arginine leur apportant une charge positive à pH physiologique (7,2). Ces interactions jouent un rôle essentiel dans la formation de nano structures autoassemblées [221] qui sera développée dans la deuxième partie des résultats.

Un travail de caractérisation complet des AuNCs a été réalisé afin de déterminer précisément leurs :

- Propriétés physico-chimiques :
  - Tailles : via des études de microscopie électronique à transmission à haute résolution (HRTEM).
  - Diamètre hydrodynamique : par analyse RMN DOSY et DLS.
  - Charges : par électrophorèse sur gel d'agarose complétée avec des mesures de Potentiel Zêta.
  - Composition élémentaire : *via* analyses élémentaires (EDX).
  - Biocompatibilité : par des tests cellulaires de cytotoxicité.
  - Capacités à traverser des membranes lipidiques : en utilisant un modèle biophysique de membrane artificielle.
- Propriétés optiques : en réalisant des analyses de spectrophotométrie et de fluorescence. Ces analyses pourront également nous renseigner sur leur stabilité colloïdale dans des conditions physiologiques au cours du temps.

## I.1 Procédure de synthèse des nanoclusters d'or

Les AuNCs utilisés dans de ce projet sont synthétisés *via* une approche « bottom-up » en se basant sur un protocole de synthèse optimisé précédemment dans notre équipe et adapté du protocole de Brust-Schiffrin [222] [223]. Nous utilisons des sels d'or Au (III) provenant de la dissolution du chlorure d'or (III) hydraté ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) et des ligands peptidiques contenant des arginines et des groupements thiols (SH) pour la formation de complexes métalliques avant la formation de AuNCs en présence de tétrahydroborate de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) utilisé comme agent réducteur (**Figure 44**).

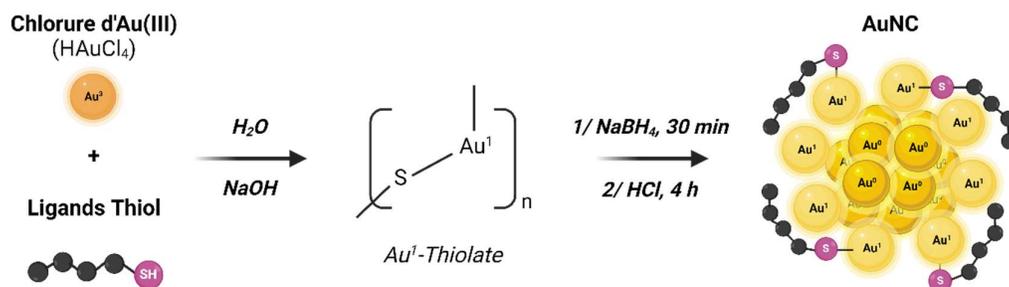


Figure 44 : Schéma simplifié de la procédure de synthèse des AuNCs.

Dans un premier temps la solution de chlorure d'or (III) et les ligands sont solubilisés dans l'eau, afin d'obtenir des ions *aurique*  $\text{Au}^{3+}$  en solution qui, en milieu alcalin, vont être réduits en ions *aureux*  $\text{Au}^{1+}$  et former des complexes  $\text{Au}^1$ -thiolate avec les ligands thiol *via* une liaison covalente Au-S de haute affinité [224] [225]. Ensuite, l'ajout d'un agent de réduction tel que le  $\text{NaBH}_4$  pendant 30 minutes va accélérer la réaction de réduction des ions  $\text{Au}^{3+}$  permettant d'obtenir de l'or à l'état fondamental  $\text{Au}^0$  qui constituera le cœur métallique du cluster, laissant les complexes  $\text{Au}^1$ -thiolate à la périphérie. De l'acide chlorhydrique (HCl) est finalement ajouté puis la solution est laissée au moins 4 heures à température ambiante sous agitation pour diminuer le pH et stopper les réactions de réductions. Les ratios molaires utilisés ici sont  $\text{Au} / \text{Ligand} / \text{NaBH}_4 = 1 / 2 / 0.0125$ .

Selon le type de ligand thiol utilisé lors de la synthèse, nous allons pouvoir modifier les propriétés physico-chimiques des AuNCs synthétisés. Dans notre cas, pour faire varier la charge de surface des AuNCs et permettre une complexation avec un siARN *via* des interactions électrostatiques, nous utilisons des ligands peptidiques composés de cystéine (C) et d'arginine (R). La cystéine, *via* son groupement thiol (SH), apporte un atome de soufre permettant la liaison à l' $\text{Au}^{1+}$ , et l'arginine une charge positive qui est délocalisée sur son groupement guanidine à pH 7. Afin d'évaluer l'impact de la charge globale des AuNCs sur la complexation et la vectorisation du siARN, nous avons utilisé des ligands possédant des chaînes variables d'arginine, de 2, 3, ou 9.

En suivant la procédure de synthèse décrite ci-dessus, 4 AuNCs aux propriétés attendues différentes ont été synthétisés. Pour faciliter le reste de la lecture, les AuNCs seront résumés et nommés comme indiqué ci-dessous (**Figure 45**) :

- **AuNC-SG** : nanocluster d'or étant stabilisé uniquement avec un ligand de type glutathion (SG). Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Ce AuNC doit globalement être chargé négativement à pH 7 à cause de la présence de l'acide glutamique (acide aminé chargé négativement). Nous l'utiliserons notamment comme contrôle de charge négative (**Figure 45-A**).
- **AuNC-SG-R<sub>2</sub>** : celui-ci est synthétisé en utilisant un glutathion modifié par l'ajout de 2 arginines après la glycine. La charge attendue de ce composé est légèrement positive grâce à la présence des arginines qui contrebalance la charge portée par l'acide glutamique (**Figure 45-B**).
- **AuNC-CR<sub>3</sub>** : nanocluster d'or couplé à 75% avec un tetrapeptide Cys-Arg-Arg-Arg (CR<sub>3</sub>) et à 25% avec le ligand SG. Le SG est ici utilisé afin d'obtenir des espèces plus stables et ayant une intensité de fluorescence plus grande. La charge positive de ce composé doit être plus grande que le composé précédent car il est couplé à un plus grand nombre d'acides aminés d'arginine. (**Figure 45-C**).
- **AuNC-CR<sub>9</sub>** : couplé avec 75% de décapeptide Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (CR<sub>9</sub>) et, à l'instar du AuNC-CR<sub>3</sub>, 25% de ligand SG. C'est le AuNC avec la charge attendue la plus positive (**Figure 45-D**).

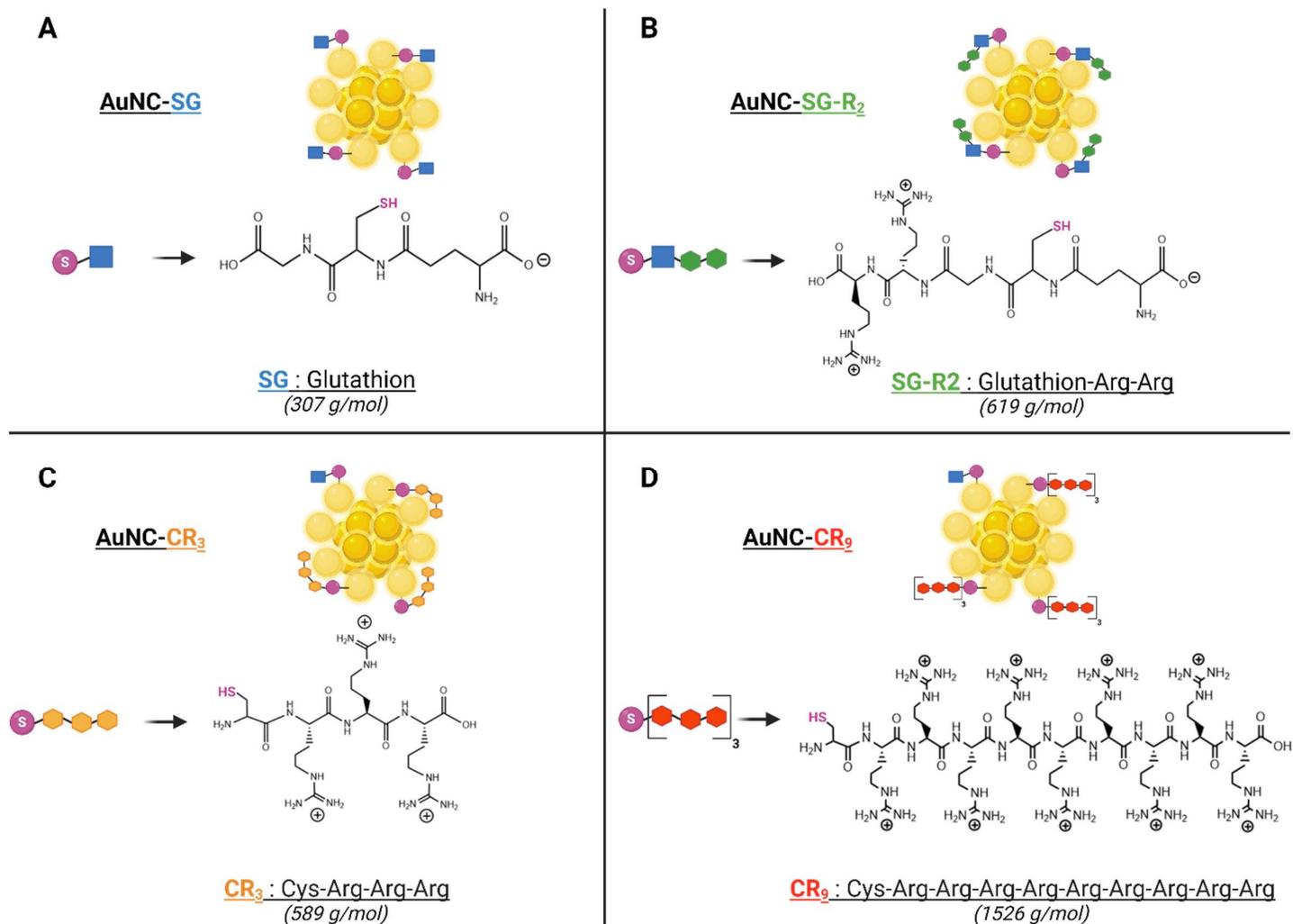


Figure 45 : Représentation schématisée des différents AuNCs synthétisés lors du projet de thèse.

## I.2 Propriétés des nanoclusters d'or synthétisés

Pour la caractérisation des AuNCs synthétisés, les AuNC-SG et AuNC-SG-R<sub>2</sub> ont pu servir de référence puisqu'ils ont antérieurement été synthétisés et caractérisés dans notre équipe [226], contrairement aux AuNC-CR<sub>3</sub> et AuNC-CR<sub>9</sub> qui sont de nouveaux AuNCs.

### I.2.1 Taille des AuNCs

Afin d'évaluer leur taille, les AuNCs synthétisés ont été observés sous microscope électronique à transmission à haute résolution (HRTEM) (collaboration avec le Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, Grenoble).

Comme on peut le voir sur les clichés de microscopie **Figure 46**, les AuNCs sont électroniquement denses (fort contraste). **En moyenne**, ils sont tous de taille inférieure à 3 nm. On observe une polydispersité faible. On peut noter que le AuNC-SG (**Figure 46-A**) apparaît plus petit comparé au AuNC-CR<sub>9</sub> (**Figure 46-D**). Cette variation peut s'expliquer par le fait que les ligands CR chargés et mélangés avec du SG sont composés de plus d'acides aminés et surtout entraînent un moins bon contrôle du processus de formation des AuNCs comparé à du SG seul et donc une plus grande hétérogénéité en taille.

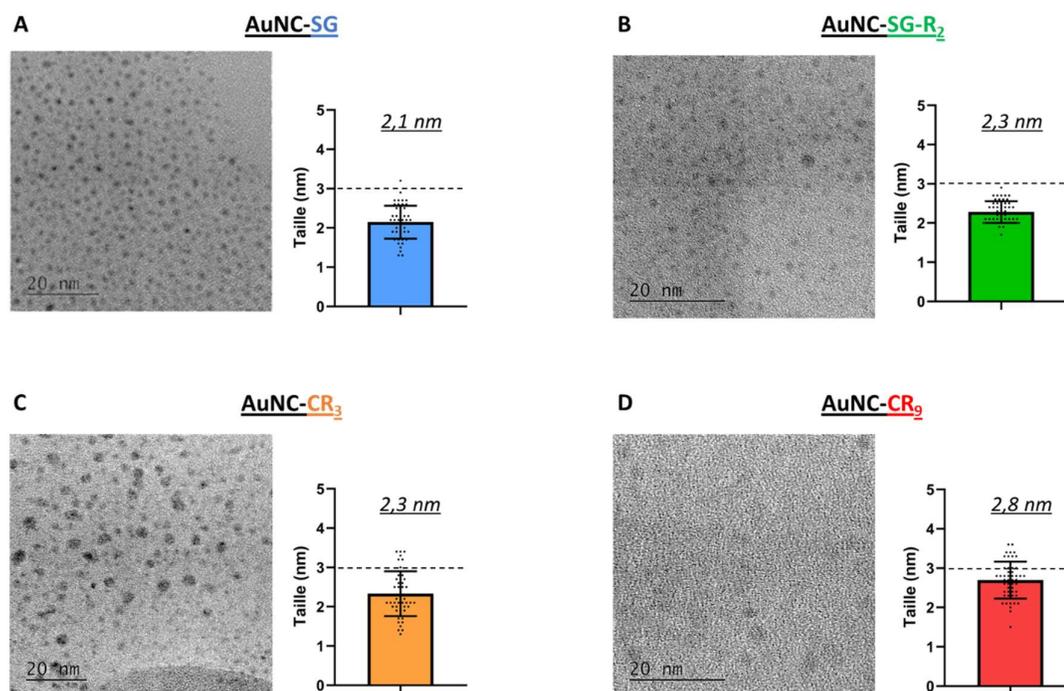


Figure 46 : Clichés de microscopie électronique à transmission à haute résolution (HRTEM, gauche) et quantification de la taille (n=50) des AuNCs synthétisés : AuNC-SG (A), AuNC-SG-R<sub>2</sub> (B), AuNC-CR<sub>3</sub> (C) et AuNC-CR<sub>9</sub> (D).

Finalement, le diamètre hydrodynamique des AuNCs a également été déterminé par des mesures de RMN-DOSY effectuées en parallèle et on retrouve des tailles relativement proches que celles observées par HRTEM [226].

## I.2.2 Charges des AuNCs synthétisés

Dans un premier temps nous avons estimé la charge globale des **ligands** (seuls) utilisés par des calculs théoriques en fonction du pH.

**Ligand Glutathion (SG)** *Glu(Cys-Gly)* ; **Tableau 3.**

Groupements	pH			
	< 2,2	< 2,3	7,0	< 9,6
<b>Nt</b> Glu NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	0
Glu COOH/COO <sup>-</sup>	0	-	-	-
Gly COOH/COO <sup>-</sup> <b>Ct</b>	0	0	-	-
<b>Charge totale</b>	<b>+1</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>	<b>-2</b>

Tableau 3 : Charge théorique du ligand glutathion en fonction du pH.

**Ligand Glutathion modifié avec 2 arginines (SG-R<sub>2</sub>)** *Glu(Cys-Gly-Arg-Arg)* ; **Tableau 4.**

Groupements	pH				
	< 2,0	< 2,2	7,0	< 9,6	< 12,1
<b>Nt</b> Glu NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	0	0
Glu COOH/COO <sup>-</sup>	0	0	-	-	-
Arg1 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg2 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg2 COOH/COO <sup>-</sup> <b>Ct</b>	0	-	-	-	-
<b>Charge totale</b>	<b>+3</b>	<b>+2</b>	<b>+1</b>	<b>0</b>	<b>-2</b>

Tableau 4 : Charge théorique du ligand glutathion-Arg2 en fonction du pH.

**Ligand Tétrapeptide (CR<sub>3</sub>)** Cys(Arg-Arg-Arg) ; **Tableau 5.**

Groupements	pH				
	< 2,0	< 2,2	7,0	< 9,6	< 12,1
<b>Nt</b> Cys NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	0	0
Arg1 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg2 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg3 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg3 COOH/COO <sup>-</sup> <b>Ct</b>	0	-	-	-	-
<b>Charge totale</b>	<b>+4</b>	<b>+3</b>	<b>+3</b>	<b>+2</b>	<b>-1</b>

Tableau 5 : Charge théorique du ligand CR<sub>3</sub> en fonction du pH.**Ligand Décapeptide (CR<sub>9</sub>)** Cys(Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg) ; **Tableau 6.**

Groupements	pH				
	< 2,0	< 2,2	7,0	< 9,6	< 12,1
<b>Nt</b> Cys NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	0	0
Arg1 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg2 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg3 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg4 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg5 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg6 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg7 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg8 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg9 NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	+	+	+	+	0
Arg9 COOH/COO <sup>-</sup> <b>Ct</b>	0	-	-	-	-
<b>Charge totale</b>	<b>+10</b>	<b>+9</b>	<b>+9</b>	<b>+8</b>	<b>-1</b>

Tableau 6 : Charge théorique du ligand CR<sub>9</sub> en fonction du pH.

Au niveau théorique on a bien des charges globales croissantes en fonction du nombre d'arginine, avec le décapeptide CR<sub>9</sub> qui présente la plus forte charge positive par rapport aux autres ligands peptidiques testés quel que soit le pH.

Pour estimer ensuite la charge globale théorique des **AuNCs** cette fois, nous avons fait le ratio entre les charges théoriques de chaque **ligand** calculées ci-dessus et leur nombre à la surface des AuNCs. Avec

la procédure de synthèse utilisée, nous obtenons des AuNCs constitués des nombres d'atomes d'Au et de ligands (L) « Au<sub>a</sub>-L<sub>b</sub> » variables, avec *a* étant toujours supérieur à *b* et compris entre 10 et 100. Pour les calculs de charge théorique de chaque AuNC, nous avons choisi arbitrairement une configuration Au<sub>25</sub>L<sub>18</sub>, en se basant sur des travaux antérieurs dans l'équipe avec des AuNCs composés de SG et d'arginine synthétisés avec des méthodes de synthèse équivalentes et qui ont été pleinement caractérisés [226] (**Tableau 7**).

AuNCs	Ratio SG / Arg	Nombre estimé SG / Arg	Charge SG / Arg	Charge théorique globale du AuNC
<b>AuNC-SG</b>	100 / 0	18 / 0	-1 / 0	<b>-18</b>
<b>AuNC-SG-R<sub>2</sub></b>	–	–	-1 / +2	<b>+18</b>
<b>AuNC-CR<sub>3</sub></b> (+25% de SG)	25 / 75	4,5 / 13,5	-1 / +3	<b>+36</b>
<b>AuNC-CR<sub>9</sub></b> (+25% de SG)	25 / 75	4,5 / 13,5	-1 / +9	<b>+117</b>

Tableau 7 : Calculs des charges théoriques de chaque AuNCs synthétisés à pH 7.

*(Exemple de calcul pour le AuNC-CR<sub>3</sub> :  $(-1 \times 4,5) + (3 \times 13,5) = 36$ )*

Ces calculs nous permettent de déterminer que le AuNC avec la charge théorique globale la plus positive est celui formé avec le ligand décapeptide CR<sub>9</sub>, qui est environ 3 fois plus positif que celui formé avec le tetrapeptide CR<sub>3</sub>, et 6 fois plus positif que le AuNC-SG-R<sub>2</sub>. On valide également la charge théorique globale négative du AuNC-SG.

Ces charges théoriques ont ensuite été vérifiées par des mesures de Potentiel Zêta dans l'eau à pH 7 (**Tableau 8**).

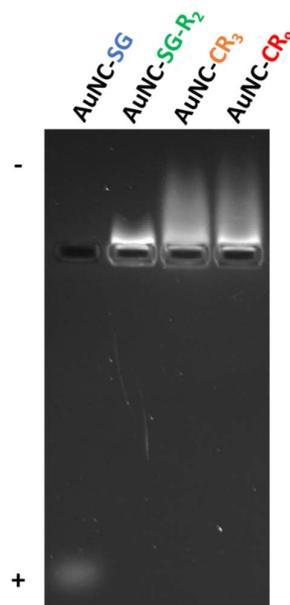
AuNCs	Charge de surface déterminée par mesure de Potentiel Zêta
AuNC-SG	-16,7 mV $\pm$ 2,0
AuNC-SG-R <sub>2</sub>	+5,4 mV $\pm$ 1,7
AuNC-CR <sub>3</sub>	+11,1 mV $\pm$ 1,5
AuNC-CR <sub>9</sub>	+20,1 mV $\pm$ 2,1

**Tableau 8** : Valeurs de Potentiel Zêta des différents AuNCs (dans H<sub>2</sub>O, pH7).

Ces mesures confirment que selon le ligand utilisé la charge globale des AuNCs varie, avec des valeurs négatives pour le AuNC-SG et des valeurs positives croissantes pour les AuNCs en fonction du nombre d'arginine.

Pour appuyer les résultats obtenus avec les mesures de Potentiel Zêta, nous avons dans un second temps déposé les AuNCs au centre d'un gel d'agarose et réalisé une électrophorèse. Grace à leurs propriétés de photoluminescence il est possible de visualiser directement les différents AuNCs en utilisant un filtre infrarouge proche pour évaluer leur mobilité électrophorétique et par conséquent leur charge globale (**Figure 47**).

Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par mesure de Potentiel Zêta ci-dessus montrant que le AuNC-SG est chargé négativement (migration vers la cathode) et que les AuNCs-SG-Arg<sub>2</sub> / CR<sub>3</sub> / CR<sub>9</sub> sont chargés positivement (migration vers l'anode). Les bandes plus ou moins diffusent de ces trois derniers AuNCs indiquent probablement une certaine distribution de taille et de charge pour ces échantillons.



**Figure 47** : Mobilité électrophorétique des AuNCs déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose 4% après visualisation à 705 nm.

## I.2.3 Propriétés optiques

### I.2.3.1 Absorption

Les AuNCs synthétisés apparaissent de couleur jaune et ont été analysés par spectrophotométrie. Les spectres d'absorbances ont été réalisés dans l'eau à pH 7. On observe une forte absorption dans l'UV qui diminue exponentiellement avec la longueur d'onde jusqu'à 900 nm avec un profil classiquement obtenu pour des AuNCs luminescent en raison de la forte absorption de l'or aux hautes énergies [226] (**Figure 48**). Ces spectres permettent également de vérifier l'absence d'agrégation dans les échantillons puisque chaque courbe tend vers des valeurs d'absorbance proches de 0 dans les régions de l'infrarouge. Les profils obtenus sont typiquement ceux attendus pour ce type de AuNCs composés de SG et d'arginine qui ont été réalisés antérieurement dans l'équipe avec des conditions de synthèse identiques [226]. On vérifie également l'absence de la bande de résonance plasmonique aux alentours de 520 nm qui est caractéristique de nanoparticules d'or de taille supérieure à 3 nm [227], confirmant ainsi les résultats obtenus en HRTEM.

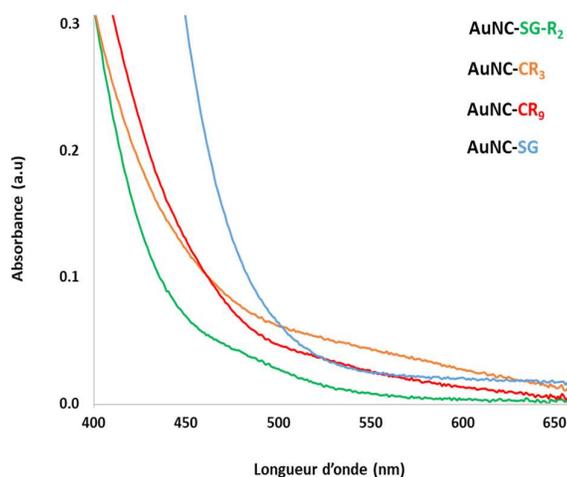


Figure 48 : Spectres d'absorbance entre 400 et 650 nm des AuNCs synthétisés (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7).

Nous pouvons également évaluer la stabilité colloïdale en fonction du temps des AuNCs synthétisés en mesurant leurs spectres d'absorption. La **Figure 49** représente un suivi spectral des AuNCs-CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> sur une durée de 30 jours. Les profils spectraux restent très similaires confirmant la stabilité de ces deux AuNCs sur une durée d'au moins un mois.

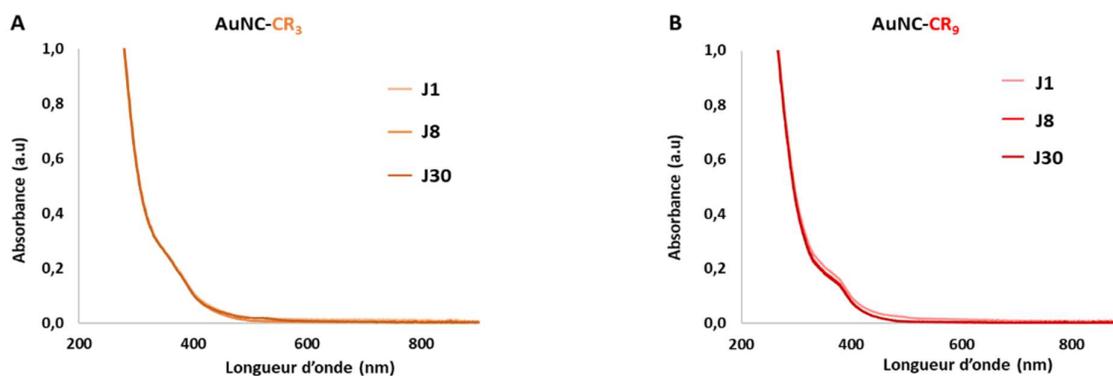


Figure 49 : Mesures d'absorption des AuNCs-CR3 et CR9 (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7) en fonction du temps.

Au-delà d'un mois on peut observer l'apparition d'agrégats en solution ainsi qu'une solution plus turbide indiquant une instabilité des AuNCs notamment pour le composé AuNC-CR<sub>9</sub> très chargé positivement.

Pour les AuNCs-SG et SG-R<sub>2</sub>, la stabilité colloïdale a également été évaluée antérieurement dans notre équipe et ces AuNCs se sont aussi avérés stables en solution sur une période d'au moins 1 mois [226].

### I.2.3.2 Fluorescence

Comme expliqué en partie introduction et observé sur le gel d'agarose **Figure 47**, les AuNCs ont des propriétés photoluminescentes dans les régions de l'infrarouge. Cependant, ces propriétés évoluent drastiquement selon les modifications en surface apportées, et donc par extension des ligands qui sont utilisés pour former le cluster. Ces variations de propriétés sont dues entre autres aux différences de taille et d'énergie de transfert résultant des liaisons de surface or-soufre. La **Figure 50** montre des mesures de photoluminescence (PL) à une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc} = 450$  nm des AuNCs synthétisés dans l'eau à pH 7.

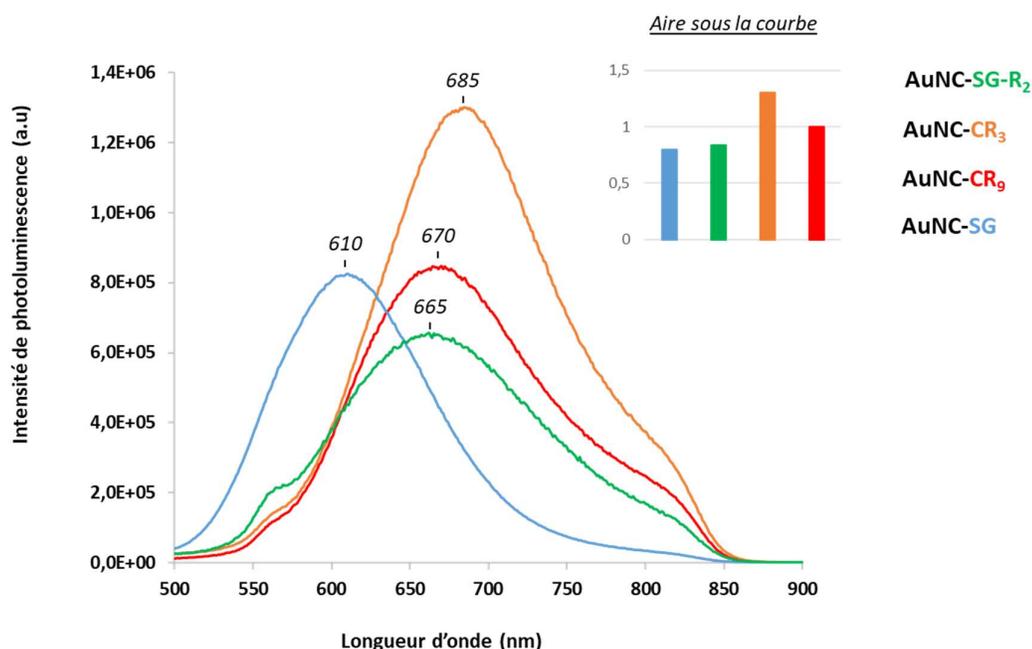


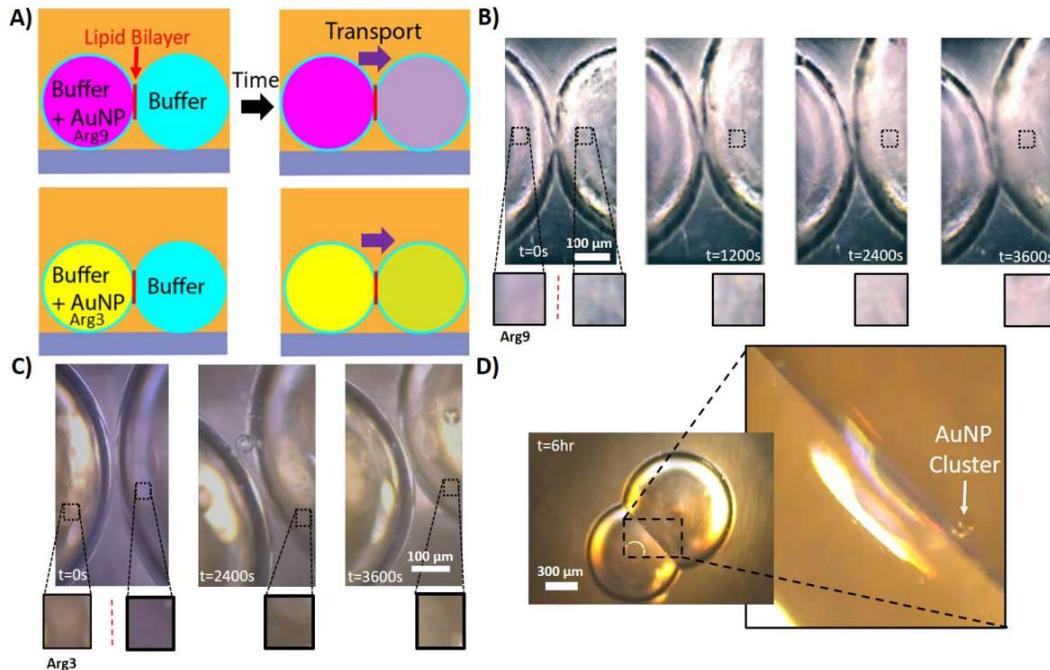
Figure 50 : Spectres de photoluminescence des AuNCs (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7).

Pour chaque AuNC on observe une large bande d'émission de PL allant de 500 à 850 nm. On peut noter que les profils changent en fonction des ligands utilisés. Pour le AuNC-SG on note un pic d'émission maximale  $\lambda_{em}$  aux alentours de 610 nm qui est très caractéristique de ce composé [106] [228]. En présence de ligands de type oligoarginine, ce pic est décalé à des plus grandes longueurs d'ondes. En effet nous observons un décalage vers les régions de l'infrarouge, avec des pics d'émission maximale  $\lambda_{em} = 665, 670$  et  $685$  nm pour les AuNC-SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>9</sub> et CR<sub>3</sub> respectivement. Ce décalage est entre autre associé à la nature et à la conformation des ligands présents à la surface des AuNCs ce qui conduit à des différences d'énergies de transfert [226]. En mesurant les aires sous la courbe, on remarque que l'intensité de fluorescence de chaque AuNC est relativement similaire. Celle du AuNC-CR<sub>3</sub> est un peu plus fluorescente que les autres dans ces conditions.

#### I.2.4 Diffusion des AuNCs à travers des membranes lipidiques artificielles

Afin d'évaluer les capacités de diffusion des AuNCs à travers des membranes lipidiques, nous avons eu l'occasion de collaborer avec l'équipe du Dr. Jean-Baptiste Fleury à l'Université de la Sarre (Allemagne) qui dispose d'un système micro fluidique contenant des membranes artificielles lipidiques. Ce système permet d'étudier les interactions de NPs avec des membranes par des mesures de résistivité et par mesures optiques [229]. Evaluer le transport de nanoparticules métalliques à travers une membrane cellulaire est particulièrement intéressant en raison des applications notamment dans le domaine de l'administration de drogues à l'aide de nanoparticules.

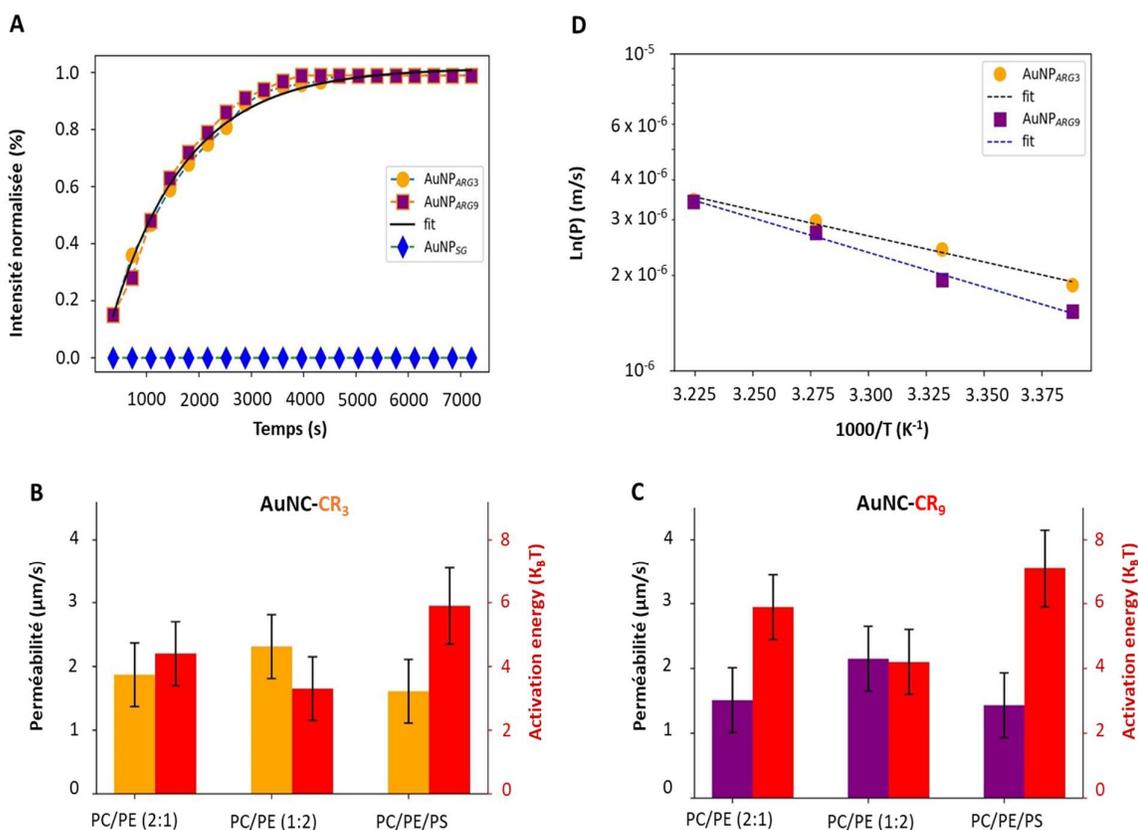
Dans ce contexte, nous avons mesuré le transport passif de nos AuNCs à travers une membrane artificielle en utilisant un modèle de bicouche lipidique plane formée à l'interface entre deux gouttelettes. Avec ce système, le transport des AuNCs est évalué en micro fluidique *via* la microscopie en champ sombre grâce à la diffusion de la lumière par les AuNCs. En mesurant un nombre important d'évènements nous avons obtenu des estimations quantitatives robustes quant aux dynamiques de translocation des nanoparticules à travers la bicouche lipidique.



**Figure 51 : Translocation des AuNCs à travers une bicouche lipidique formée à l'interface de gouttelettes.** A) Représentation schématique de deux gouttelettes dans un compartiment de microfluidique en contact avec couche huileuse formée de phospholipides. B-C) Clichés de microscopie à champ sombre de la bicouche lipidique formée entre deux gouttelettes contenant, pour celle de gauche, un tampon + AuNC-CR9 (B, couleur rosée) ou AuNC-CR3 (C, couleur jaune) et pour celle de droite du tampon seulement. Le changement de couleur résultant du passage des AuNCs en fonction du temps est illustré dans les cases en dessous. D) Détection de AuNC-CR9 au niveau des deux gouttelettes après 6 heures d'incubation (agrandissement x20).

La **Figure 51-A** schématise le modèle utilisé pour quantifier la translocation des AuNCs. La gouttelette de gauche (gouttelette dite « donneuse ») contient un tampon dans lequel ont été ajoutés les AuNCs à 0,2 mg/mL et celle de droite (dite alors « acceptrice ») contient seulement du tampon. Entre les deux gouttelettes se trouve une bicouche de phospholipides formée par un système de micro fluidique. Les **Figure 51-B** et **C** représentent des clichés de microscopie à champ sombre pris à des temps allant de 0 à 3600 secondes après injection des AuNCs dans la gouttelette donneuse. Il est intéressant de noter qu'après environ 1 heure ( $t = 3600$  s), le signal de couleur, rose pour le AuNC-CR<sub>9</sub> et jaune pour le AuNC-CR<sub>3</sub>, est devenu relativement uniforme entre les gouttelettes ce qui témoigne d'une rapide diffusion à travers la membrane. Finalement la **Figure 51-D** montre qu'après 6 heures d'incubation la couleur du signal est devenue tout à fait uniforme entre les deux gouttelettes et on peut même apercevoir directement des AuNC-CR<sub>9</sub> en agrandissant.

En utilisant la loi de Fick's (équations non montrées), qui décrit notamment la diffusion de particule dans un milieu, il est possible d'estimer le transport passif des AuNCs à travers la membrane à partir de la concentration initiale en AuNCs dans la gouttelette donneuse et d'un coefficient de transport [230]. La **Figure 52-A** confirme la diffusion en fonction du temps des AuNCs **CR<sub>3</sub>** et **CR<sub>9</sub>** à travers une bicouche lipidique composé de lipides DOPC/DOPE (ratio molaire 2 : 1) et l'absence de diffusion pour le AuNC-**SG**. Les résultats concernant le AuNC-**SG-R<sub>2</sub>** (non montrés) sont similaires au AuNC-**CR<sub>3</sub>**.



**Figure 52 : Quantification du transport passif des AuNCs à travers une bicouche lipidique artificielle. A)** Intensité du signal lié aux AuNCs en fonction du temps (mesures prises sur une bicouche lipidique composée de DOPC/DOPE à un ratio molaire 2 : 1) ; **B-C)** Coefficient de perméabilité (jaune/violet) associé à l'énergie d'activation ( $E_a$ , rouge) en fonction de bicouche lipidique aux compositions lipidiques différentes pour les AuNCs **CR<sub>3</sub>** et **CR<sub>9</sub>** ; **D)** Tracé d'Arrhenius du logarithme du coefficient de perméabilité ( $P$ ) en fonction de l'inverse de la température absolue des membranes (même composition lipidique qu'en A).

En mesurant ces variations d'intensités de signal en fonction du temps entre les gouttelette donneuse et acceptrice, nous pouvons également extraire pour chaque AuNC un coefficient de perméabilité ( $P$ ). Ainsi, les **Figure 52-B et C** montrent les coefficients de perméabilité  $P$  (colonnes jaune et violette ; axe des ordonnées de gauche) associés aux énergies d'activation (colonne rouge ; axe des ordonnées de droite) en fonction de différentes compositions de bicouche lipidique. Avec une composition DOPC/DOPE (ratio molaire 2 : 1), nous avons mesuré un  $P \approx 1,9 \mu\text{m/s}$  pour le AuNC-**CR<sub>3</sub>** et  $P \approx 1,5 \mu\text{m/s}$  pour le AuNC-**CR<sub>9</sub>**. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues sur d'autres expériences de translocation impliquant d'autres nano-objets [231] et montrent que le AuNC-**CR<sub>3</sub>** se déplace plus rapidement que le AuNC-**CR<sub>9</sub>**. Cette différence peut être liée aux différences de charge entre ces deux

AuNCs et notamment à des taux plus élevés d'auto-agrégation du AuNC-CR<sub>9</sub> sur la bicouche comparés à ceux du AuNC-CR<sub>3</sub> en raison de sa surface hautement chargée positivement qui peut fortement interagir avec la membrane artificielle chargée négativement.

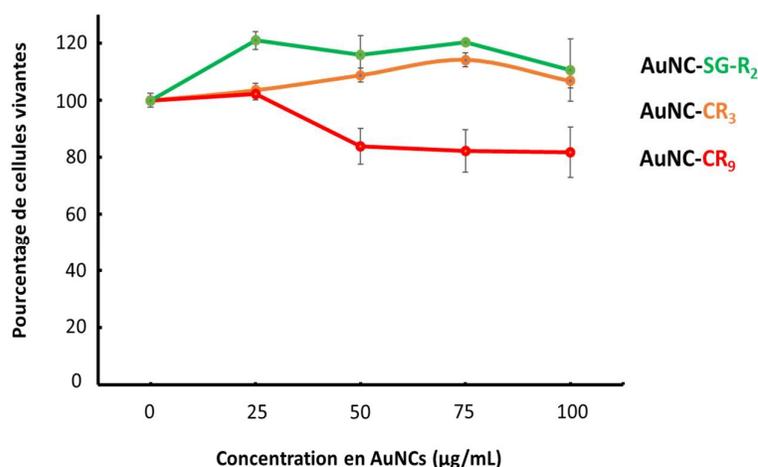
On remarque aussi que les taux de transport varient en fonction de la composition de la bicouche. En effet, si on a plus de DOPE que de DOPC (PC/PE 1 :2), on constate que la perméabilité des AuNCs augmente ( $P \approx 2,3 \mu\text{m/s}$  pour AuNC-CR<sub>3</sub> et  $P \approx 2,1 \mu\text{m/s}$  pour AuNC-CR<sub>9</sub>). Ceci s'explique car les lipides DOPE réduisent l'empaquetage de la bicouche et augmentent le nombre de défauts à l'intérieur de la bicouche, ce qui facilite la translocation des AuNCs. Paradoxalement, l'ajout de 10% de DOPS (en ratio molaire total) à cette composition de bicouche réduit cette fois-ci la perméabilité des AuNCs à  $P \approx 1,5 \mu\text{m/s}$  pour le AuNC-CR<sub>3</sub> et  $P \approx 1,3 \mu\text{m/s}$  pour le AuNC-CR<sub>9</sub>. En effet, les lipides DOPS sont chargés négativement et attirent donc les AuNCs qui sont chargés positivement. Comme attendu, la perméabilité de la bicouche pour AuNC-CR<sub>9</sub> est plus forte que celle pour AuNC-CR<sub>3</sub> en raison de la différence de charge des nanoparticules.

La **Figure 52-D** représente un diagramme d'Arrhenius où nous calculons l'énergie de translocation des AuNCs à travers une composition DOPC/DOPE (ratio molaire 2 :1) en traçant la perméabilité  $\ln(P)$  en fonction de  $1/T$ , où  $T$  est la température en Kelvin. La pente de cette courbe est égale à  $E_a/R$ , où  $E_a$  est l'énergie d'activation (déterminée en **52-B** et **52-C**) et  $R$  une constante. Finalement, les résultats montrent que les AuNCs-CR<sub>3</sub> ont une dynamique de translocation plus rapide que les AuNCs-CR<sub>9</sub> puisque la perméabilité de la bicouche lipidique est plus grande et que son énergie d'activation plus petite.

### I.2.5 Cytotoxicité

Avant d'utiliser les AuNCs pour les tests cellulaires *in vitro*, la cytotoxicité des AuNCs seuls a été évaluée avant de les envisager comme agents de vectorisation de siARN. Ainsi, une lignée cellulaire provenant d'adénocarcinome pulmonaire (A549) a été incubée en présence des AuNCs à différentes concentrations allant de 25 à 100  $\mu\text{g/mL}$  pendant 72h, avant de réaliser un test de cytotoxicité avec un kit Presto Blue. Ce test est un indicateur rapide de viabilité cellulaire qui utilise le pouvoir réducteur des cellules vivantes pour convertir une molécule de résazurine en résorufine, une molécule fluorescente. En effet, la résazurine est perméable aux cellules, non toxique, de couleur bleue et pratiquement non fluorescente. À l'intérieur des cellules, elle est réduite en résorufine qui produit une couleur rouge très fluorescente.

Ainsi, les cellules viables convertissent la résazurine en résorufine et génère une mesure quantitative de la viabilité cellulaire qui est directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence (**Figure 53**).



**Figure 53** : Viabilité cellulaire des cellules A549 après 72h d'incubation avec différentes concentrations de AuNCs (n = 3).

Comme on peut le voir, aucune cytotoxicité n'est observée après 72h d'incubation avec les AuNCs-SG-R<sub>2</sub> et CR<sub>3</sub> dans une gamme de concentration allant de 0 µg/mL à 100 µg/mL. Avec les AuNCs-CR<sub>9</sub> on note une diminution de la viabilité cellulaire de l'ordre de 20% à partir de 50 µg/mL, qui peut s'expliquer par la charge hautement positive de ce composé pouvant perturber l'intégrité membranaire des cellules [232] [233]. Ce test nous permet de définir 25 µg/mL comme étant la concentration de AuNCs à ne pas dépasser pour les tests biologiques.

Concernant les AuNC-SG, des tests de cytotoxicité antérieurs avaient déjà démontré leur absence de toxicité dans cette gamme de concentrations auprès de différentes lignées cellulaires (cellules de mélanome COLO 829 et cellules de fibroblastes MRC5) [234].

## I.3 Conclusion chapitre 1

Cette partie de mon travail de thèse m'a permis d'obtenir des AuNCs qui, en se basant sur des résultats obtenus antérieurement dans l'équipe, ont une structure proche d'un Au<sub>25</sub>L<sub>18</sub>. Ces AuNCs peuvent être suivi par fluorescence ou microscopie à champ sombre et se sont avérés stables en milieux aqueux et plutôt monodispersés. En effet, les mesures en HRTEM ont permis de vérifier que la taille globale des AuNCs était inférieure à 3 nm et les mesures d'absorbance et de fluorescence ont confirmé que les particules synthétisées avaient des propriétés optiques bien relatives à des AuNCs de petites tailles. Les charges positives des AuNCs ont également pu être validées par électrophorèse sur gel d'agarose et mesure de potentiel zêta. De plus, nous avons montré que ces espèces étaient capables de traverser des membranes lipidiques par diffusion passive grâce à leurs petites tailles et leurs charges positives, ce qui constitue une excellente propriété dans le cadre de leur utilisation dans le ciblage cellulaire et la vectorisation de biomolécule à visée diagnostic ou thérapeutique. Finalement, nous avons pu vérifier que chaque AuNC n'induisait pas de toxicité sur les cellules dans des gammes de concentrations inférieures à 50 µg/mL utilisées *in vitro*.

---

## Résultats

---

### **II. Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon**

---

Après avoir validé la synthèse et l'obtention de AuNCs chargés positivement, nous avons voulu dans un premier temps les complexer à un siARN anti-TRF2 et caractériser les assemblages formés. Dans un second temps, nous avons vérifié que les assemblages AuNCs/siARNs étaient capables de pénétrer dans les cellules tumorales et pouvaient inhiber l'expression de la protéine TRF2. Finalement nous avons évalué si cette inhibition de TRF2 conduisait à une radiosensibilisation des cellules en mesurant la viabilité cellulaire après irradiation sur des populations de cellules traitées ou non avec le système AuNCs/siARNs.

## II.1 Complexation de siARNs anti TRF2 aux nanoclusters d'or

La complexation de siARN anti-TRF2 aux AuNCs a été réalisée par mélange des deux composés 30 minutes dans de l'eau dépourvue de RNase, à température ambiante et sans agitation. Un auto assemblage se forme alors par interactions électrostatiques entre les deux molécules de charges opposées avec des dimensions de l'ordre d'une centaine de nanomètres et dans lequel les phosphates de l'ARN interagissent avec les groupements guanidinium des arginines présents à la surface des AuNCs (**Figure 54**).

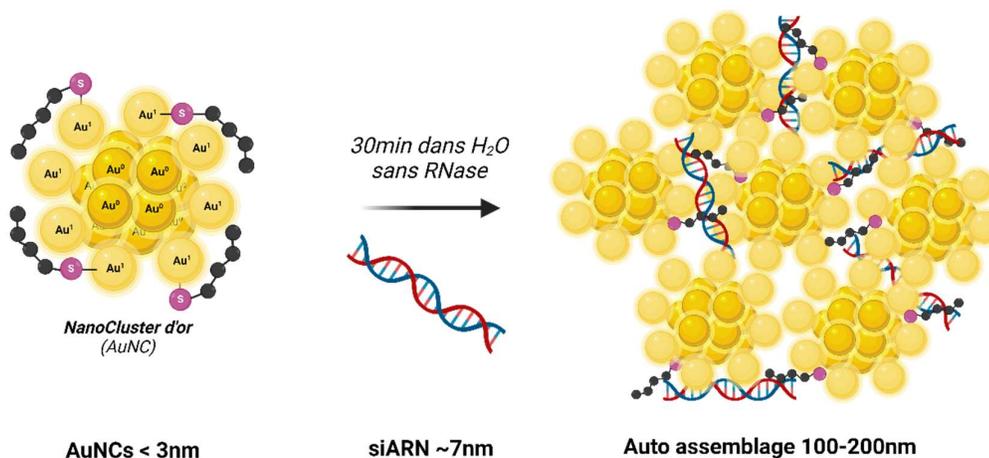


Figure 54 : Schéma simplifié de la formation d'auto assemblage entre les AuNCs et les siARNs.

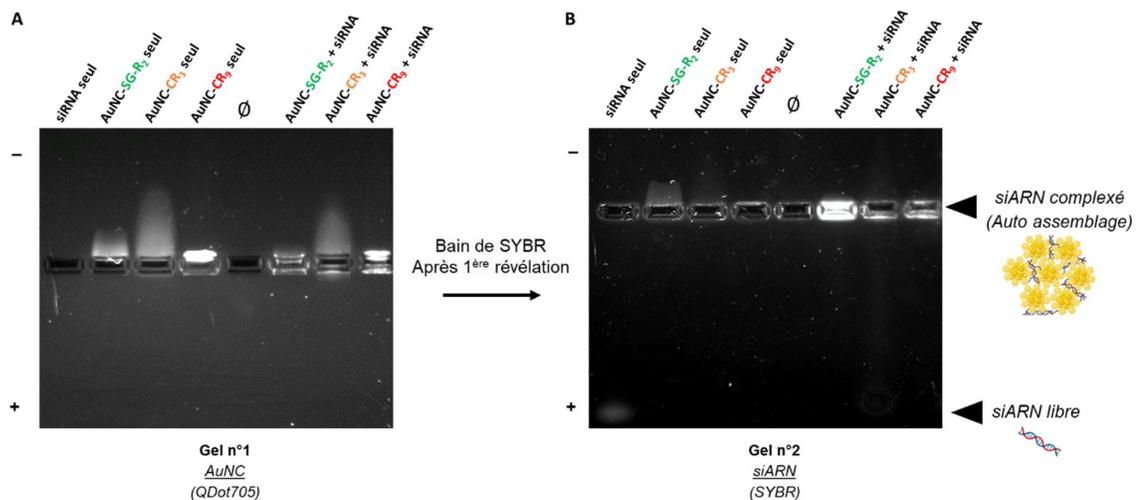
C'est finalement cette structure qui représente la forme aboutie du nanosystème de vectorisation de siARN radiosensibilisant. Selon les concentrations et les ratios entre les deux composés utilisés nous obtenons une variété d'autoassemblages qui seront décrits dans ce chapitre.

La suite du travail a été consacré à la caractérisation complète de ces assemblages **avant** leurs incubations avec des cellules cancéreuses. Les tests ont donc tous été réalisés à partir des AuNCs chargés positivement, c'est à dire SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>, excluant ainsi le AuNC-SG.

## II.1.1 Efficacité de complexation du siARN aux AuNCs

L'efficacité de la complexation d'un siARN dirigé contre TRF2 avec les AuNCs a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 55**).

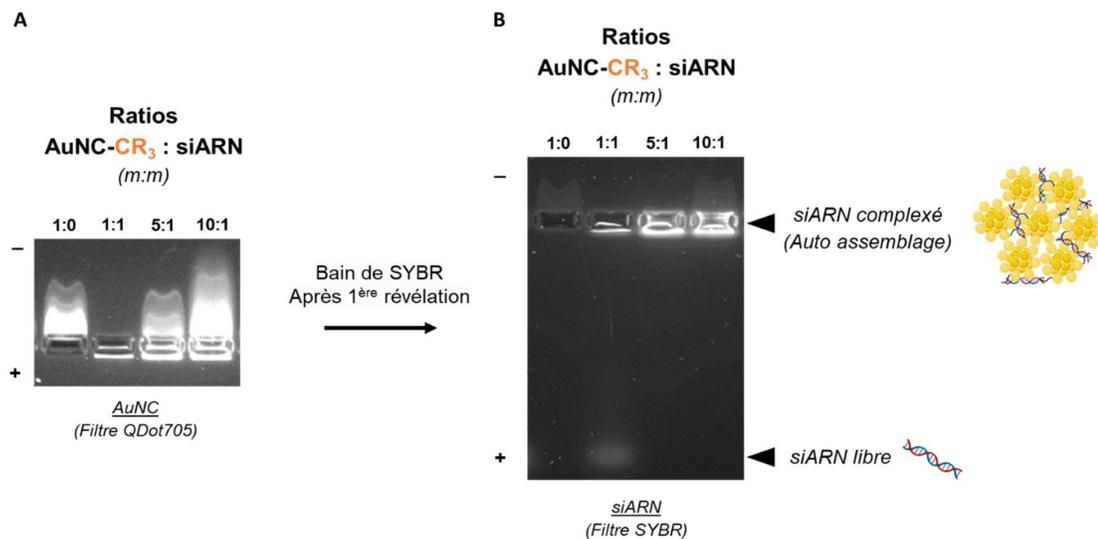
Sur la **Figure 55-A**, nous visualisons seulement le signal des AuNCs en utilisant un filtre infrarouge proche QDot705. Dans la condition où le siARN est déposé seul aucun signal n'est observé du fait que l'ARN, contrairement aux AuNCs, n'est pas naturellement photoluminescent. Comme observé précédemment, les AuNCs migrent vers l'anode en raison de leur charge positive. Lorsqu'ils sont incubés avec un siARN on remarque que les profils électrophorétiques sont modifiés. En effet, dans ces conditions, la distance de migration des AuNCs vers l'anode diminue et le signal lié aux AuNCs se retrouve centré au niveau des puits. Ce résultat suggère que les AuNCs se sont complexés avec l'ARN qui, du fait de sa charge négative, réduit la mobilité électrophorétique des AuNCs vers l'anode. Dans ces conditions, nous pouvons également supposer la présence d'agrégats avec les AuNC-CR<sub>9</sub> et en raison de leur charge hautement positive, ce qui expliquerait une mobilité électrophorétique parfois moindre de ces AuNCs comparé aux deux autres.



**Figure 55 : Etude de la complexation d'un siARN avec les différents AuNCs synthétisés par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. A)** Détection à 705 nm +/- 20 nm des AuNCs après excitation à 405 nm (Qdot705). **B)** Détection à 537 nm du siARN après excitation à 300nm (SYBR Gold).

Pour confirmer la complexation des AuNCs avec les siARN et vérifier l'intégrité de ce dernier dans les différentes conditions testées, ce même gel est ensuite incubé avec un intercalant fluorescent de l'ARN (SYBR Gold ;**Figure 55-B**). En absence de AuNCs, l'ARN seul, chargé négativement, migre bien vers la cathode en bas du gel. En présence des différents AuNCs, le signal lié au siARN ne se retrouve pas côté cathode mais se superpose au signal des AuNCs observé sur le gel n°1 au niveau des puits, ce qui montre que les 2 composés sont complexés entre eux.

Il est important de noter ici que le degré de complexation des deux espèces dépendra des ratios auxquels on les utilise. Effectivement, nous avons pu montrer que la complexation des siARNs est plus ou moins totale selon le type de AuNCs et les ratios utilisés. Si on prend le AuNC-CR<sub>3</sub> comme exemple (**Figure 56**), avec ratio de masse 1:1 (c'est-à-dire une masse de AuNC associée à une masse équivalente de siARN), la complexation du siARN est partielle. En revanche, à partir d'un ratio de masse 5:1, on remarque que l'ensemble des siARNs est sous forme complexé aux AuNCs. La quantité de siARN utilisé ici pour chaque condition est de 2,5 ug.



**Figure 56 : Impact du ratio de masse AuNCs : siARN sur l'efficacité de complexation de ces 2 composés par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde d'émission de 705nm (A) et le siARN est observé à une longueur d'onde d'émission de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold (B).**

L'efficacité de complexation de l'ensemble des AuNCs avec un siARN à différents ratios de masse a été testée. L'objectif était de déterminer les meilleures conditions expérimentales permettant de complexer totalement le siARN aux AuNCs. Nous souhaitons également obtenir des auto assemblages positivement chargés afin d'augmenter les chances d'interaction des AuNCs complexés aux siARN avec les membranes cellulaires. En effet des travaux ont montré que bien qu'ayant des structures dynamiques, des charges globalement négatives étaient mesurées à la surface des membranes cellulaires, avec notamment de fortes proportions de phosphatidylsérine, un phospholipide négativement chargé [235] [236]. Paradoxalement, trop augmenter les quantités des deux composés conduit à la formation d'agrégats dû aux fortes différences de charges, il était donc aussi nécessaire d'avoir un bon équilibre entre les deux composés.

Suite aux résultats de ces tests, les ratios de masse finalement choisis et utilisés par la suite pour les études de transfection avec chaque AuNCs étaient de :

- AuNCs-SG-R<sub>2</sub>/siARNs : 8:1
- AuNCs-CR<sub>3</sub>/siARNs : 5:1
- AuNCs-CR<sub>9</sub>/siARNs : 3:1

Ces ratios de masse sont tout à fait en cohérence avec les valeurs de charge positive globale des différents AuNCs. Par exemple, pour une même quantité de siARN, plus de AuNC-CR<sub>3</sub> est nécessaire pour complexer totalement l'ARN comparé au AuNC-CR<sub>9</sub> étant donné que le AuNC-CR<sub>3</sub> a une charge globale positive plus faible que celle du AuNC-CR<sub>9</sub>.

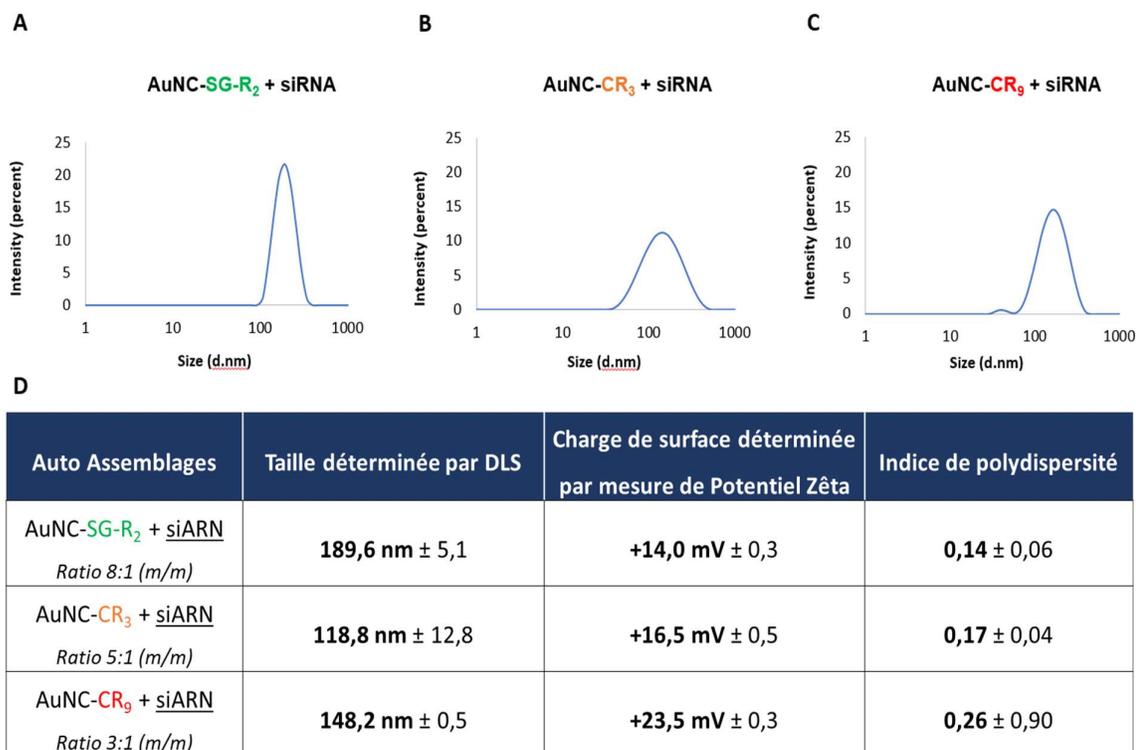
## II.1.2 Evaluation de la taille et de la charge des complexes AuNCs/siARNs

Afin de connaître la taille et la charge des assemblages AuNCs/siARNs formés, des mesures de DLS, de microscopie électronique et de Potentiel Zêta ont été réalisées.

La **Figure 57** résume les mesures de Potentiel Zeta et de DLS effectuées afin de déterminer la charge globale, la polydispersité et la taille des complexes formés. Ces mesures ont été réalisées sur trois expériences de complexation indépendantes.

Pour chaque autoassemblage formé avec les différents AuNCs on retrouve une charge globale positive, qui s'explique par des ratios AuNC:siARN en faveur des AuNCs et permettant une complexation totale de la quantité de siARN utilisée. Le fait qu'ils soient positivement chargés va dans le sens d'une meilleure interaction avec les membranes cellulaires qui ont plus tendance à être négativement chargées comme énoncé précédemment.

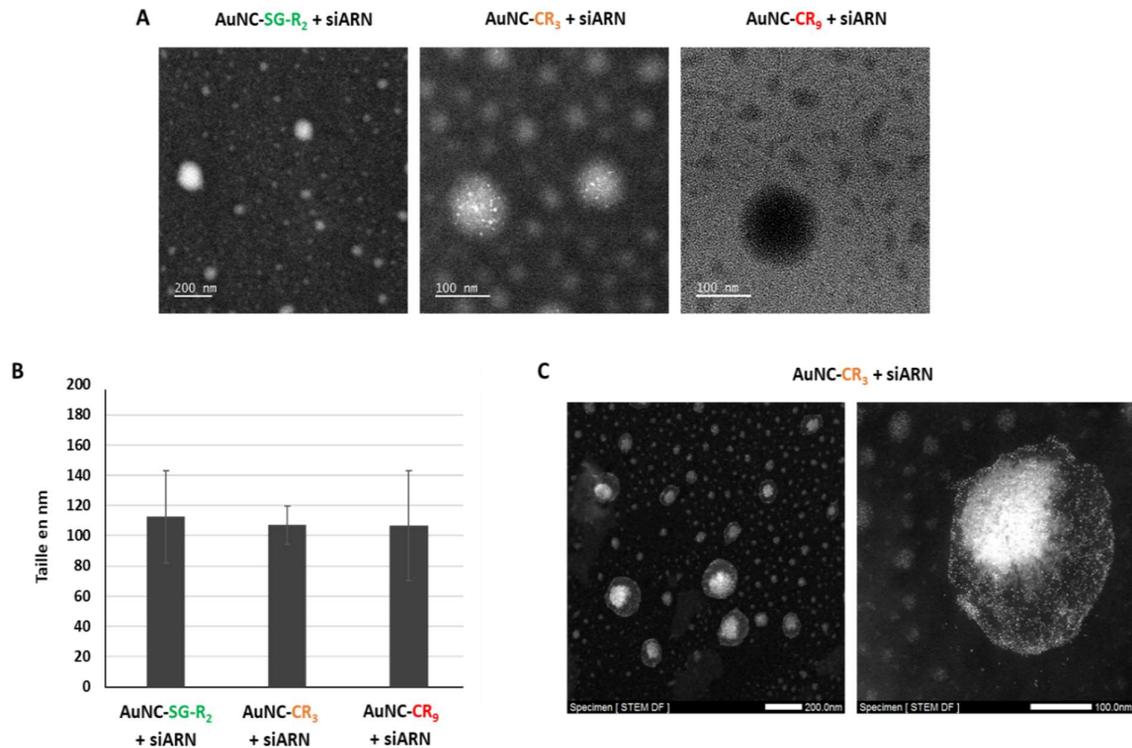
L'indice de polydispersité a également été estimé. Il s'agit d'une mesure représentant l'hétérogénéité d'un échantillon en fonction de sa taille. Cette polydispersité peut être due à la distribution de la taille ou à l'état d'agglomération/d'agrégation de l'échantillon pendant l'analyse. Les organisations internationales de normalisation (ISO) ont établi que les valeurs d'indice de polydispersité < 0,05 sont plus courantes pour des échantillons monodispersés (uniformes), tandis que des valeurs > 0,7 sont courantes chez des échantillons polydispersés (non uniformes) [237]. Dans notre cas nous nous situons entre ces deux valeurs, ce qui tend à dire que nous avons de légères variations au niveau de la distribution de taille des particules formées.



**Figure 57 : Etude de la taille et de la charge de surface des assemblages AuNCs/siARNs.** A-B-C) Distribution de taille des complexes AuNCs/siARN déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS ; dans H<sub>2</sub>O pH7) ; D) Tableau résumant les tailles, les charges et les indices de polydispersité de chaque complexe AuNC/siARN.

Les mesures effectuées par DLS ont également montré que les trois autoassemblages avaient globalement des tailles comprises entre 100 et 200 nm (**Figure 57**). A noter que selon le type de AuNC et les ratios AuNC:siARN utilisés, des variations de taille et d'indice de polydispersité ont été observées. Plus particulièrement, une différence de charge trop élevée entre les deux composés a souvent été synonyme de la formation d'agrégats (surtout avec le AuNC-CR<sub>9</sub>) liée à une augmentation des tailles et de la polydispersité mesurées.

Les autoassemblages ont finalement été visualisés par microscopie électronique afin d'avoir une idée quant à leur structure. La **Figure 58-A** montre des clichés obtenus en microscopie électronique en transmission. A partir de ces clichés, nous avons pu estimer la taille des autoassemblages afin de compléter notamment les résultats précédemment obtenus par DLS (**Figure 58-B**). Sur une moyenne d'analyse de 30 autoassemblages formés avec les AuNCs-SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>, on retrouve des tailles comprises entre 100 et 200 nm, avec respectivement une moyenne de 112, 107 et 107 nm. Cette échelle de taille est très intéressante notamment pour bénéficier de l'effet EPR comme on a pu le détailler dans l'introduction [238].



**Figure 58 : Caractérisations microscopiques des autoassemblages AuNCs/siARNs.** A) Clichés de microscopie électronique en transmission des 3 AuNCs/siARNs étudiés. B) Diamètres des autoassemblages AuNCs/siARNs déterminés à partir des clichés de microscopie (n = 30). C) Clichés de microscopie électronique en transmission à balayage de l'autoassemblage AuNCs-CR3/siARNs.

Finalement, la **Figure 58-C** représente des clichés de microscopie électronique en transmission à balayage où l'on peut apprécier plus précisément la structure d'autoassemblages formés avec le AuNC-CR<sub>3</sub>. On remarque notamment un cœur blanc probablement composé de cristaux de sel. Les parties plus grisées représenteraient les siARNs avec les AuNCs sous forme de points blancs à la surface.

## II.1.3 Etude spectrale des complexes AuNCs/siARNs

A l'instar des AuNCs seuls, les propriétés optiques de l'assemblage AuNCs/siARNs ont aussi été mesurées.

### II.1.3.1 Absorbance

La **Figure 59** montre les spectres d'absorbance mesurés pour les échantillons siARN seul, AuNCs seuls ou bien les deux espèces mélangées dans l'eau à pH 7 et après 30 minutes à température ambiante.

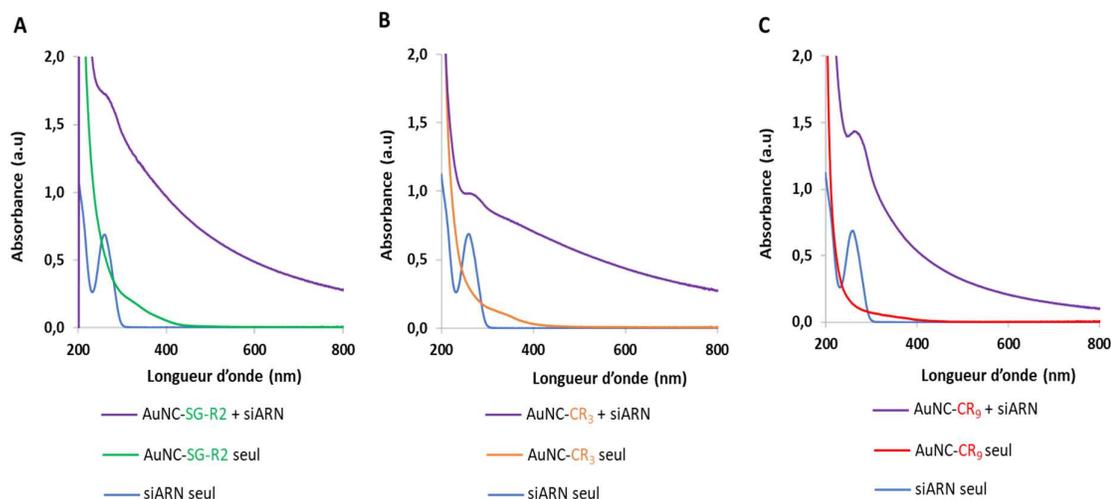


Figure 59 : Spectres d'absorbance des AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A), CR<sub>3</sub> (B) et CR<sub>9</sub> (C) et du siARN complexés ou non dans l'eau entre 200 et 800 nm.

Dans les conditions où les AuNCs sont seuls, nous retrouvons les profils types déjà observés dans le chapitre précédent, à savoir des courbes exponentielles décroissantes à partir des régions de l'UV jusqu'à celles de l'infrarouge proche. Concernant le spectre d'absorbance du siARN seul, nous avons bien une bande aux alentours de 260 nm caractéristique des acides nucléiques et plus particulièrement des hétérocycles (bases azotées). Lorsque les deux composés sont combinés dans de l'eau sans RNase on remarque un rehaussement global du spectre ainsi qu'une conservation de la bande à 260 nm relative au siARN. On peut déduire que cette augmentation de l'absorbance est liée à des modifications de surface et à la formation de composés de plus grande taille qui diffusent la lumière. Ces résultats vont bien dans le sens de la formation de complexes AuNCs/siARNs.

Nous avons ensuite évalué la stabilité au cours du temps de ces complexes AuNCs/siARNs nouvellement formés par mesures d'absorbance. En effet, après mise en contact des deux espèces, plusieurs mesures ont été prises à différents temps : juste après l'incubation des AuNCs avec les siARNs (T<sub>0</sub>), ou 30 minutes, 1 heure ou 24h après. La **Figure 60** montre les résultats obtenus pour les AuNCs SG-R<sub>2</sub> et CR<sub>3</sub>.

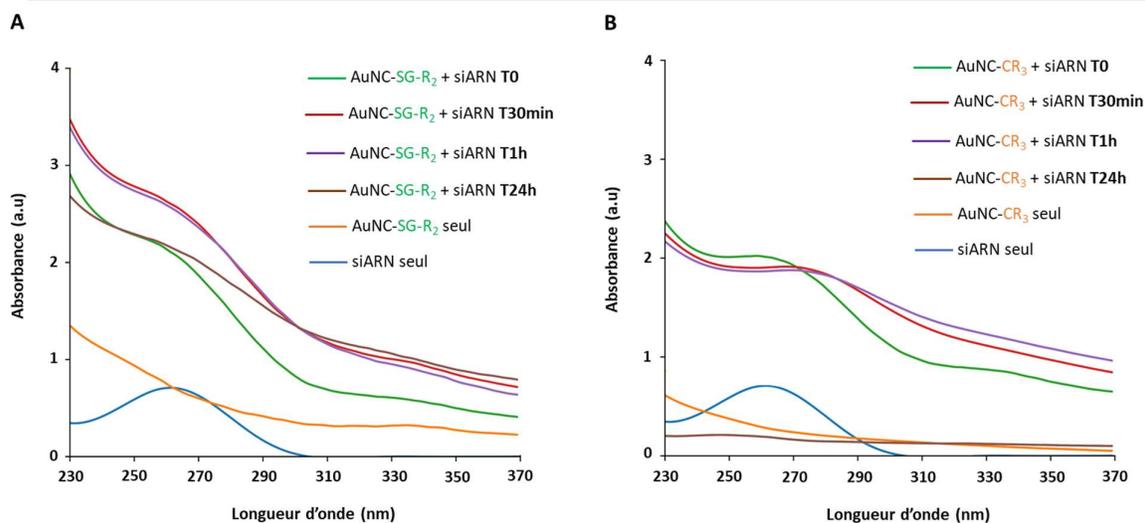


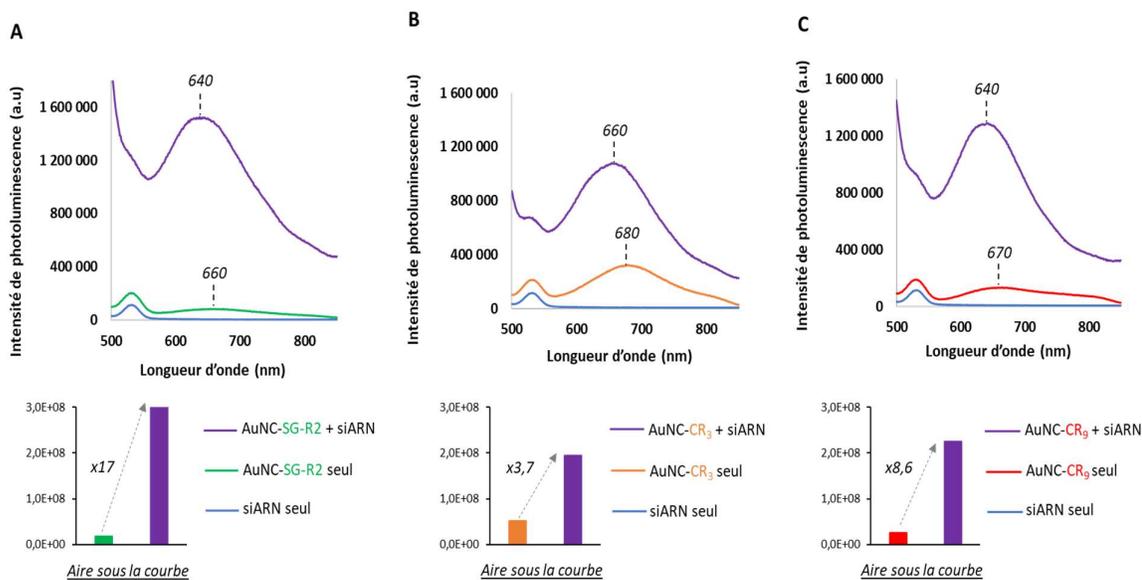
Figure 60 : Evaluation de la stabilité des complexes AuNC/siARN en fonction du temps par mesures des spectres d'absorbance entre 230 et 370 nm avec AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A) ou AuNC-CR<sub>3</sub> (B).

A l'instar de la **Figure 59**, on retrouve les mêmes profils d'absorbance pour les AuNCs seuls et pour le siARN seul. Lorsque les AuNCs sont mis en contact avec les siARNs, un rehaussement global du spectre d'absorbance apparaît. Ces résultats nous apportent plusieurs informations. Dans un premier temps, en comparant les spectres à T0 et T30 min, on remarque que celui à T0 est plus bas que celui à T30 min. Ceci confirme que la formation des complexes AuNCs/siARNs ne se réalise pas de manière instantanée, et que plusieurs minutes sont nécessaires pour qu'ils se forment et se stabilisent. En effet, pour les conditions T30 min et T1h on voit que les profils d'absorbance évoluent très peu suggérant ainsi une stabilité des complexes pendant au moins 1h. D'autres résultats ont montré que les complexes sont stables jusqu'à environ 3-4h. Au-delà de 3-4h, nous avons observé que l'absorbance globale des complexes formés diminue peu à peu (et en particulier à T24h) ce qui est caractéristique d'une désorganisation ou d'une précipitation des complexes.

Concernant la stabilité du complexe AuNCs-CR<sub>3</sub>/siARNs, des profils d'absorbance similaires au cours du temps ont été observés avec cependant des spectres d'absorbance moins linéaires et caractéristiques d'une plus forte instabilité de complexation.

### II.1.3.2 Fluorescence

L'intensité de fluorescence des assemblages AuNCs/siARNs a par la suite également été évaluée. La **Figure 61** montre des mesures de photoluminescence à une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc} = 450$  nm des AuNCs seuls, des siARNs seuls ou des deux composés mixés dans l'eau à pH 7 et après 30 minutes à température ambiante.



**Figure 61 : Spectres de photoluminescence des différents AuNCs complexés ou non avec un siARN dans l'eau entre 500 et 800 nm. AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A) AuNC-CR<sub>3</sub> (B) et AuNC-CR<sub>9</sub> (C). La photoluminescence a été quantifiée en déterminant l'aire sous chaque courbe.**

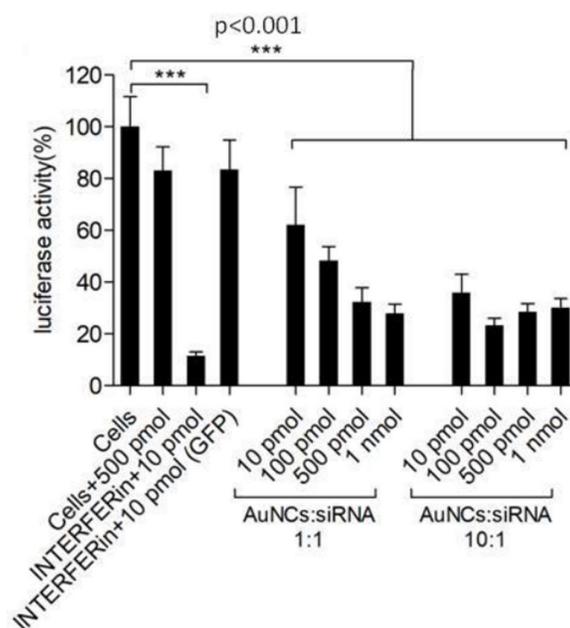
Pour chaque AuNC on observe une nouvelle fois une bande d'émission de fluorescence de 500 à 850 nm avec des pics d'émission maximale proches de  $\lambda_{em} = 670$  nm. Lorsque les AuNCs sont complexés aux siARNs, nous avons une augmentation de l'intensité de fluorescence générale ce qui est caractéristique de la formation d'espèces de plus grande taille en raison de phénomènes de fluorescence induit par agrégation (effet AIE) [239]. Dans chaque condition AuNC + siARN, on remarque également un décalage vers le bleu (régions UV-visible) du pic d'émission maximal comparé aux conditions AuNCs seuls. Ce décalage (ou « blue shift ») est relatif à l'augmentation de la rigidité autour des AuNCs impliqués dans l'autoassemblage par la matrice de siARN et aux couplages électroniques interparticulaires [240] [241], ce qui va de nouveau dans le sens de la formation d'un assemblage entre les deux molécules.

## II.2 Transfection du complexe AuNCs/siARNs anti TRF2 dans les cellules cancéreuses

Après validation de la formation et la caractérisation des complexes AuNCs/siARNs, leur capacité à transporter les siARNs dans les cellules tumorales de manière efficace et fonctionnelle a été analysée. Des études microscopiques ont d'abord été réalisées pour voir si les siARNs étaient capables d'atteindre l'intérieur des cellules. Ensuite, l'expression relative de la protéine TRF2 dans des cellules incubées ou non avec le nanosystème AuNCs/siARNs a été quantifiée par western blot. Finalement l'impact de ce traitement sur la viabilité cellulaire a été étudié *via* des essais clonogéniques et le dénombrement de colonies cellulaires (colony forming unit).

Pour assurer la pénétration cellulaire efficace et montrer que le siARN utilisé est bien fonctionnel, un réactif commercial *lipofectamine RNAiMax* est utilisé comme contrôle positif pour chaque expérience réalisée dans cette partie. Ce réactif est composé de lipides chargés positivement qui, en solution aqueuse, forment des liposomes capables d'internaliser le siARN dans des cellules.

Les études de transfection présentées dans cette partie ont été réalisées en se basant sur des résultats antérieurs à ce projet obtenus dans notre équipe et présentés **Figure 62**, où des AuNCs-SG-R<sub>2</sub> complexés avec un siARN anti-luciférase avaient été utilisés.



**Figure 62 : Activité de la luciférase chez des cellules A549-LUC après transfection avec des AuNC-SG-R<sub>2</sub> complexés à un siARN anti-luciférase.** Le siARN (10 pmol, 100 pmol, 500 pmol ou 1 nmol) a été complexé aux AuNC-SG-R<sub>2</sub> avec des ratios de masse de 1:1 ou 10:1.

Dans les conditions testées l'expression de la luciférase a pu être réduite jusqu'à environ 60%. Les résultats de cette étude antérieure ont donc permis de valider l'efficacité de transport de siARNs

Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon

fonctionnels par AuNC-SG-R<sub>2</sub> *in vitro*. Ils ont pu fournir une base solide pour l'optimisation des conditions de transfection du siARN ciblant TRF2 avec les nouveaux AuNCs synthétisés dans le cadre de mon projet de thèse.

## II.2.1 Etude de la protection du siARN par les AuNCs

Dans l'introduction, nous avons eu l'occasion de discuter des limitations quant à l'utilisation de siARN en thérapie et plus particulièrement leur vulnérabilité aux nucléases endogènes. En ce qui concerne ce projet de thèse, les siARNs utilisés comportent une modification chimique de type 2'O-Methyl au niveau des riboses. Comme on a pu le voir partie II.2.3, en bloquant ces positions, on limite la fixation de certaines nucléases et phosphatases sériques responsables des dégradations enzymatiques de la plupart des siARNs dans la cellule. En plus de cette modification, le rôle protecteur des AuNCs utilisés dans ce projet a été étudié et la **Figure 63** montre les résultats préliminaires obtenus.

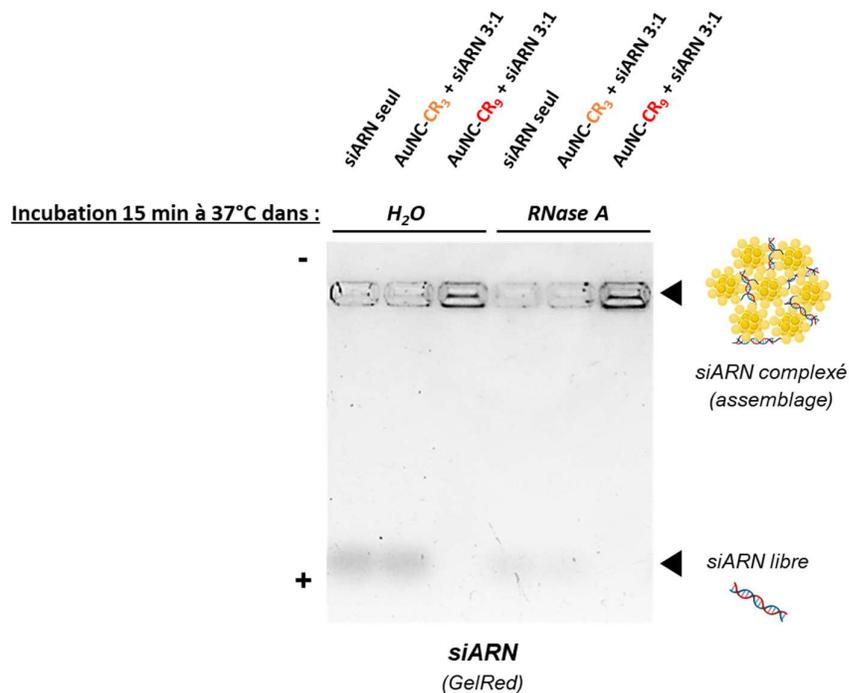


Figure 63 : Evaluation du rôle protecteur des AuNCs-CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> sur des siARNs incubés 15 min à 37°C dans H<sub>2</sub>O ou dans RNase A par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les siARNs sont observés à une longueur d'émission de 537 nm après incubation du gel dans du GelRed.

En absence de complexation avec les AuNCs, les siARNs libres sont dégradés en présence d'une endoribonucléase (RNase A) et n'apparaissent donc plus sur le gel. Lorsque les siARNs sont complexés avec AuNC-CR<sub>9</sub>, ils ne sont pas dégradés par les RNases : en effet la bande de siARN apparaît toujours au niveau du puit du gel d'agarose. On note aussi dans cette expérience que la complexation des siARNs avec AuNC-CR<sub>3</sub> avec un ratio de masse 3:1 au lieu de 5:1 conduit à une complexation partielle contrairement à la complexation des siARNs avec le AuNC-CR<sub>9</sub> comme indiqué précédemment (II.1.1).

Dans ces conditions, on note bien que les siARNs non complexés à AuNC-CR<sub>3</sub> sont dégradés car la bande de siARN libres observée dans les conditions sans RNase disparaît en présence de RNase. La faible intensité de la bande correspondant au siARN complexé avec AuNC-CR<sub>3</sub> ne nous permet pas de tirer de conclusion. Ces résultats suggèrent donc un effet protecteur de AuNC-CR<sub>9</sub> vis-à-vis des siARNs avec lesquels il est complexé.

Afin de confirmer ce rôle protecteur des AuNCs, ces résultats doivent être répétés notamment en faisant varier les conditions d'incubations ainsi que les ratios avec les différents AuNCs. Pour aller plus loin, il est aussi tout à fait possible de réaliser une complexation avec un siARN marqué avec un fluorophore et de suivre sa survie en fonction du temps par microscopie à fluorescence. Ces résultats préliminaires vont dans le sens de ceux de la littérature. En effet, des études utilisant des AuNPs comme agents de vectorisation de siARNs ont montré que ces formulations favorisaient la pénétration cellulaire, l'échappement endosomal (effet « éponge à protons ») et l'activité thérapeutique de ces acides nucléiques grâce à leur protection contre la dégradation par les nucléases [242] [243] [244]. De manière très intéressante, ces mêmes études précisent également le rôle important du ratio AuNP/acide nucléique sur l'intensité de ces effets de complexation et de protection comme on a pu le montrer également.

## II.2.2 Etude de la pénétration cellulaire par microscopie confocale à fluorescence

La **Figure 64** représente un schéma simplifié de la procédure de transfection qui a précédé les études microscopiques.

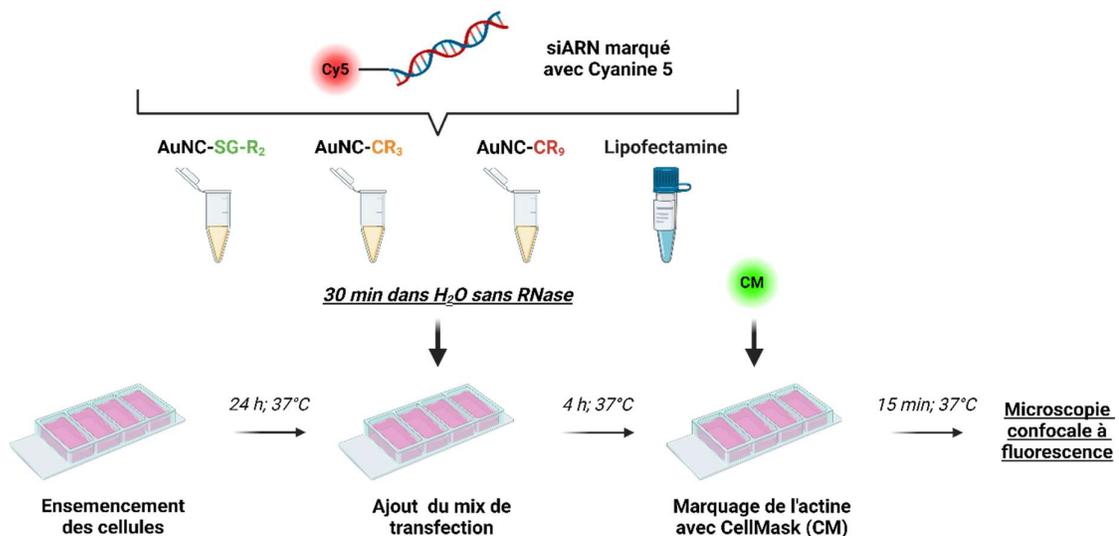


Figure 64 : Schéma simplifié représentant le protocole de transfection du système AuNCs/siARNs dans des cellules cancéreuses A549 avant analyse par microscopie confocale à fluorescence.

Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon

---

Le siARN est complexé aux AuNCs avec les ratios de masse précédemment déterminés (II.1.1) pendant 30 minutes dans de l'eau sans RNase avant d'être mis en contact avec les cellules cancéreuses de poumon (A549). Pour la visualisation, le siARN est marqué avec un fluorophore de type Cyanine 5 et les membranes cellulaires (actine) avec du CellMask green. En observant les clichés de microscopie confocale après transfection (**Figure 65**), on confirme que les siARNs se retrouvent à l'intérieur des cellules cancéreuses avec les trois AuNCs utilisés dès 4 heures d'incubation. En effet du signal lié à la cyanine 5, et donc aux siARNs, est bien détecté à l'intérieur des cellules spécifiquement.

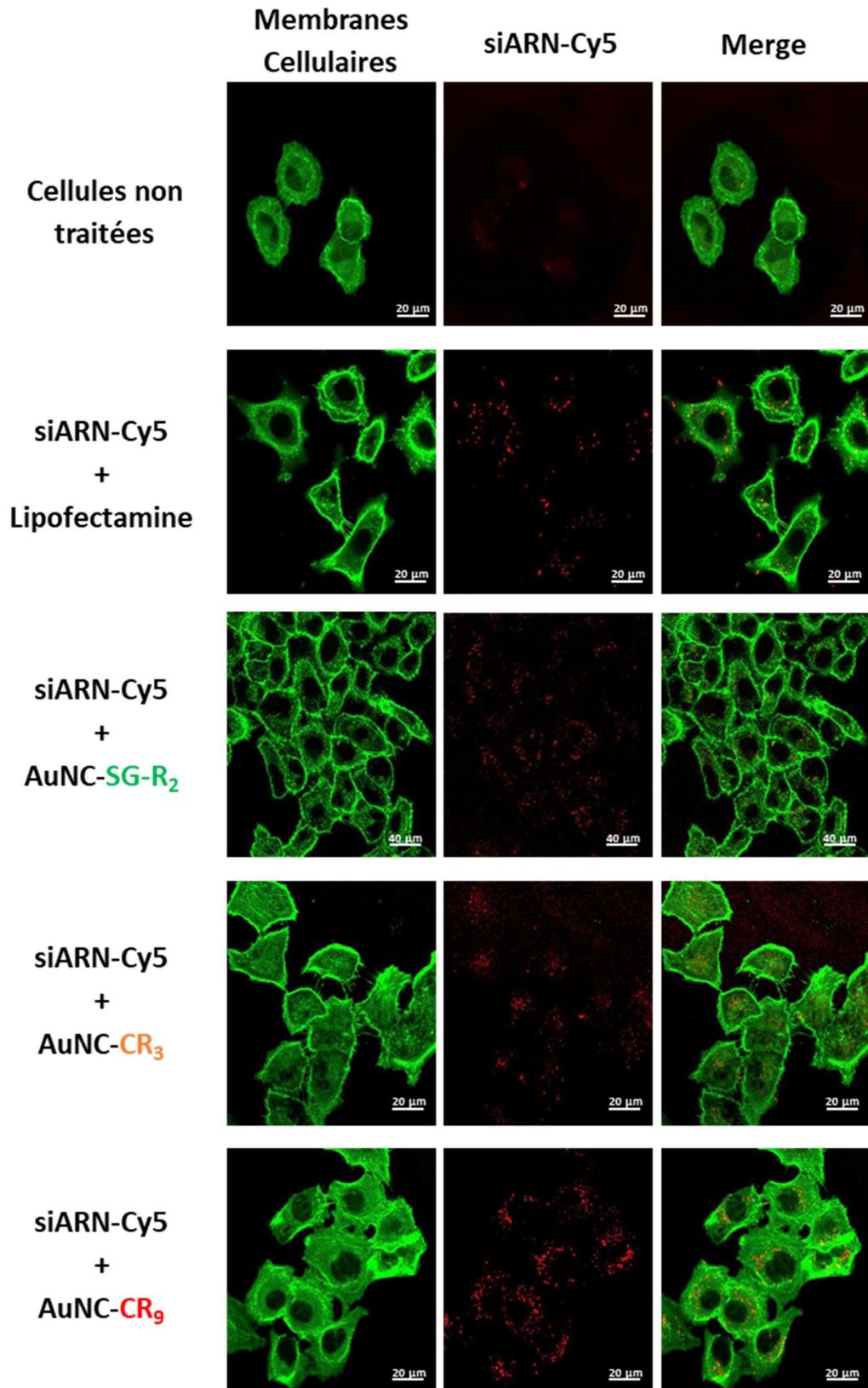
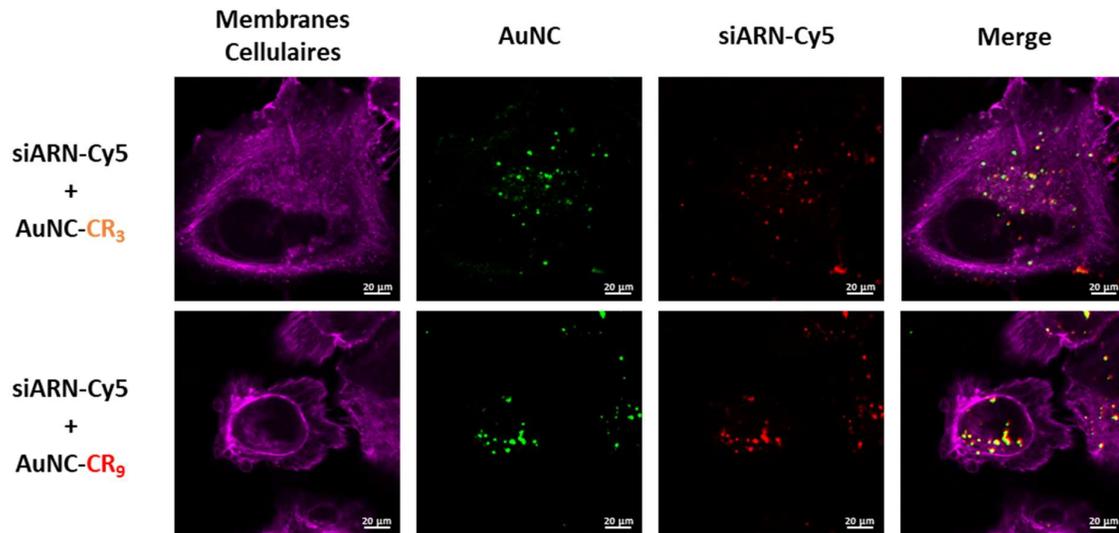


Figure 65 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence de cellules A549 incubées avec les complexes AuNCs/siARNs. Le siARN est complexé avec de la Cyanine 5 ( $\lambda_{em} = 621-799$  nm) et l'actine (membranes cellulaires) avec du CellMask green ( $\lambda_{em} = 486-617$  nm). Ratios de masse : AuNC-SG-R<sub>2</sub>/siARN = 8:1 ; AuNC-CR<sub>3</sub>/siARN = 5:1 ; AuNC-CR<sub>9</sub>/siARN = 3:1 ; quantité siARN par condition = 300 pmol ; incubation 4h à 37°C.

Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon

Une autre expérience a été réalisée dans des conditions similaires dans le but de visualiser une co-localisation entre les AuNCs et les siARNs. Sur la **Figure 66** les siARNs marqués à la Cy5 sont de nouveau détectés à l'intérieur des cellules après leur complexation avec les AuNC-CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>.



**Figure 66** : Clichés de microscopie confocale à fluorescence de cellules A549 incubées avec les complexes AuNCs/siARNs. Le siARN est complexé avec de la Cyanine 5 ( $\lambda_{em} = 621-799$  nm) et l'actine (membranes cellulaires) avec du CellMask green ( $\lambda_{em} = 486-617$  nm). Ratios de masse : AuNC-CR<sub>3</sub>/siARN = 5:1 ; AuNC-CR<sub>9</sub>/siARN = 3:1.

Dans cette expérience nous avons également pu détecter la fluorescence liée aux AuNCs en plus de celle liée à la Cy5. Ainsi, en comparant les signaux des AuNCs et des siARNs nous pouvons noter la proximité des deux composés à l'intérieur des cellules ce qui confirme leur forme complexée.

Pour aller plus loin il serait intéressant de réaliser cette expérience dans les mêmes conditions à différents temps d'incubation dans l'objectif de suivre et d'évaluer le relargage des siARNs et leur séparation des AuNCs dans la cellule. Finalement, d'autres expériences de microscopie à fluorescence ont été réalisées où nous marquons cette fois ci les endosomes précoces et tardifs pour voir si les siARNs suivraient la voie du lysosome et seraient par conséquent dégradés sans avoir eu le temps de faire leur action. Les premiers résultats de ces études ne montrent pas de co-localisation systématique des siARNs avec les endosomes tardifs mais ces expériences se doivent d'être répétées actuellement.

## II.2.3 Etude de l'inhibition de l'expression de la protéine TRF2 par les complexes AuNCs/siARNs et conséquence sur la survie cellulaire

Afin d'étudier l'impact des complexes AuNCs/siARNs sur l'expression de la protéine TRF2 dans des cellules tumorales, la quantification de l'expression relative de la protéine TRF2 a été analysée par western blot après avoir effectué le protocole de transfection décrit ci-dessous. (**Figure 67**).

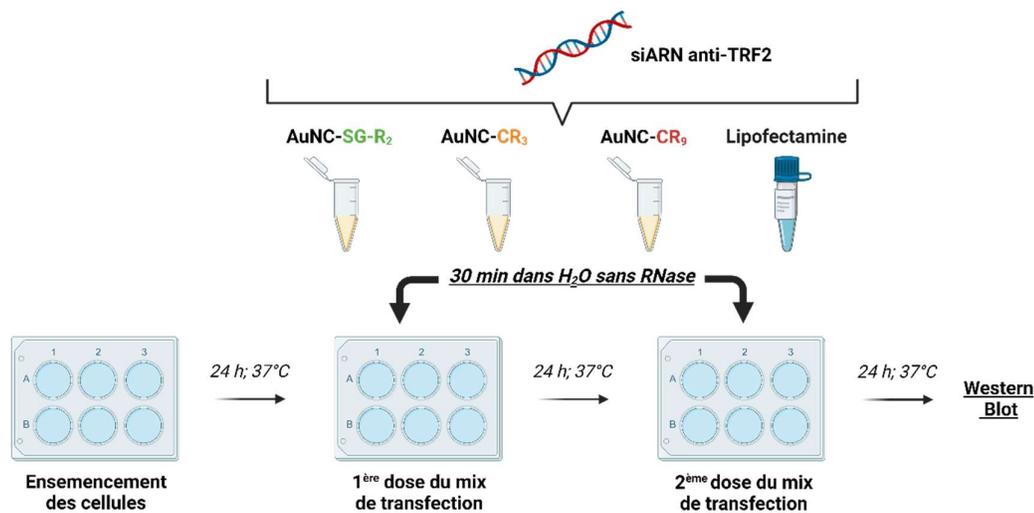
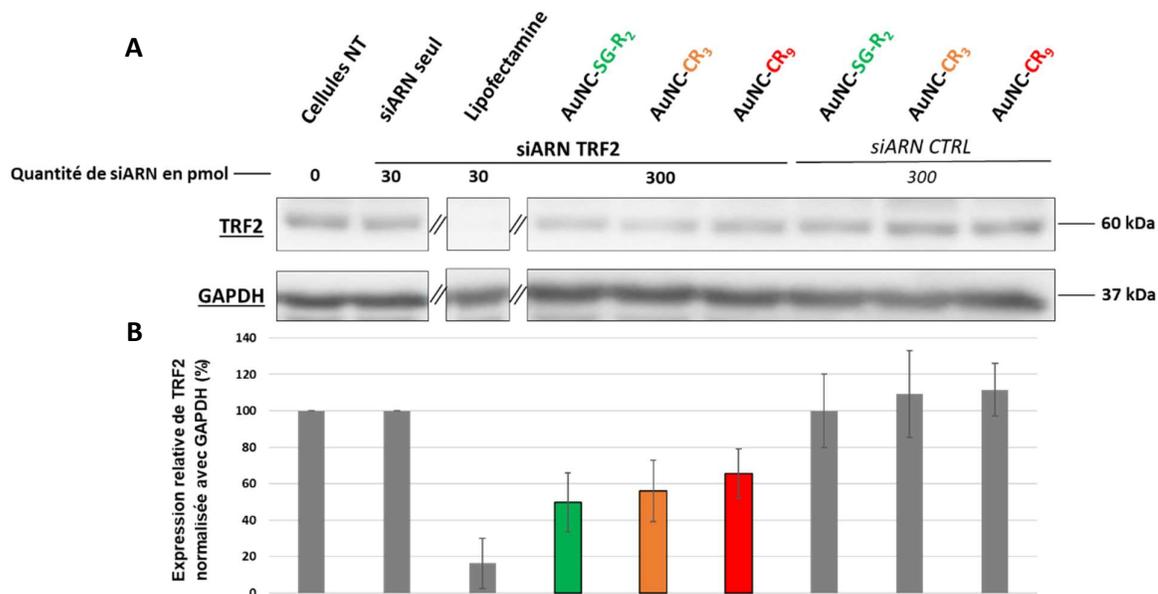


Figure 67 : Protocole de transfection du système AuNCs/siARNs avant Western Blot.

Pour ces transfections, et en se basant sur les résultats antérieurement obtenus dans l'équipe (**Figure 62**), plusieurs quantités de siARN allant de 10 pmol à 1 nmol ont été testées, toujours en appliquant les ratios de masse AuNCs:siARNs déterminés précédemment lors des tests de complexation sur gel d'agarose.

Après 48h d'incubation avec les complexes AuNCs/siARNs ciblant TRF2, l'expression relative de la protéine TRF2 dans des cellules cancéreuses A549 est quantifiée (**Figure 68**). La quantification (histogrammes) a été faite sur trois expériences réalisées de manière indépendante et dans les mêmes conditions.

Les résultats montrent que l'expression de la protéine TRF2 est significativement réduite dans les conditions AuNCs/siARNs ciblant TRF2 comparé aux contrôles des cellules non traitées, incubées seulement avec le siARN ciblant TRF2 ou avec le AuNCs/siARNs CTRL. Le siARN CTRL n'est dirigé contre aucun ARNs exprimés dans les cellules tumorales utilisées. L'expression de la protéine TRF2 a été normalisée avec celle de la protéine GAPDH utilisée ici comme contrôle de charge. La diminution d'expression de TRF2 est de l'ordre de 50% avec les AuNCs SG-R<sub>2</sub> et CR<sub>3</sub>, et elle est d'environ 60% avec le AuNC-CR<sub>9</sub>.



**Figure 68** : Étude de l'expression relative de la protéine TRF2 après transfection avec les AuNCs complexés à un siARN anti TRF2 ou siARN contrôle (n=3). **A**) Analyse western blot ; **B**) Quantification de l'expression relative de la protéine TRF2 normalisée avec l'expression relative de la protéine GAPDH. Quantité de siARN complexée avec les AuNCs = 300 pmol (4,7 µg). Quantité de AuNC complexée avec les siARNs = 37,6 µg pour le AuNC-SG-R<sub>2</sub> (ratio de masse 8:1); 23,5 µg pour le AuNC-CR<sub>3</sub> (ratio de masse 5:1); 14,1 µg pour le AuNC-CR<sub>9</sub> (ratio de masse 3:1).

Suite à ces résultats prometteurs nous avons décidé d'évaluer l'impact de cette inhibition de l'expression TRF2 sur la radiosensibilité cellulaire. Pour cela nous avons réalisé des essais clonogéniques et évalué la survie cellulaire après irradiation chez des cellules pré traitées avec notre nanosystème AuNCs/siARNs ciblant TRF2. Ces premiers tests ont été réalisés avec le AuNC-SG-R<sub>2</sub> avec lequel l'inhibition de TRF2 était la plus importante (**Figure 68**).

L'essai clonogénique (ou essai de formation de colonies) est un essai de survie cellulaire *in vitro* basé sur la capacité d'une cellule à se développer en formant une colonie. Dans ce cas une colonie est définie comme étant composée d'au moins 50 cellules. Ce test évalue la capacité de chaque cellule de la population à se diviser de manière illimitée. C'est la méthode de choix pour déterminer si la mort des cellules après un traitement par radiations ionisantes est reproductible [245]. La **Figure 70** montre la procédure générale du test qui a été réalisé, allant de la transfection du complexe AuNCs/siARNs ciblant TRF2 jusqu'au dénombrement des colonies.

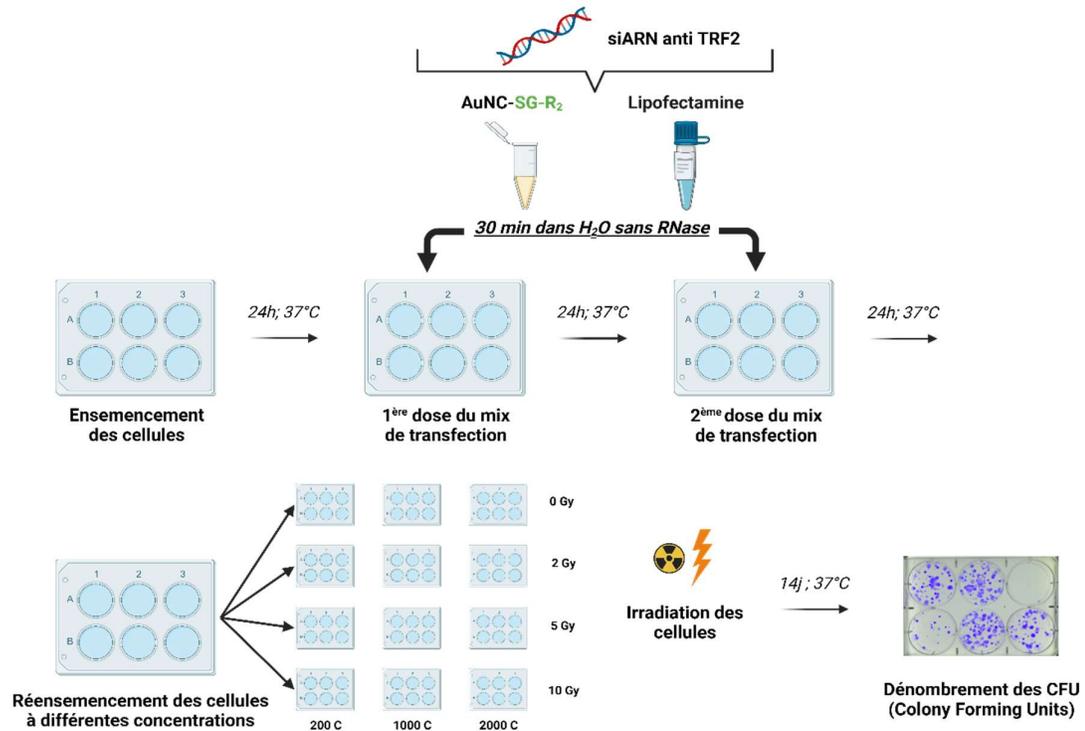


Figure 70 : Schéma simplifié de la procédure du test clonogénique réalisé sur des cellules A549 irradiées à différentes doses et préalablement transfectées avec le nanosystème AuNCs/siARNs anti TRF2.

Après transfection, les cellules sont ensemencées à différentes concentrations (200, 1000 ou 2000 cellules par puits) puis sont ensuite irradiées à différentes doses d'irradiation allant de 0 à 10 Gy. Elles sont ensuite laissées deux semaines en culture pour former des colonies qui sont alors fixées avec du glutaraldéhyde (6,0 % v/v), colorées avec du cristal violet (0,5 % w/v) et comptées à l'aide d'une caméra. Suite à ce dénombrement, on trace les courbes de survie cellulaire (Figure 69).

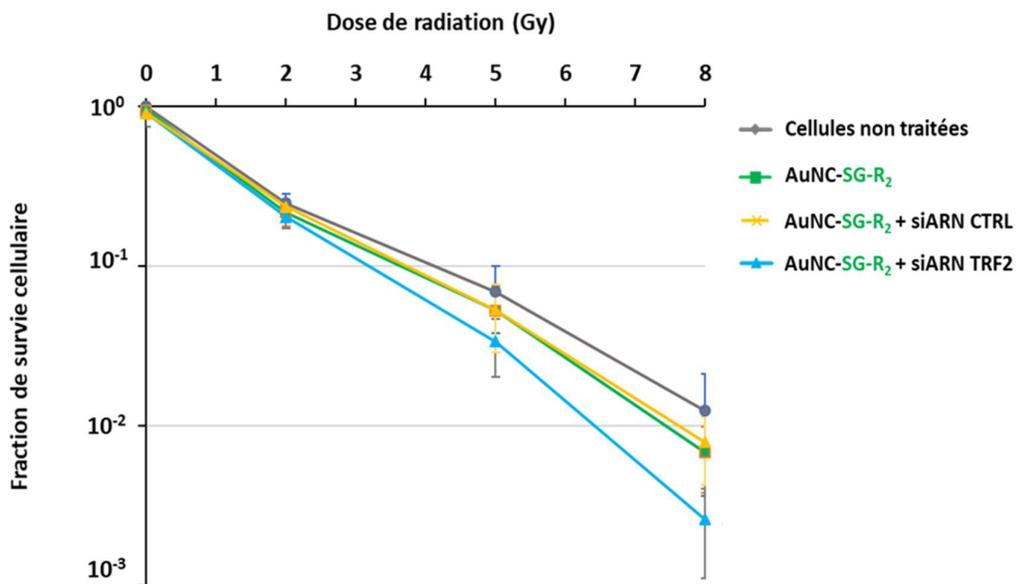


Figure 69 : Courbes de survie de cellules A549 ensemencées après traitements avec le nanosystème AuNCs-SG-R<sub>2</sub>/siARNs et irradiation à des doses croissantes (n=4).

Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon

Nous observons une diminution de la survie cellulaire pour toutes les conditions à mesure que l'on augmente la dose d'irradiation. Lorsque l'on ajoute les AuNCs-SG-R<sub>2</sub> cette diminution de la survie cellulaire est un peu plus prononcée, ce qui résulterait de l'action radiosensibilisante liée aux AuNCs comme expliqué en partie introduction (III.3.2). Lorsqu'on traite au préalable les cellules avec le nanosystème AuNCs-SG-R<sub>2</sub>/siARNs anti TRF2 on note une diminution de la survie cellulaire plus importante à n'importe quelle dose d'irradiation. Là encore ces résultats vont tout à fait dans le sens de ce que l'on a abordé en introduction et viennent confirmer le rôle non négligeable de TRF2 dans la radiorésistance cellulaire.

Finalement, une étude morphologique a également été réalisée en parallèle dans le but de confirmer les résultats ci-dessus. Les cellules irradiées précédemment ont été visualisées par microscopie et des champs représentatifs de la population cellulaire dans chaque condition sont représentés **Figure 71**.

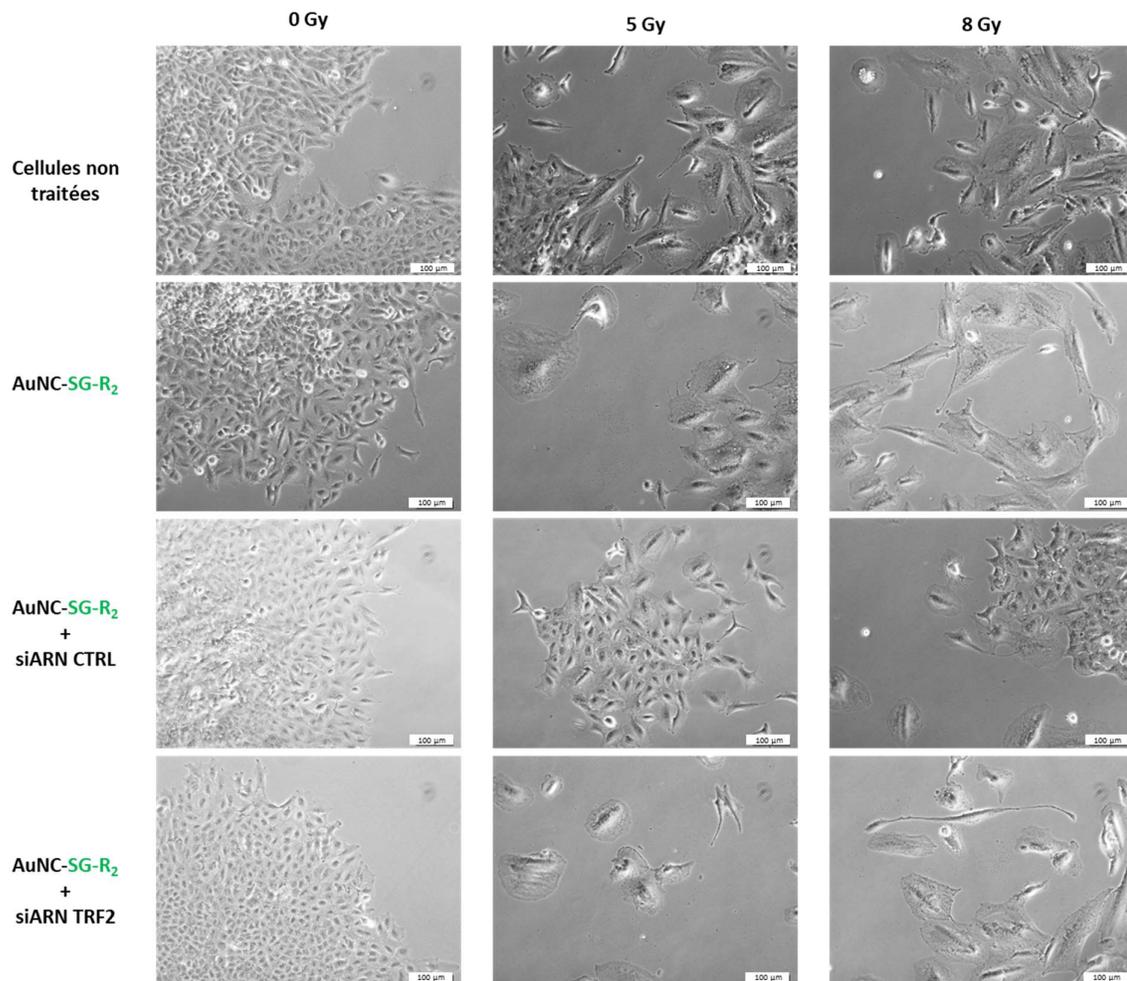


Figure 71 : Etude morphologique de cellules A549 transfectées avec le nanosystème AuNC-SG-R<sub>2</sub>/siARN après irradiation à des doses croissantes en Gy.

Cette dernière étude nous permet de comparer l'état des cellules en fonction des différentes conditions. Au fur et à mesure que la dose d'irradiation augmente, les cellules ont tendance à apparaître globalement

Etude de la vectorisation du nanosystème AuNCs/siARNs TRF2 dans des cellules cancéreuses de poumon

---

plus large, plus écartées et moins nombreuses. Comme on a pu le voir en partie introduction (**Figure 12**) cet état est caractéristique d'une sensibilité cellulaire et est relativement plus prononcé dans les conditions où les cellules ont été traitées avec les AuNCs et le siARN anti-TRF2.

## II.3 Conclusion chapitre 2

Cette deuxième partie a été l'occasion d'utiliser les AuNCs synthétisés dans la première partie afin de les complexer avec un siARN anti-TRF2 pour former un autoassemblage. Ce nanosystème a ensuite été incubé avec des cellules pulmonaires cancéreuses dans l'objectif d'inhiber l'expression de la protéine TRF2, impliquée dans la radiosensibilité cellulaire suite à une radiothérapie.

Nous avons confirmé par électrophorèses sur gel que les trois différents AuNCs testés étaient capables, par interactions électrostatiques, de complexer une quantité de siARN définie. Cette complexation a par la suite été caractérisée et apparaît sous forme de structures globalement chargées positivement, avec des tailles sensiblement différentes comprises entre 100 et 200 nm. Des modifications des propriétés spectrales des complexes AuNCs/siARNs comparé aux AuNCs seuls ont également été observées et attribuées à la formation d'espèces de plus grande taille allant dans le sens de la formation de complexes AuNCs/siARNs.

La pénétration cellulaire des AuNCs/siARNs ainsi que leur fonctionnalité ont été validées par microscopie à fluorescence et western blot. Après incubation des trois différents complexes avec des cellules tumorales, le siARN ciblant TRF2 se retrouve bien dans le cytoplasme des cellules et entraîne une baisse significative de l'expression de TRF2 allant jusqu'à 50%. Pour évaluer l'impact de cette inhibition sur l'induction d'une radiosensibilité accrue, des premiers tests visant à évaluer la survie cellulaire ont été réalisés. Au terme d'une expérience d'essai clonogénique avec le AuNC-SG-R<sub>2</sub>, une réduction de la survie cellulaire a été observée après irradiation des cellules incubées avec le complexe comparé à celles non traitées. Les autres AuNCs doivent aussi être testés. En ce qui concerne les dommages à l'ADN, des western blot visant à évaluer l'expression de la forme phosphorylée de la protéine histone H2A (largement exprimée et impliquée lors de cassures double brin de l'ADN) ont été réalisés. Bien qu'une tendance à l'augmentation des taux de phosphorylation de cette protéine ait été observée chez des cellules transfectées avec les complexes AuNCs/siARNs comparé aux cellules non traitées lors d'expériences préliminaires, les résultats doivent être reproduits.

---

## Résultats

---

### **III. Synthèse de glycoconjugués pour l'optimisation du ciblage du nanosystème AuNCs/siARNs**

---

Les AuNCs et plus particulièrement les structures autoassemblées permettent un ciblage tumoral passif *via* l'effet EPR [246]. Pour apporter un ciblage plus efficace des cellules cancéreuses, le dernier axe de mon projet de thèse a été consacré à l'ajout d'un ligand contenant des sucres au nanosystème AuNCs/siARNs. En effet, comme expliqué en introduction, il a été montré que dans la plupart des cancers nous retrouvons une forte proportion de transporteurs de sucres GLUTs exprimés à la surface des cellules tumorales (effet Warburg), liée à un niveau élevé d'absorption de glucose par les cellules cancéreuses pour assurer leur croissance incontrôlée. Dans le but de tirer avantage de ce phénomène, de nouveaux ligands constitués de glucose, qu'on appellera glycoconjugués, ont donc été synthétisés et greffés au nanosystème.

Dans l'objectif d'étudier l'apport de la multivalence en Glc sur l'efficacité de ciblage et de l'interaction avec les GLUTs, nous avons décidé de synthétiser et de tester des glycoconjugués porteurs de 1 ou 4 Glc. Pour cela, un cyclodécapeptide appelé RAFT (Regioselectively Adressable Functionnalized Template) a été utilisé en guise de plateforme de présentation de ces sucres dans un espace géométrique bien défini. Une chaîne de polyéthylène glycol (PEG) a été conjuguée sur les molécules tétravalentes et monovalentes pour favoriser l'accès au glucose quand celui-ci sera greffé aux AuNCs. L'impact de la position de la fonctionnalisation des glucoses, via leur hydroxyle du carbone 1 (C1) ou 6 (C6), a également été analysé.

Pour évaluer la bonne capacité de ciblage des cellules tumorales de ces glycoconjugués, nous avons d'abord décidé de les tester *in vitro* **avant** de les greffer aux AuNCs. Pour cela, des fluorophores de type fluorescéine (FITC) ou cyanine 5 (Cy5) ont été greffés sur les chaînes PEG, permettant de les suivre par cytométrie en flux et microscopie confocale à fluorescence.

En résumé, voici les glycoconjugués qui ont été synthétisés :

- **Composé n°12** : 1 Glucose fonctionnalisé par une fluorescéine *via* un PEG et le carbone 1 (1Glc(C1)-PEG ; **Figure 72**).

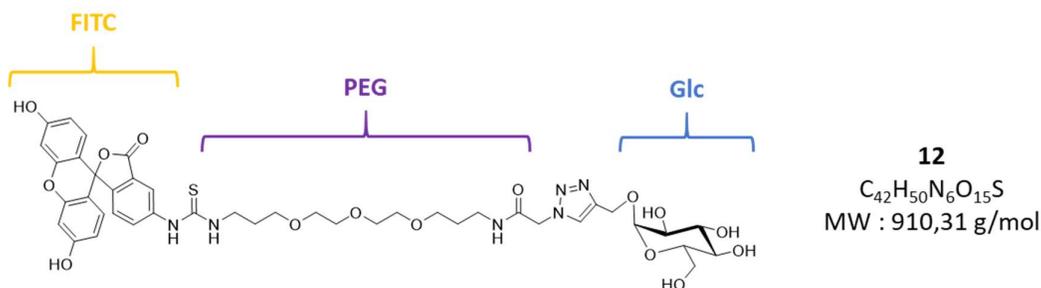


Figure 72 : Structure du composé n°12, une chaîne PEG conjuguée avec un Glc *via* le C1 et de la FITC.

- **Composé n°13** : 1 Glucose fonctionnalisé par une fluorescéine *via* un PEG et le carbone 6 (1Glc(C6)-PEG ; **Figure 73**).

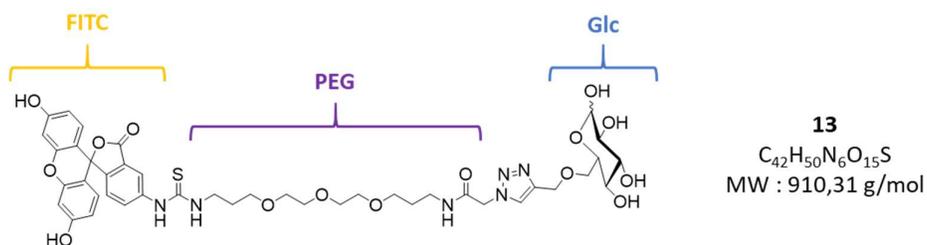


Figure 73 : Structure du composé n°13, une chaîne PEG conjuguée avec un Glc *via* le C6 et de la FITC.

- **Composé n° 17** : 4 Glucoses fonctionnalisés par une fluorescéine *via* un PEG et les carbones 1 (4Glc(C1)-RAFT-PEG ; **Figure 74**).

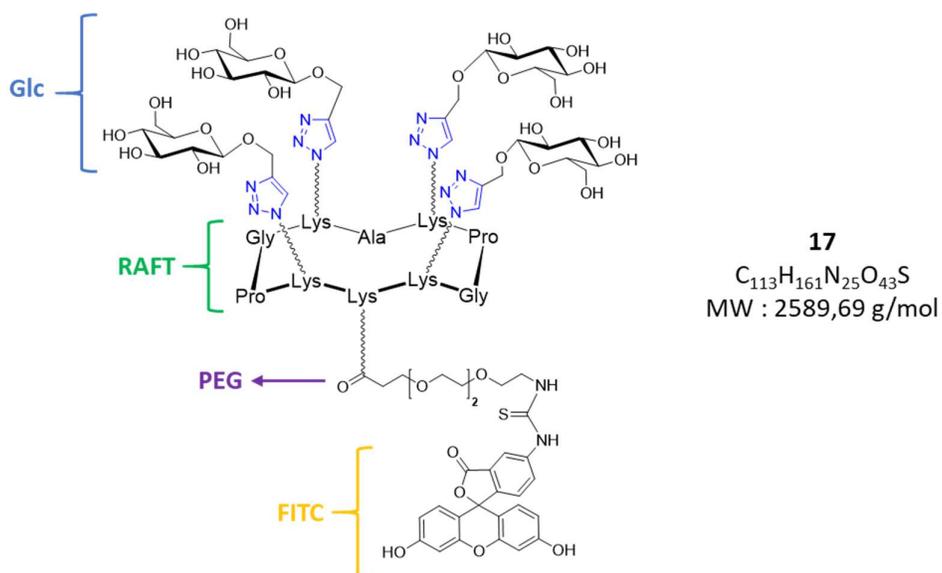


Figure 74 : Structure du composé n°17, une chaîne PEG conjuguée avec un RAFT-4Glc *via* le C1 et de la FITC.

- **Composé n°18** : 4 Glucoses fonctionnalisés par une fluorescéine *via* un PEG et les carbones 6 (4Glc(C6)-RAFT-PEG ; **Figure 75**).

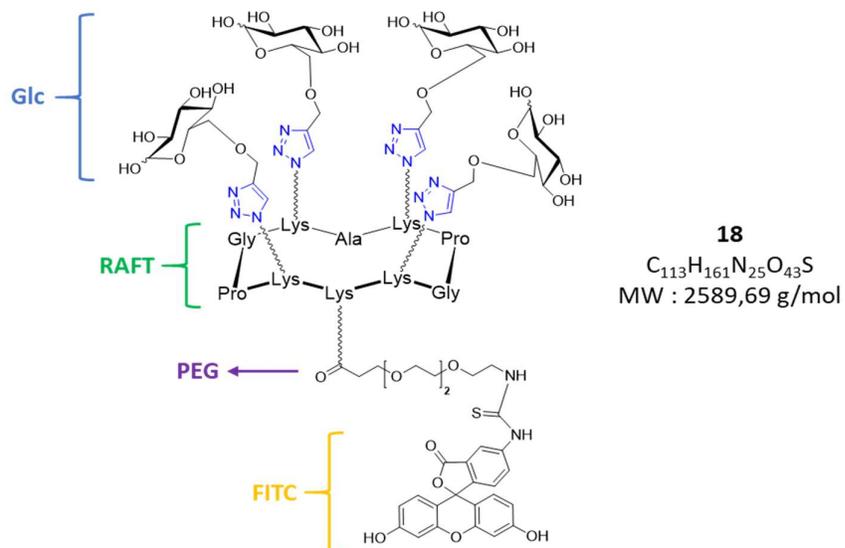


Figure 75 : Structure du composé n°18, une chaîne PEG conjuguée avec un RAFT-4Glc via la C6 et de la FITC.

Les composés 12 et 13 seront appelés « glycoconjugués monovalents », les 17 et 18 « glycoconjugués tétravalents ».

### III.1 Synthèse des glycoconjugués

Comme indiqué ci-dessus, les glycoconjugués sont constitués de plusieurs parties (Glucose, RAFT, PEG, fluorophore) qu'il a fallu synthétiser et assembler entre elles. Les méthodes de synthèse utilisées reposent essentiellement sur la synthèse et le couplage peptidique, ainsi que sur la chimie « click » (ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre, CuAAC).

#### III.1.1 Généralités sur la chimie « click » ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC)

La chimie « click » regroupe une multitude de réactions chimiques qui permettent le couplage efficace de deux molécules de manière chimio- et régiosélective [247]. Dans notre cas, la réaction utilisée est la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC). Le **Schéma 1** résume cette réaction où nous avons un alcyne, porté par une molécule 1, qui réagit en présence de cuivre 1 avec un azoture ( $N_3$ ), porté par une molécule 2, ce qui permet la formation sélective d'un lien triazole 1,4 disubstitué entre molécules. Sans le cuivre, il y a une perte de la régiosélectivité et on obtient alors un mix de régioisomères 1,4 et 1,5. Ce type de réaction de conjugaison présente également l'avantage de ne nécessiter aucun groupe protecteur.

Nous souhaitons utiliser cette réaction pour lier les Glc soit à la chaîne PEG pour les composés Glc monovalents, soit au cyclodécapeptide RAFT pour les composés Glc tétravalents. Pour cela, nous avons d'abord dû greffer un alcyne sur les Glc et des azotures sur les PEG et RAFT.

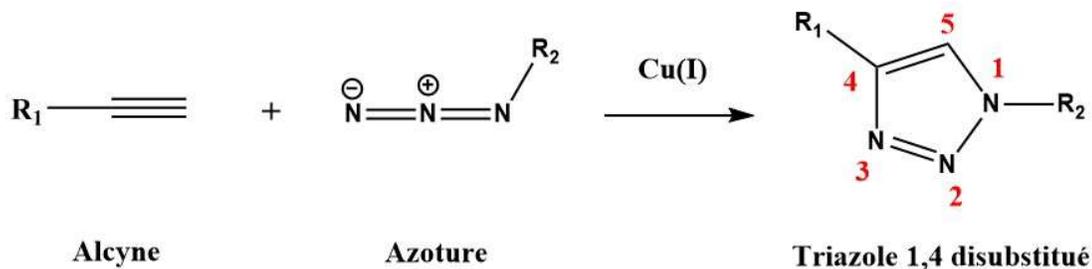


Schéma 1 : Réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC).

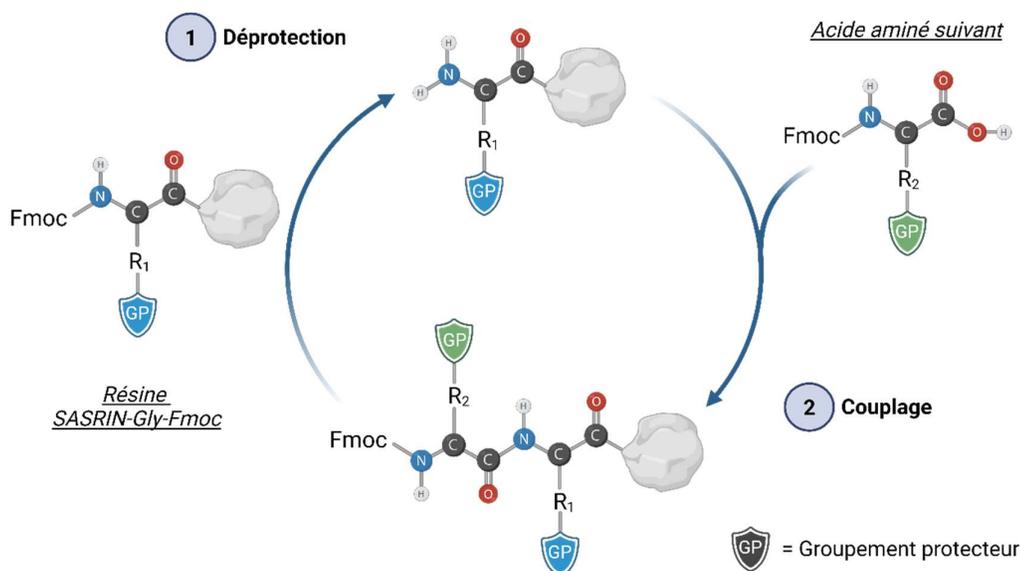
#### III.1.2 Synthèse des Glucoses propargylés en 1 et en 6

A partir du D-Glucose commercial, nous avons ajouté un groupement propargyle soit sur le carbone 1, soit sur le carbone 6, pour obtenir respectivement les composés 1 et 5.



### III.1.3 Synthèse d'une plateforme cyclodécapeptide (RAFT)

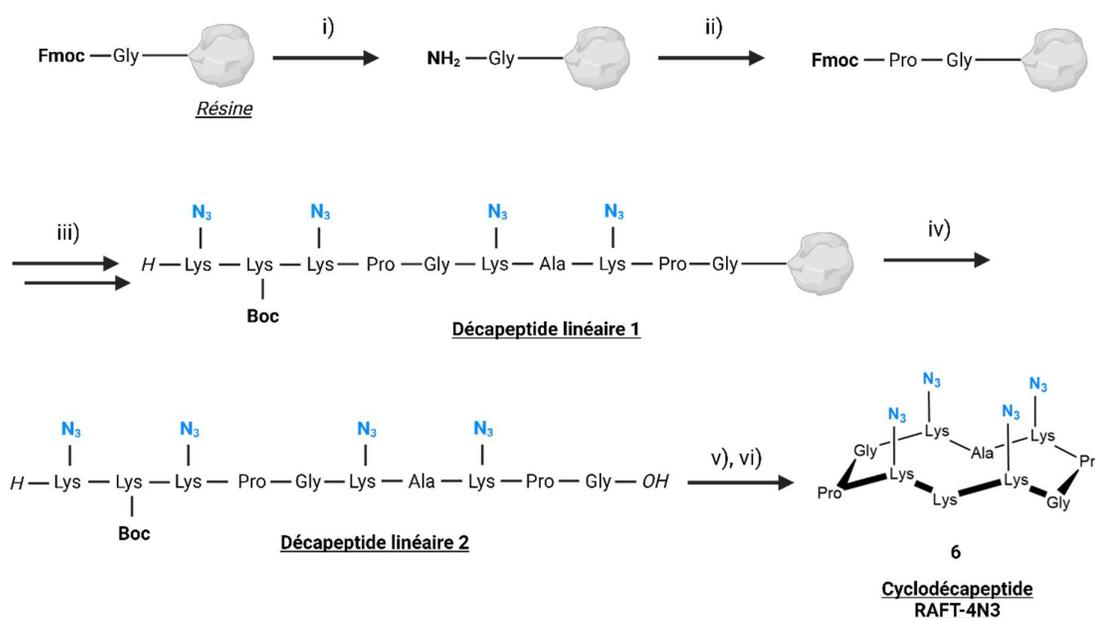
Pour obtenir les glycoconjugués tétravalents, nous avons synthétisé une plateforme cyclodécapeptidique couramment utilisée au sein de notre laboratoire et nommée RAFT. Il s'agit d'un peptide cyclisé, composé de 10 résidus d'acides aminés, qui permet la formation de deux faces avec des chaînes latérales d'acides aminés fonctionnalisables de manière régiosélective. Le peptide linéaire précurseur a d'abord été synthétisé manuellement par la technique de synthèse peptidique sur support solide (SPPS) en stratégie fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc)/tert-butyloxycarbonyle (Boc), dont le principe est détaillé **Figure 77**.



**Figure 77 : Représentation schématique de la procédure de Synthèse Peptidique sur Support Solide (SPPS) stratégie Fmoc/tBu.**

Nous avons utilisé comme support une résine commerciale de SASRIN qui est liée à un résidu de glycine. Alors que l'acide carboxylique de la glycine est lié à la résine, l'amine est quant à elle protégée par un groupement Fmoc. Ainsi, l'élongation du peptide est réalisée *via* une succession de cycles de déprotection de l'amine du premier acide aminé, c'est-à-dire le retrait du groupement Fmoc, suivi du couplage avec le second acide aminé ayant son amine de nouveau protégée par un Fmoc. Les chaînes latérales des acides aminés ajoutés sont quant à elles protégées par d'autres groupements protecteurs dits permanents (GP), en général acido-labiles comme le groupement Boc.

En suivant cette stratégie on obtient la séquence décapeptidique souhaitée comme détaillé dans le **Schéma 3**.

Schéma 3 : Synthèse du RAFT-4N<sub>3</sub> (6).

**Réactifs et conditions :** **i)** DMF / pipéridine (80:20), 2x10 min ; **ii)** Fmoc-Pro-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 45min ; **iii)** DMF / pipéridine (80:20), 2x10 min puis Fmoc-AA-OH (2éq), PyBOP (2éq), DIPEA (4éq), DMF, 45 min ; **iv)** TFA / DCM (1:99), 10x10 min ; **v)** PyBOP (1.2éq), DIPEA (3éq), DCM, 20h ; **vi)** TFA / DCM (50:50), DCM, 15min.

Comme on l'a vu dans la partie III.1.1, ce RAFT doit être composé de 4 azotures (N<sub>3</sub>) pour permettre le greffage de 4 unités de glucose par chimie click. Pour cela des acides aminés de type Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH sont utilisés lors de la synthèse du peptide par SPPS. Les étapes de déprotection des groupements Fmoc sont réalisées grâce à un mélange DMF/pipéridine (80:20 ; **Schéma 3 étape i**). Pour ajouter l'acide aminé suivant, nous réalisons un couplage peptidique PyBOP/DIPEA (**Schéma 3 étape ii**). Ces différentes étapes sont répétées pour chaque acide aminé. Une fois la dernière Lys ajoutée, nous obtenons le **décapeptide linéaire n°1**. Ce peptide est alors détaché de la résine par plusieurs lavages dans un mélange TFA/DCM (1:99 ; **Schéma 3 étape iv**) et la solution est récupérée puis le solvant est évaporé pour obtenir le **décapeptide linéaire n°2** qui est ensuite précipité dans de l'éther diéthylique. La cyclisation du peptide est réalisée dans du DMF par couplage peptidique PyBOP/DIPEA entre l'amine de la première glycine et l'acide carboxylique de la dernière lysine en milieu dilué pour éviter la dimérisation du peptide (**Schéma 3 étape v**). Après évaporation et une nouvelle précipitation, le groupement Boc présent sur l'avant dernière lysine est déprotégé par ajout d'un mélange TFA/DCM (50:50 ; **Schéma 3 étape vi**). On obtient finalement un RAFT-4 azotures (composé **6**) qu'il est nécessaire de purifier par RP-HPLC semi-préparative pour éliminer les différentes impuretés (sels et peptides tronqués notamment) accumulées au cours de ces différentes étapes de synthèse sur support et en solution.

### III.1.4 Synthèse des glycoconjugués monovalents

Les glycoconjugués formés d'une seule molécule de Glc fonctionnalisée à un PEG ont été synthétisés suivant le **Schéma 4**.

La première étape consiste à greffer un azoture sur une chaîne PEG pour pouvoir greffer par chimie click les molécules de glucose propargylées synthétisées plus haut (composés **1** et **5**). A partir d'un PEG dont une extrémité est protégée par un groupement trityle (**7**), nous avons réalisé un couplage entre l'amine libre de l'autre extrémité et un ester activé de l'acide azidoacétique (**8**) afin de greffer un azoture et obtenir le composé **9**. Sur ce dernier composé a été réalisé deux cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC) avec les deux isomères de glucose précédemment synthétisés (**1** et **5**). Pour cette réaction de CuAAC, une solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , de THPTA et d'ascorbate de sodium dans du tampon PBS 1X a été ajoutée à une solution contenant le composé **9** et les composés **1** ou **5** dans un mélange DMF/PBS 1X (50 :50). Le mélange est ensuite dégazé sous argon et agité à température ambiante. Pour éliminer le cuivre résiduel, une résine Chelex® est ajoutée au mélange réactionnel. On libère ensuite l'amine tritylée avec un mélange TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /Triisopropylsilane (TIS) pour obtenir des PEG monoglycosylés (composés **10** et **11**). Finalement de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est greffée sur l'amine de ces composés dans du DMF en milieu basique (pH8) pour obtenir les glycoconjugués glucose monovalent fluorescents finaux (composés **12** et **13**). Ces produits ont finalement été purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse et lyophilisés avec des rendements finaux de l'ordre de 12% pour le composé **12**, et 16% pour le **13**. Ces rendements relativement peu élevés sont dus à la haute polarité de ces composés les rendant difficiles à purifier sans perte avec les paramètres et les conditions utilisées.

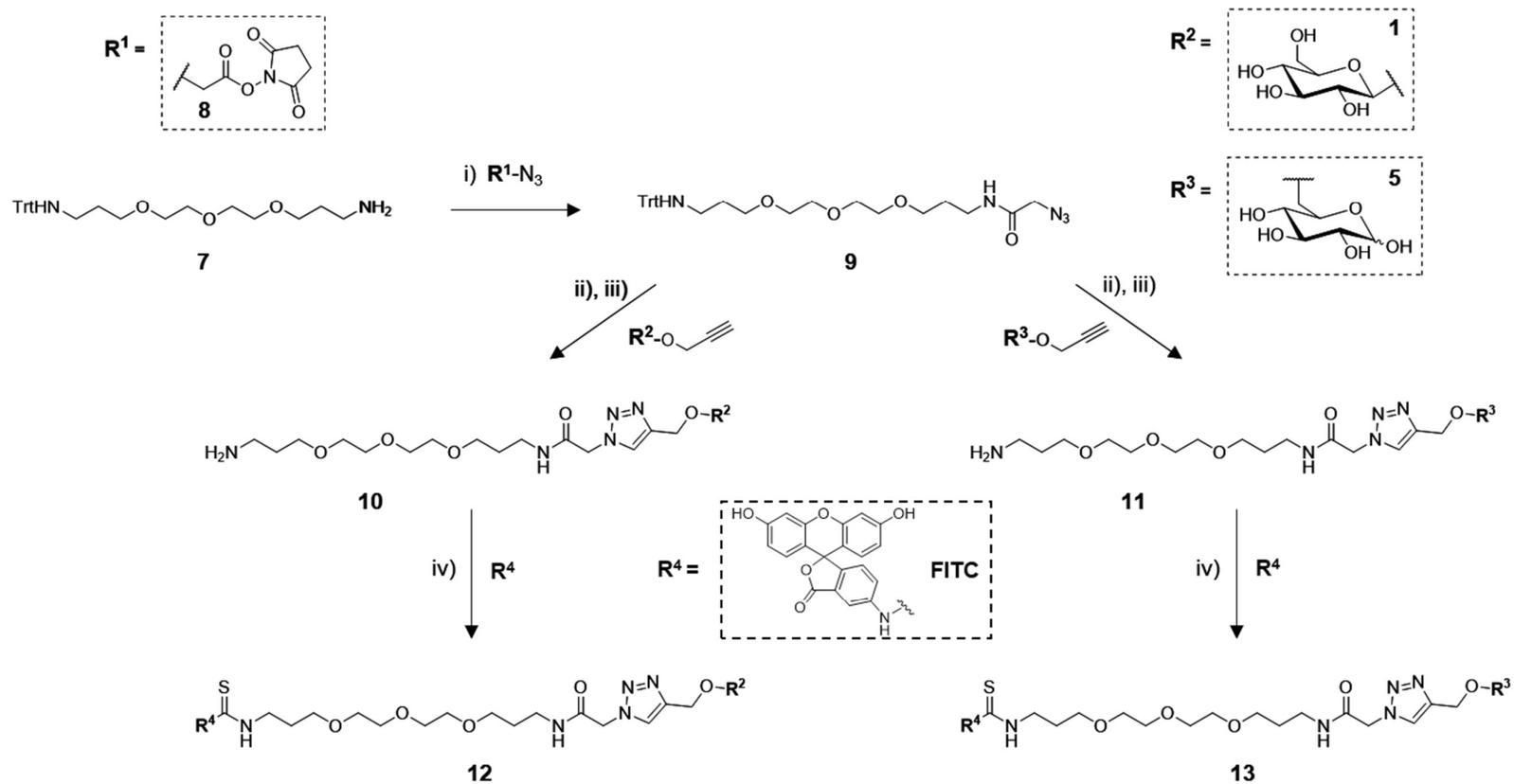
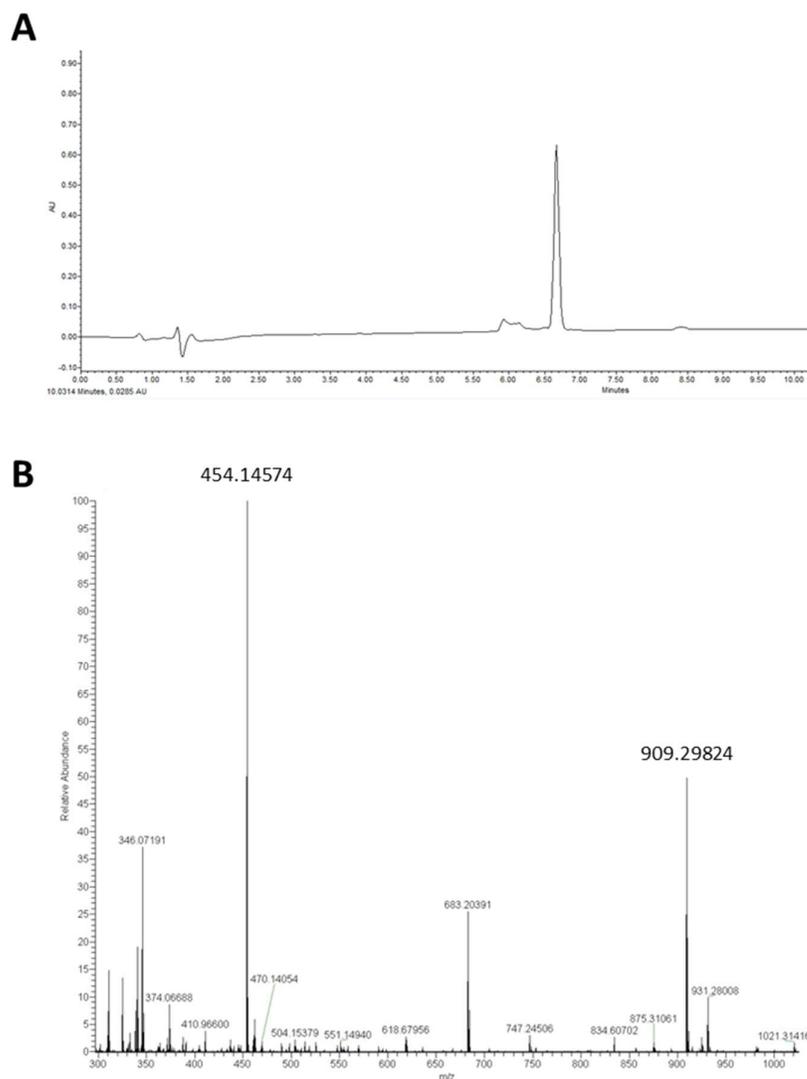


Schéma 4 : Synthèse des glycoconjugués glucose monovalents.

Réactifs et conditions : i) DIPEA, DMF, 1h, 92% pour **9**; ii)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, ascorbate de sodium, DMF/PBS (pH 7.5) (50:50), 1h, 58% pour **10**, 90% pour **11**; iii) TFA (95%), TIS (2.5%),  $H_2O$  (2.5%), 2h; iv) DIPEA, DMF, 30min, 12% pour **12**, 16% pour **13**.

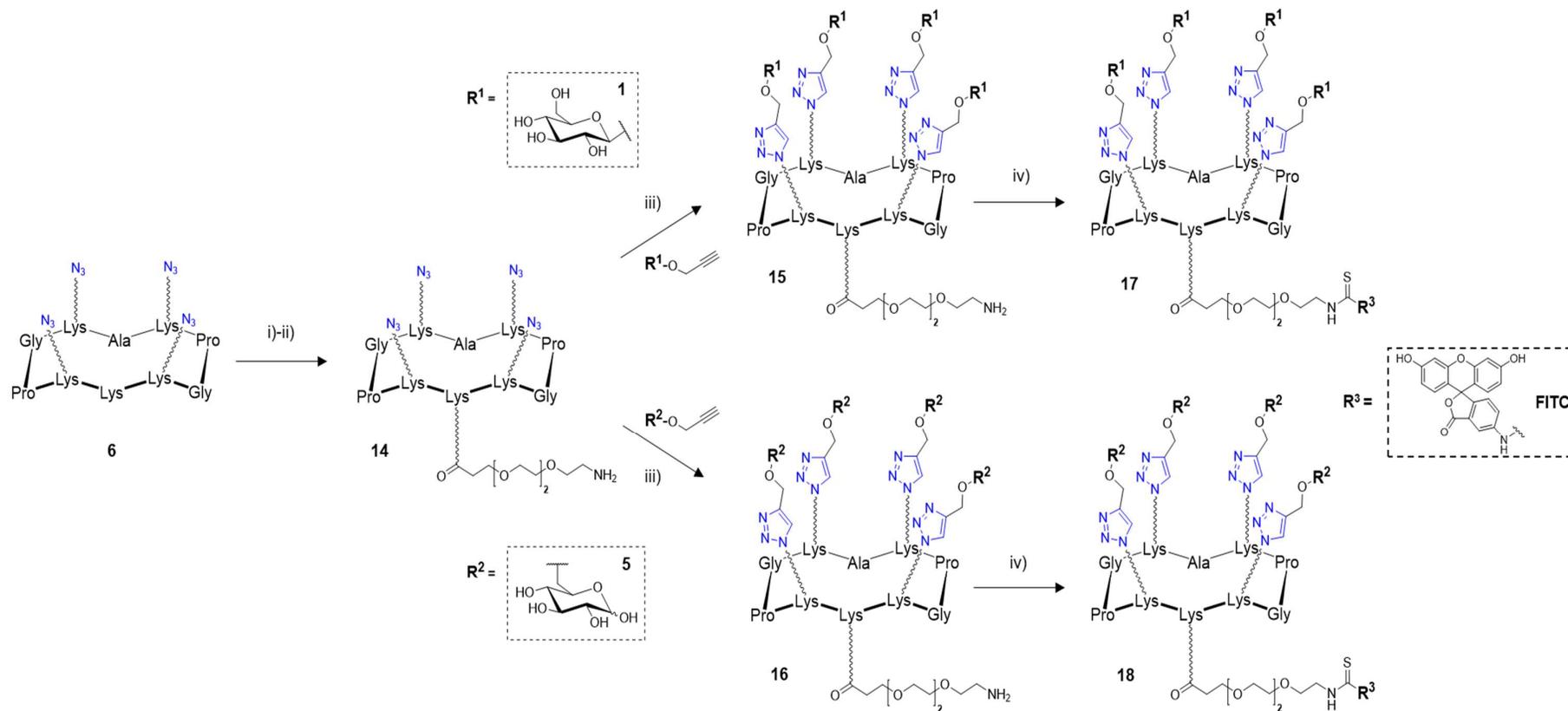
Ces deux composés ont par la suite été caractérisés par UPLC couplée à la spectrométrie de masse. Les UPLC sont réalisées à différents temps et les analyses ont été réalisées avec un suivi UV à 214 nm et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1 % de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H dans l'eau ; solvant B : 0,1 % de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H dans l'acétonitrile). Concernant la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ou ionisation par électronébulisation (ESI), les analyses ont été effectuées sur le plateau de spectrométrie de masse PCN-ICMG du DCM NanoBio à Grenoble. La **Figure 78** montre les profils obtenus pour le composé **13**.



**Figure 78 : A)** Chromatogramme RP-UPLC du composé **13** purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-100% en solvant B ; temps de rétention = 6 min. **B)** Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé **13** purifié. m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 910,3 ; m/z trouvé = 909,30.

### III.1.5 Synthèse des glycoconjugués tétravalents

Les glycoconjugués tétravalents ont été synthétisés en réalisant une réaction CuAAC entre les glucoses propargylés (composés **1** et **5**) et le RAFT-4N<sub>3</sub> (composé **6**) (**Schéma 5**).

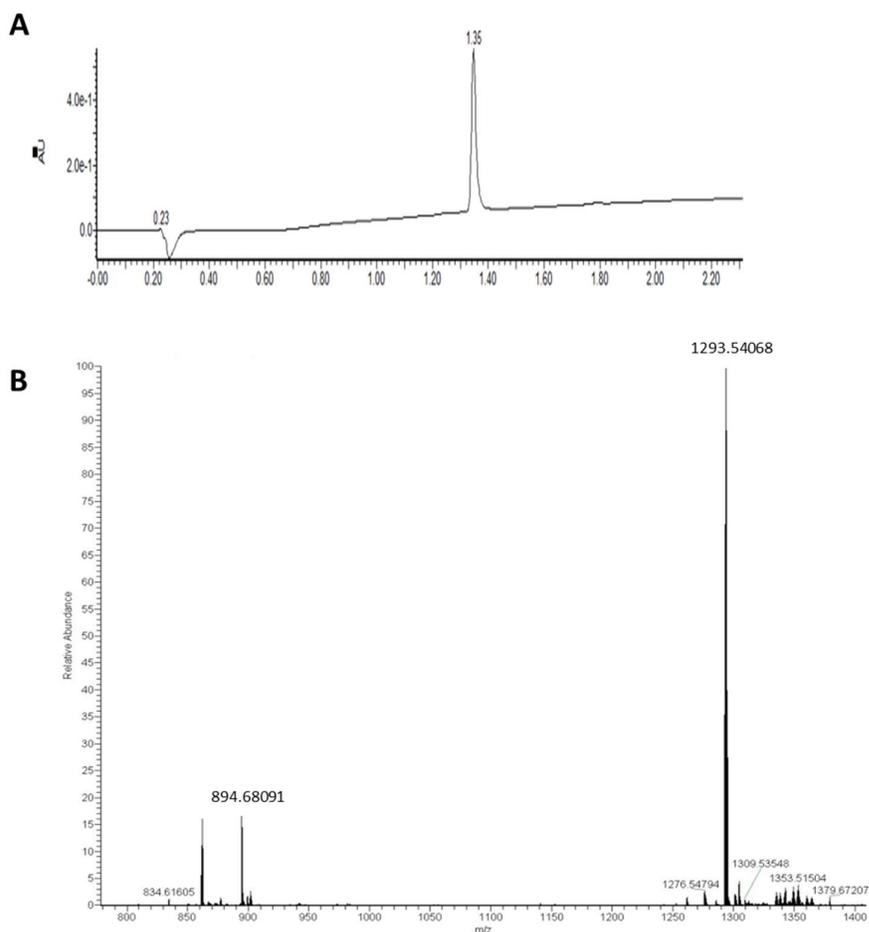


**Schéma 5 : Synthèse des glycoconjugués tétravalents.**

**Réactifs et conditions :** i) DIPEA, DMF, PyBOP, 1h, 93% pour **14** ; ii) DMF / pipéridine (80:20), 20h ; iii)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, ascorbate de sodium, DMF/PBS (pH 7.5) (50:50), 1h, 92% pour **15**, 90% pour **16**; iv) DIPEA, DMF, 30min, 84% pour **17**, 90% pour **18**.

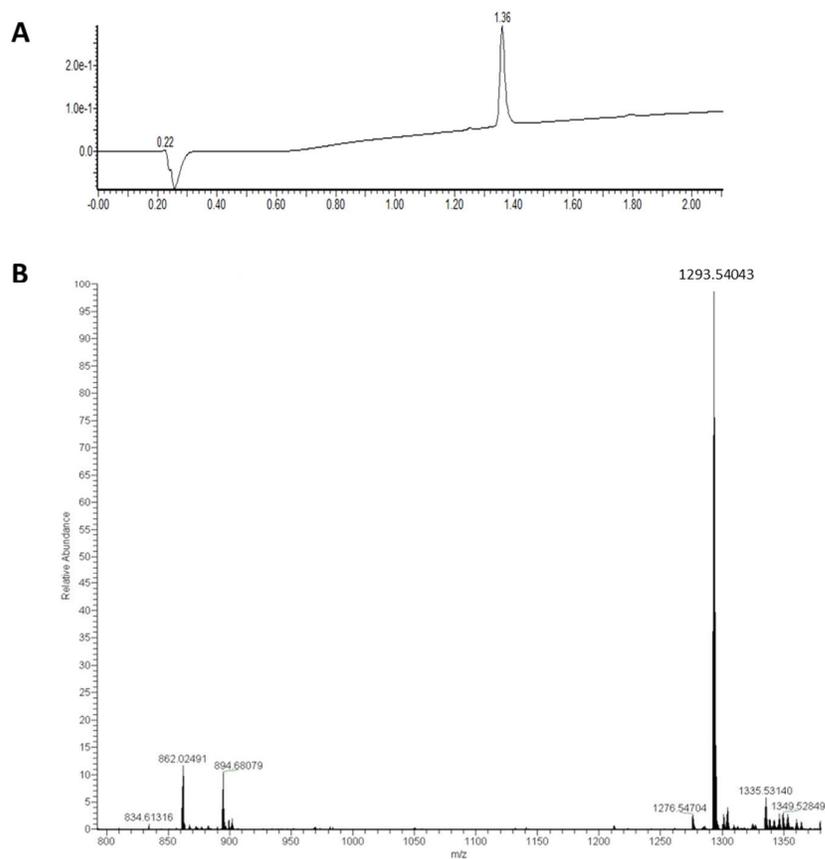
Dans un premier temps, un PEG possédant un acide carboxylique à une extrémité et une amine protégée par un groupement Fmoc a été greffé sur un RAFT-4N<sub>3</sub> par couplage peptidique sur l'amine libre de la lysine présente sur le RAFT. Le groupement Fmoc du PEG est alors déprotégé dans un mélange DMF/pipéridine (80/20) pour obtenir le produit **14**. Les composés (**1**) et (**5**) sont greffés au RAFT là encore par CuAAC dans les conditions décrites précédemment pour obtenir respectivement les composés **15** et **16**. On obtient enfin les glycoconjugués glucose tétravalent fluorescents **17** et **18** comme précédemment par ajout de l'isothiocyanate de fluorescéine sur l'amine de PEG dans du DMF en présence de DIPEA (pH 8).

A l'instar des glycoconjugués monovalents (**12** et **13**), les glycoconjugués tétravalents **17** et **18** ont été purifiés et caractérisés par RP-UPLC et spectrométrie de masse. La **Figure 79** montre le chromatogramme HPLC et le spectre de masse pour le composé **17**.



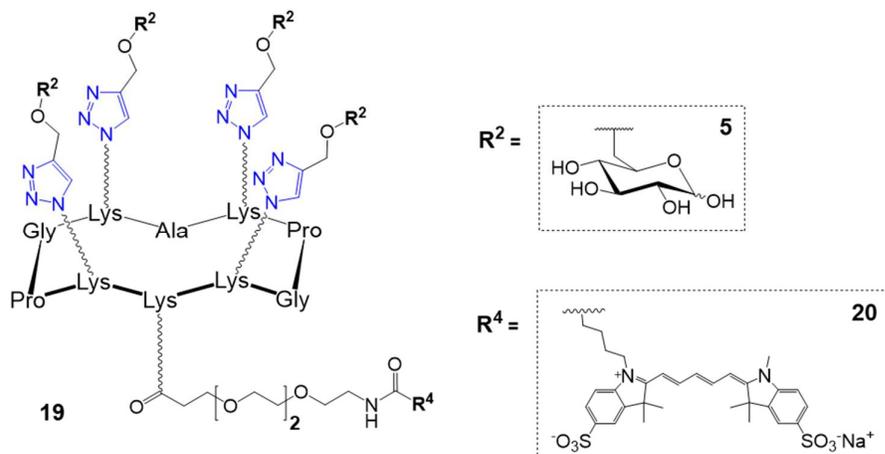
**Figure 79 : A)** Chromatogramme RP-UPLC du composé **17** purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-60% en solvant B ; temps de rétention = 9 min. **B)** Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé **17** purifié. m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08.

La **Figure 81** montre ceux obtenus pour le composé **18**.



**Figure 81 :** **A)** Chromatogramme RP-UPLC du composé **18** purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-60% en solvant B ; temps de rétention = 9 min. **B)** Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé **18** purifié. m/z calculé pour  $[M+H]^+$  = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08.

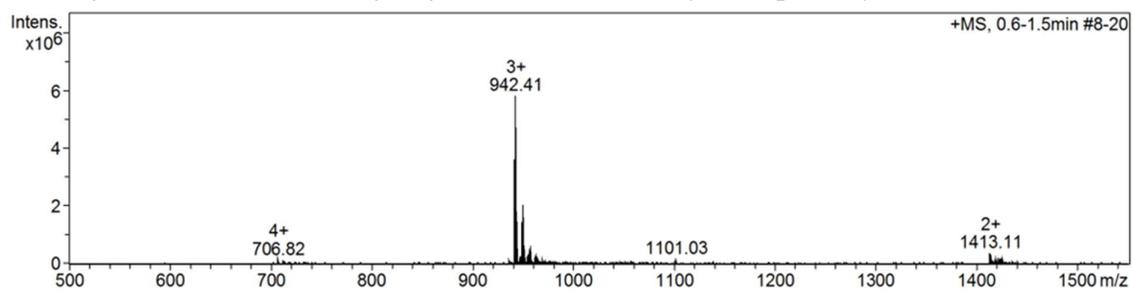
Pour les analyses microscopiques de pénétration cellulaire, et en suivant le même protocole que ci-dessus, le glycoconjugué Glc tétravalent **16** a été en parallèle greffé avec un fluorophore de type cyanine 5 (**20**) à la place de la fluorescéine, pour obtenir le composé **19** (**Figure 80**). En effet la cyanine 5 a été



**Figure 80 :** Structure du glycoconjugué 4Glc-RAFT-PEG-Cya5 (composé **19**).

privilegiée pour les études en microscopie confocale à fluorescence notamment en raison des problèmes de perte de fluorescence induite par photoblanchiment souvent observés avec la fluorescéine [250] [251].

Ce composé **19** a été caractérisé par spectrométrie de masse (ESI ; **Figure 82**).



**Figure 82** : Analyse ESI-MS du composé **19** purifié. m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 2825,07 ; m/z trouvé = 2824,23

## III.2 Etude de l'interaction et de la pénétration cellulaire des glycoconjugués

Comme décrit dans la partie III.1, cinq glycoconjugués ont finalement été synthétisés et seront notés comme ci-dessous par la suite pour faciliter la lecture :

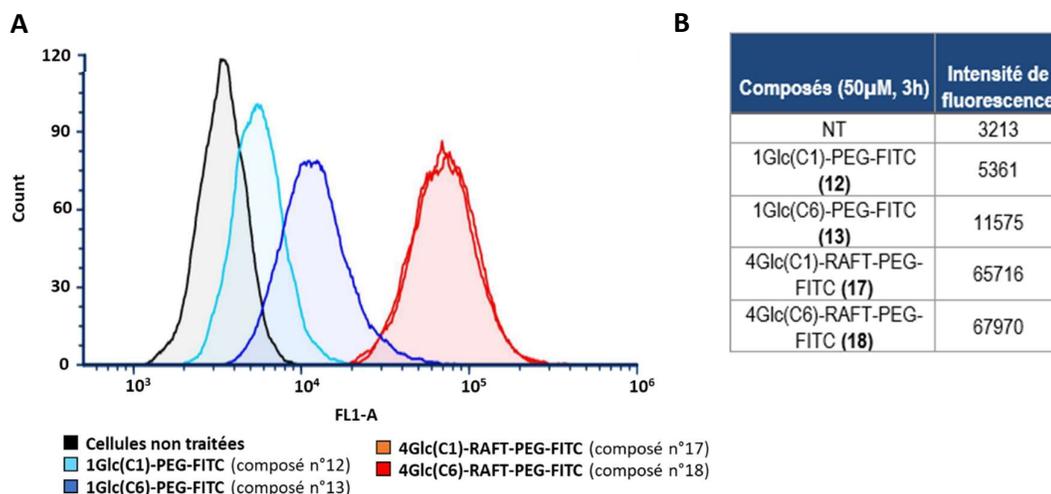
- a) 1 Glc(C1)-PEG-FITC (composé **12**).
- b) 1 Glc(C6)-PEG-FITC (composé **13**).
- c) 4 Glc(C1)-RAFT-PEG-FITC (composé **17**).
- d) 4 Glc(C6)-RAFT-PEG-FITC (composé **18**).
- e) 4 Glc(C6)-RAFT-PEG-**Cy5** (composé **19**).

Dans la partie qui suit nous nous intéresserons à l'évaluation des capacités de ciblage et d'internalisation de cellules cancéreuses par ces composés. Pour cela, des études de cytométrie en flux et de microscopie confocale à fluorescence ont été réalisées.

### III.2.1 Interaction des glycoconjugués avec des lignées cancéreuses pulmonaires

Nous avons étudié, dans un premier temps, les capacités d'interaction des glycoconjugués marqués à la fluorescéine (composés **12**, **13**, **17** et **18**) avec des cellules A549 (adénocarcinome pulmonaire).

Pour cela, les cellules ont été incubées pendant 3 heures avec les composés et analysées par cytométrie en flux (**Figure 83**).

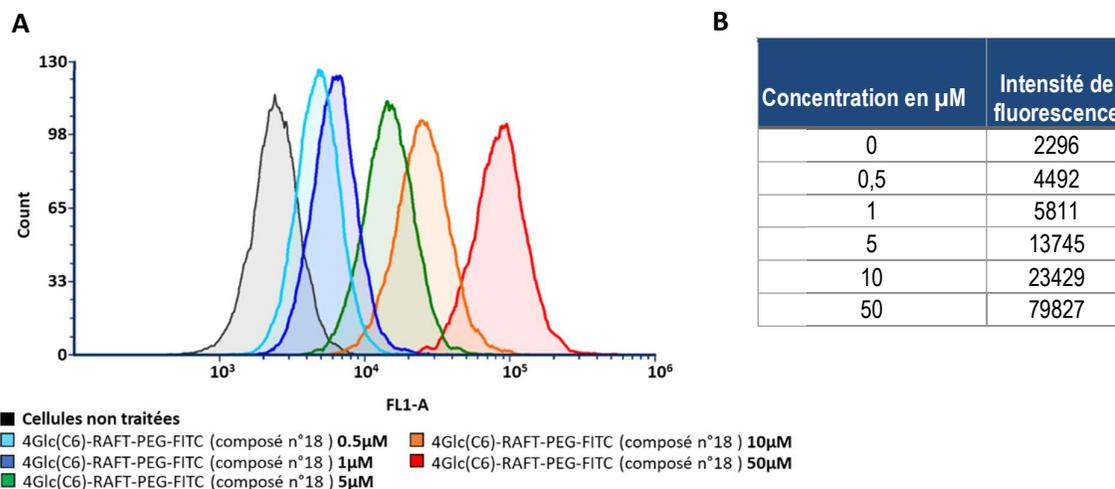


**Figure 83 : Etude de l'interaction des glycoconjugués marqués à la fluorescéine avec des cellules A549.** Incubation avec chaque glycoconjugué 3 h à 50 µM. **A)** Intensités de fluorescence des différents glycoconjugués par analyse en cytométrie en flux. Filtre FL1-A : Emission à 488nm. **B)** Tableau reprenant les moyennes d'intensité de fluorescence par glycoconjugués.

Tout d'abord, on observe que l'intensité de fluorescence de la fluorescéine couplée aux glycoconjugués possédant 4 Glc détectée au niveau des cellules est plus importante que celle des glycoconjugués couplés à un seul Glc. Ceci se voit clairement lorsqu'on compare les moyennes d'intensité (**Figure 83-B**) où l'on passe d'environ 5 000 et 11 000 pour les monovalents, à plus de 60 000 pour les tétravalents. On peut aussi noter un effet de la position de fonctionnalisation du Glc sur l'efficacité d'interaction des glycoconjugués avec les cellules. En effet, le glycoconjugué **13**, fonctionnalisé au niveau du carbone 6, semble mieux interagir avec les cellules, en comparaison avec le composé **12**, où la fonctionnalisation est située sur le carbone 1. Ce constat est tout à fait en adéquation avec les données de la littérature présentées dans la partie introduction (IV.2.2) où il avait été observé que le C6 du glucose n'était pas impliqué dans l'interaction avec le transporteur GLUT1 et où une affinité parfois préférentielle était constatée avec des glycoconjugués fonctionnalisés *via* cette position [208] [212] [215] [216]. Avec les composés multivalents, la position de fonctionnalisation des Glc ne semble pas affecter l'efficacité d'interaction avec les cellules.

Suite à ces résultats, et toujours dans l'objectif d'apporter le meilleur ciblage possible des cellules cancéreuses, nous avons sélectionné le composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG (**18**) comme étant le plus prometteur pour être greffé au nanosystème AuNC/siARN.

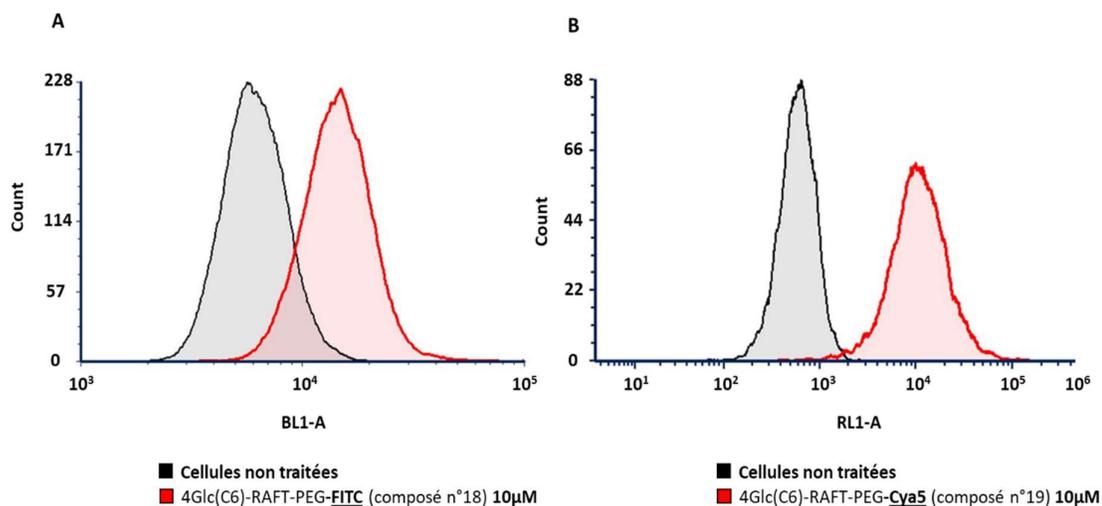
Par la suite, des tests complémentaires ont donc été réalisés sur ce produit **18** seulement dans l'objectif d'affiner les conditions d'utilisation, à savoir les concentrations optimales de ce composé et ses temps d'incubation avec les cellules. La **Figure 84** montre des résultats de cytométrie en flux où le composé **18** a été incubé 3 heures avec des cellules cancéreuses A549 à des concentrations croissantes allant de 0,5 à 50  $\mu\text{M}$ .



**Figure 84 : Etude de l'interaction du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-FITC (18) avec des cellules A549.** Incubation 3 h avec le glycoconjugué à des concentrations croissantes allant de 0,5 à 50  $\mu\text{M}$ . **A)** Intensités de fluorescence du glycoconjugué par analyse en cytométrie en flux. Filtre FL1-A : Emission à 488nm. **B)** Tableau reprenant les moyennes d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en glycoconjugué.

Ce test nous a permis de déterminer qu'avec une concentration du composé **18** de 10  $\mu\text{M}$ , la totalité des cellules présentes dans l'échantillon interagit avec celui-ci. Cette concentration a donc été sélectionnée pour les prochains tests avec ce composé.

Pour évaluer ensuite la capacité de cette molécule à pénétrer dans les cellules, des études de microscopie confocale à fluorescence ont été réalisées avec le composé **19**, qui pour rappel, possède également une configuration 4Glc(C6)-RAFT-PEG mais est marqué à la cyanine 5 moins sensible au photoblanchiment que la fluorescéine [250] [251]. De plus, des études de cytométrie en flux ont été réalisées en parallèle et ont validé que ce composé **19** interagissait tout aussi bien que son homologue avec FITC (**18**) dans des conditions d'utilisation équivalentes (**Figure 85**). En effet, avec les deux composés, plus de 80% des cellules montrent une intensité de fluorescence significative.



**Figure 85 : Comparaison des capacités d'interaction cellulaire des composés 18 et 19 par cytométrie en flux.** Incubation 3 h avec chaque glycoconjugué à 10 µM. **A)** Intensité de fluorescence du glycoconjugué 18 par analyse en cytométrie en flux. Filtre BL1-A : Emission à 488 nm. **B)** Intensité de fluorescence du glycoconjugué 19 par analyse en cytométrie en flux. Filtre RL1-A : Emission à 670 nm.

Les clichés de microscopie confocale à fluorescence (**Figure 86**) ont été réalisés sur des cellules cancéreuses A549 après différents temps d'incubation à 37°C avec 10 µM de composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (**19**) et confirment son internalisation dans les cellules.

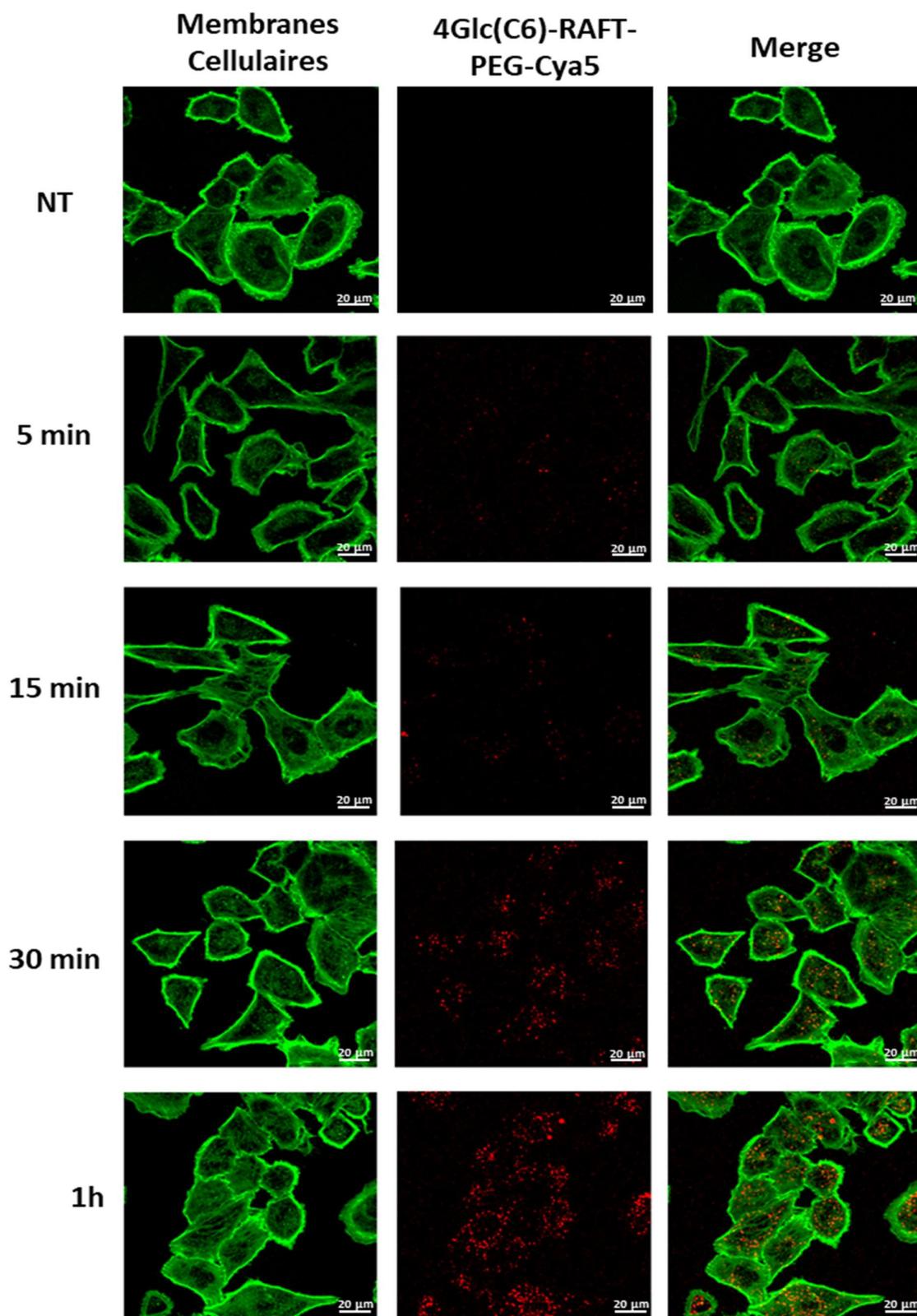
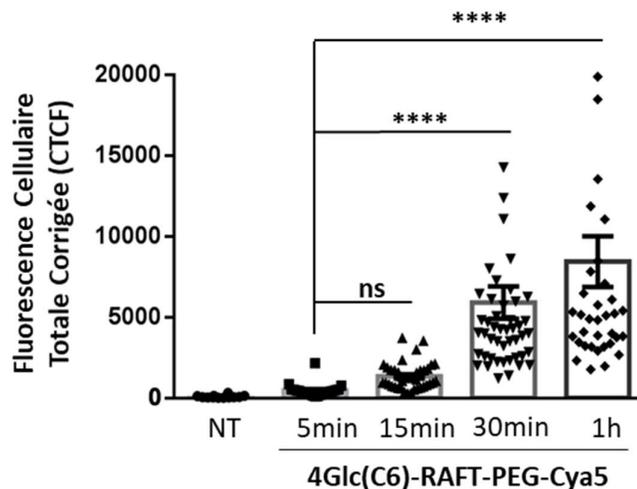


Figure 86 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence représentant l'internalisation du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) incubé pendant 5, 15, 30 min ou 1h dans des cellules cancéreuses A549 à 37°C. Les membranes cellulaires (actine) ont été marquées avec du CellMask ( $\lambda_{em} = 486-617$  nm) et le siARN avec de la cyanine 5 ( $\lambda_{em} = 621-799$  nm).

Des mesures de Fluorescence Cellulaire Totale Corrigée (CTCF ; **Figure 87**) ont également confirmé que l'internalisation du composé **19** augmente en fonction du temps d'incubation et est significative à partir de 15min.

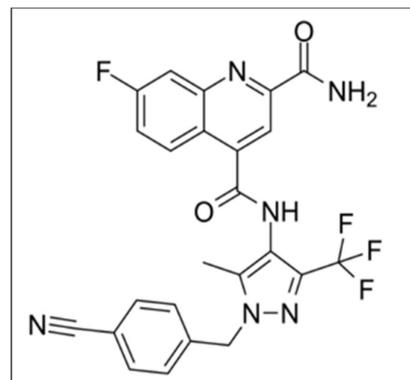


**Figure 87** : Quantification de l'intensité de fluorescence dans des cellules A549 incubées à différents temps avec le composé **4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19)**. Fluorescence Cellulaire Totale Corrigée (CTCF) = Densité intégrée – (Aire de la cellule . Fluorescence moyenne du bruit de fond). Les données exprimées sont la moyenne (+/- SEM) de CTCF quantifiée dans chaque cellule (n=30). Pour les comparaisons statistiques, un test one-way ANOVA a été réalisé ; \* p<0,05, \*\*\*\* p<0,001.

Par la suite nous avons voulu identifier quel était le mécanisme par lequel le composé **4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19)** entrait dans les cellules. En effet, nous avons vu précédemment que l'interaction des glycoconjugués avec les cellules variait en fonction du nombre de Glc portés, ce qui allait dans le sens d'une interaction sucre/transporteur. En revanche, l'internalisation elle-même est-elle dépendante du transporteur ou bien passe-t-elle par un autre mécanisme tel que l'endocytose ?

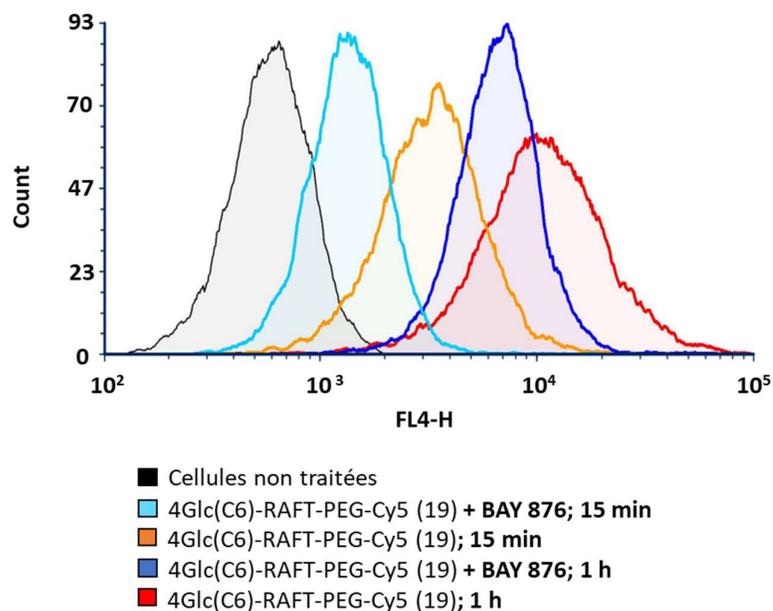
Pour répondre à cette question nous avons réalisé de nouveaux tests en cytométrie en flux et microscopie confocale à fluorescence en utilisant à la fois un inhibiteur du transporteur GLUT1, différentes lignées cellulaires et des conditions expérimentales où les processus d'endocytose sont limités.

L'inhibiteur utilisé est « BAY-876 », représenté **Figure 88**. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif et très sélectif du transporteur GLUT1 [252] surexprimé dans les cancers (IV.2.1). Pour les différents tests réalisés par la suite, les cellules ont été pré incubées 5 minutes à 37°C avec cet inhibiteur avant ajout du glycoconjugué **4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19)**.



**Figure 88** : Structure de l'inhibiteur BAY-876 (496,1 g/mol; IC50 = 2 nM).

Des résultats obtenus par cytométrie en flux tendent à dire que BAY-876 a un effet inhibiteur notamment sur des temps courts d'incubation (15 minutes), où une diminution de l'interaction du glycoconjugué avec des cellules pré-traitées avec cet inhibiteur a été observée contrairement aux cellules non traitées (**Figure 89**).

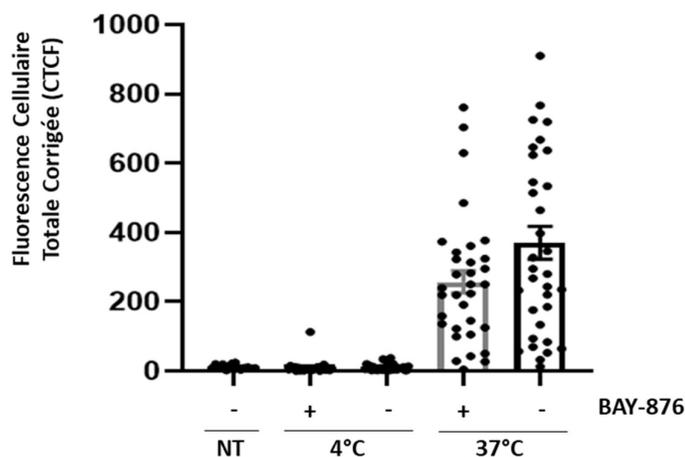


**Figure 89** : Etude de l'interaction du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) avec des cellules A549 en présence ou non d'inhibiteur de GLUT1 BAY-876. Incubation des cellules pré-traitées ou non 5 minutes avec 20  $\mu$ M de BAY-876 puis avec le glycoconjugué 15 min ou 1 h à 10  $\mu$ M.

Suite à ces résultats, on peut supposer qu'une fois au contact des cellules, l'inhibiteur va se fixer aux transporteurs, mais lorsque le glycoconjugué est ajouté dans le milieu, celui-ci va perturber l'interaction de l'inhibiteur et pourra également se lier au transporteur. Après ce constat, les études d'interaction et de pénétration cellulaires avec cet inhibiteur ont surtout été menées sur des temps courts, autour de 15 minutes.

En parallèle, des essais ont aussi été réalisés avec des incubations des cellules à des températures basses (4°C) dans l'objectif de limiter les processus actifs d'endocytose [253] [254].

Les clichés de microscopie confocale à fluorescence **Figure 91** ont été réalisés sur des cellules cancéreuses A549 pré-traitées ou non avec l'inhibiteur de GLUT1 BAY-876 et après 15 minutes d'incubation avec le composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) à 4 ou 37°C. Là encore l'internalisation a été quantifiée par mesure de Fluorescence Cellulaire Totale Corrigée (CTCF ; **Figure 90**).



**Figure 90 : Etude du mécanisme de pénétration du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) dans des cellules A549 par microscopie à fluorescence.** L'intensité de fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) a été quantifiée les cellules A549 incubées ou non (NT) 15 minutes avec le glycoconjugué à 4 ou 37°C et en absence (-) ou en présence (+) d'inhibiteur de GLUT1 BAY-876. CTCF = Densité intégrée – (Aire de la cellule . Fluorescence moyenne du bruit de fond). Les données exprimées correspondent à la moyenne de CTCF quantifiée dans chaque cellule (n=30).

On remarque dans un premier temps l'effet drastique de la température d'incubation sur la pénétration cellulaire du glycoconjugué. En effet, après une incubation de 15 minutes à 4°C, très peu de glycoconjugués sont détectés dans les cellules contrairement aux conditions à 37°C où presque toutes les cellules contiennent du glycoconjugué **19**. Ce résultat suggère une internalisation du glycoconjugué dépendant principalement du mécanisme d'endocytose de la cellule. Avec une incubation des cellules à 37°C, on note une diminution de la fluorescence cellulaire liée au glycoconjugué d'environ 1,8 fois en présence d'inhibiteur du transporteur GLUT1 BAY-876, ce qui suggère également une implication de ce transporteur dans l'internalisation du glycoconjugué.

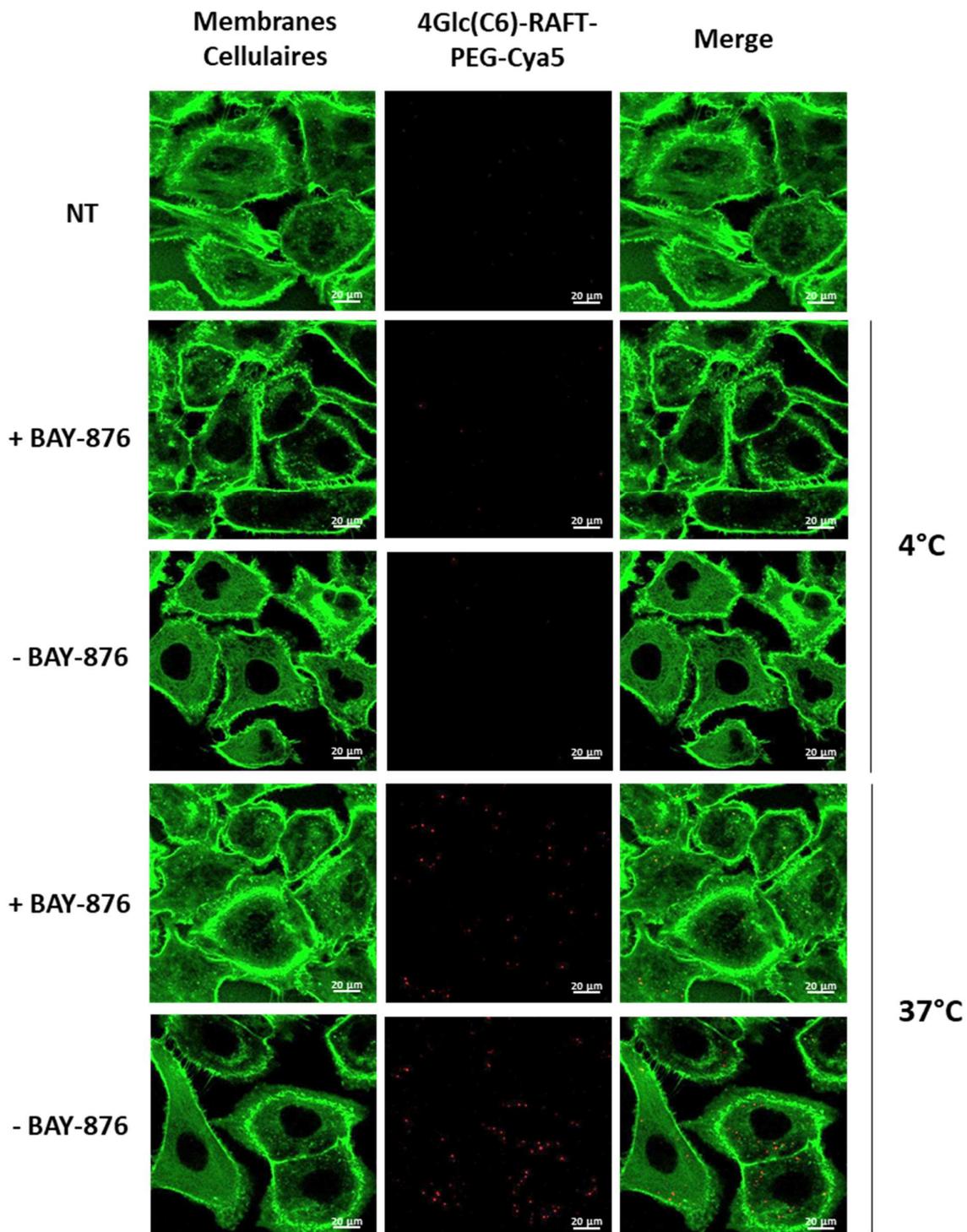
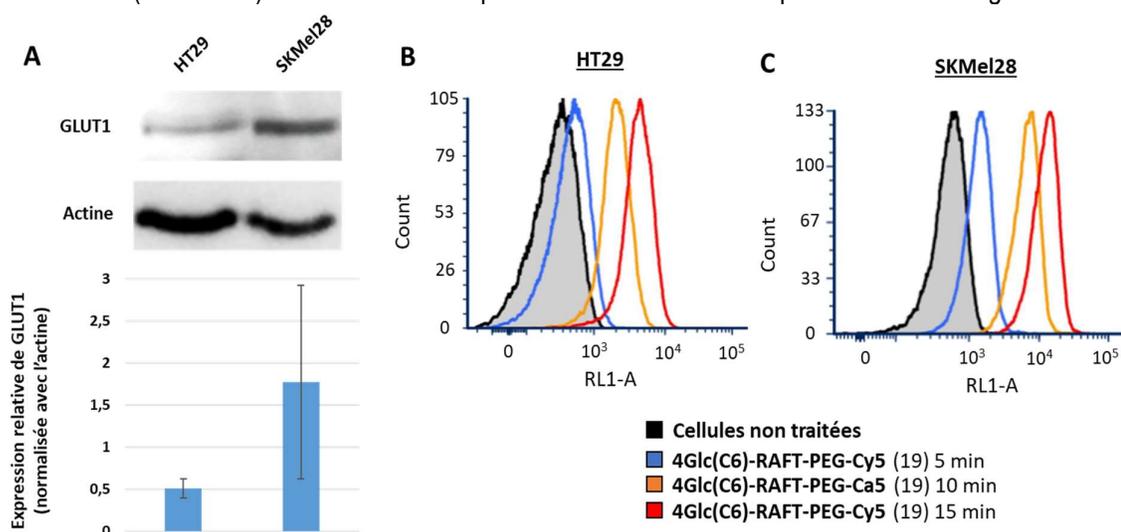


Figure 91 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence représentant l'internalisation du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) dans des cellules cancéreuses A549 après 15 minutes d'incubation à 4 ou 37°C et en absence ou en présence d'inhibiteur BAY-876. Les membranes cellulaires (actine) ont été marquées avec du CellMask ( $\lambda_{em} = 486-617$  nm) et le glycoconjugué avec de la cyanine 5 ( $\lambda_{em} = 621-799$  nm).

Pour aller plus loin dans la compréhension du mode d'internalisation des glycoconjugués, nous avons également mesuré les taux d'expression de GLUT1 à la surface d'autres lignées cellulaires cancéreuses et l'impact sur l'interaction du composé **19**. Plusieurs lignées ont été testées (A549, A375, OVCAR3, HELA, HT29 et SKMEL28) et seules celle exprimant le moins et celle exprimant le plus GLUT1 ont été retenues pour cette analyse. Ainsi, la **Figure 92** représente des résultats où les niveaux d'expression de GLUT1 ont d'abord été estimés par western blot chez deux lignées cellulaires, HT29 (cancer colorectal) et SKMEL28 (mélanome) avant d'évaluer l'impact de l'interaction du composé **19** avec ces lignées-là.



**Figure 92** : Evaluation des taux d'interaction du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (**19**) en fonction du taux d'expression de GLUT1 chez des lignées cellulaires cancéreuses HT29 et SKMEL28. Expressions relatives de GLUT1 chez des lignées HT29 et SKMEL28 déterminées par western blot et normalisées avec l'expression de l'actine (n=3) (**A**). Interaction du composé **19** (10  $\mu$ M) 5, 10 ou 15 min avec les lignées HT29 (**B**) et SKMEL28 (**C**) par cytométrie en flux.

Sur la **Figure 92-A** on voit que la lignée SKMEL28 présente des taux de GLUT1 environ trois fois plus élevés comparés à la lignée HT29. Ceci est tout à fait en cohérence avec le fait que par cytométrie en flux, on observe que le composé **19** semble interagir de manière plus conséquente avec la lignée SKMEL28 qu'HT-29. En effet, après 10 minutes d'incubation, 100% des cellules SKMEL28 interagissent avec le glycoconjugué là où ce n'est pas le cas avec les lignées HT29 où l'on a 100% d'interaction qu'à 15 minutes (**Figure 92-B-C**). Ces résultats semblent aller dans le sens d'une implication des transporteurs GLUTs dans l'interaction préférentielle du composé **19**. Finalement, on peut conclure que dans ces conditions, le composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (**19**) semble pénétrer dans les cellules principalement par des mécanismes d'endocytose. A noter également que l'interaction de ce composé avec le transporteur GLUT1 semble faciliter la cinétique de pénétration cellulaire de ce composé.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de pénétration, il serait intéressant de baisser l'expression des transporteurs GLUT1 dans une population de cellules et de comparer ensuite les taux de pénétration avec une population contrôle. Dans cette optique, des expériences en utilisant des cellules transfectées avec un siARN ciblant GLUT1 ont été initiées.

### III.3 Formation du nanosystème AuNCs/siARNs/ glycoconjugués et étude de l'inhibition de TRF2

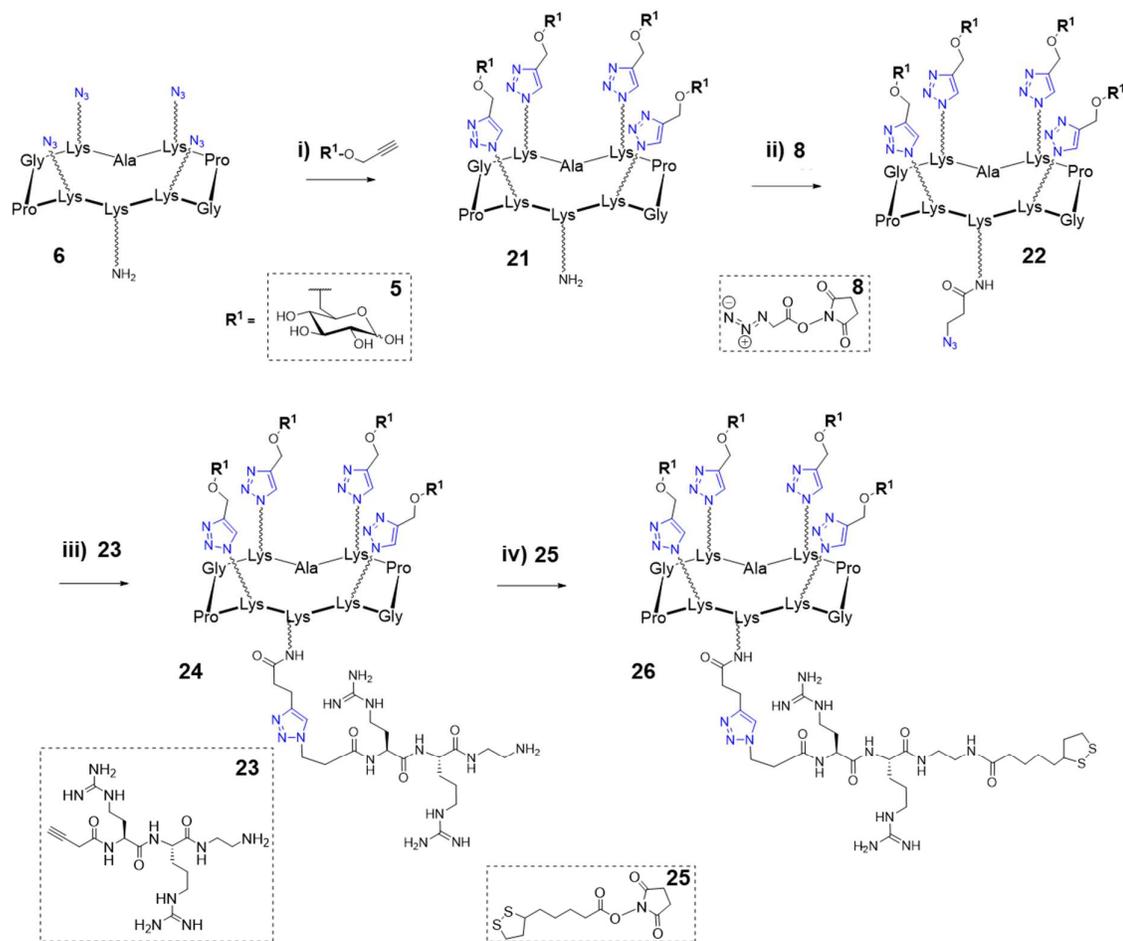
La partie précédente nous a permis de valider qu'un glycoconjugué de type 4Glc(C6)-RAFT-PEG présentait de bonnes capacités d'interaction et de pénétration avec des cellules cancéreuses. Dans cette dernière partie nous allons aborder la manière dont nous avons greffé ce glycoconjugué aux AuNCs pour former un nanosystème AuNCs/siARNs/Glycoconjugués. Nous nous intéresserons ensuite à l'évaluation de ses propriétés physico-chimiques ainsi que sa capacité à délivrer le siARN dans les cellules et inhiber l'expression de TRF2 comme ce qui a été fait dans le chapitre 2 sur les complexes AuNCs/siARNs sans la partie glycoconjuguée.

#### III.3.1 Synthèse et caractérisations du nanosystème AuNCs/siARNs/glycoconjugués

Comme nous l'avons vu dans la partie I.1, pour synthétiser les AuNCs chargés positivement, nous devons utiliser un ligand soufré et ayant une charge globale positive. Ici l'objectif a été de synthétiser des AuNCs avec le glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG comme ligand. Il était donc nécessaire d'apporter à ce glycoconjugué une partie composée d'arginine pour apporter des charges positives et une partie soufrée pour permettre le lien avec l'or et la formation d'un AuNCs/Glycoconjugués.

Pour cela, nous avons synthétisé le composé **26**, dont la synthèse est résumée **Schéma 6**.

De la même manière que pour les glycoconjugués précédents, le composé (**5**) a d'abord été greffé sur un RAFT-4N<sub>3</sub> (**6**) par CuAAC pour obtenir le composé **21**. Par couplage avec un N-hydroxysuccinimide (NHS) modifié (**8**), un bras azoture (N<sub>3</sub>) est ajouté au composé **21** pour obtenir le composé **22**. Les arginines sont apportées par couplage CuAAC avec le peptide **23** qui a été synthétisé manuellement au laboratoire pour obtenir le composé **24**. Les atomes de soufre nécessaires à la liaison avec les atomes d'or sont finalement apportés par un couplage avec un NHS modifié (**25**) pour arriver au produit final **26**, constitué d'un RAFT tétravalent en glucose lié à un cycle disulfure par l'intermédiaire d'une chaîne de deux arginines.

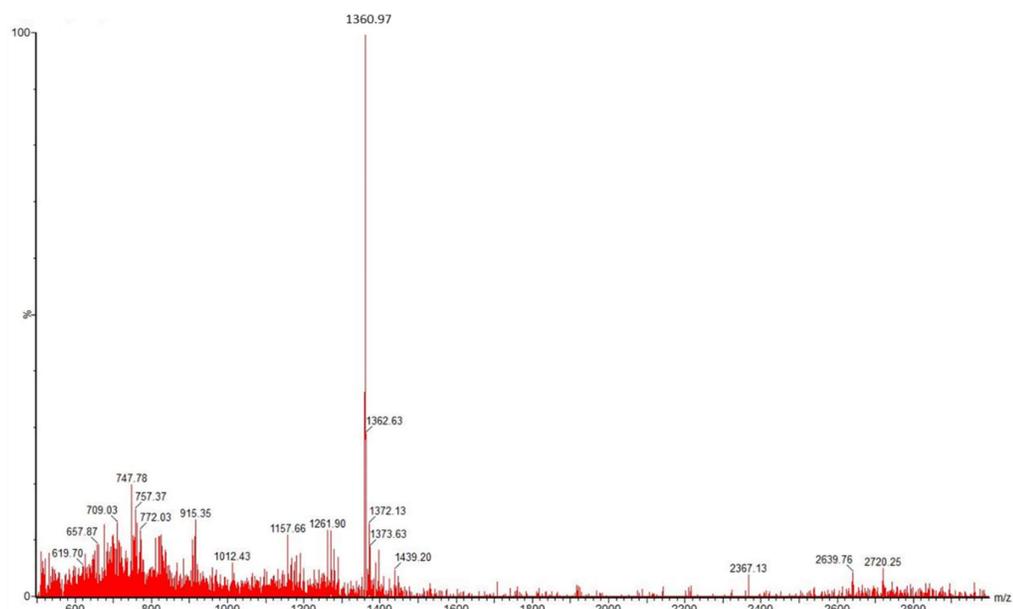


**Schéma 6** : Schéma de synthèse du glycoconjugué glucose tétravalent (**26**, ligand) à greffer sur les AuNCs.

**Réactifs et conditions** : i)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, ascorbate de sodium, DMF/PBS (pH 7.5) (50 :50), 1h; ii) DIPEA, DMF, 30min; iii)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, ascorbate de sodium, DMF/PBS (pH 7.5) (50 :50), 1h. iv) DIPEA, DMF, 30min.

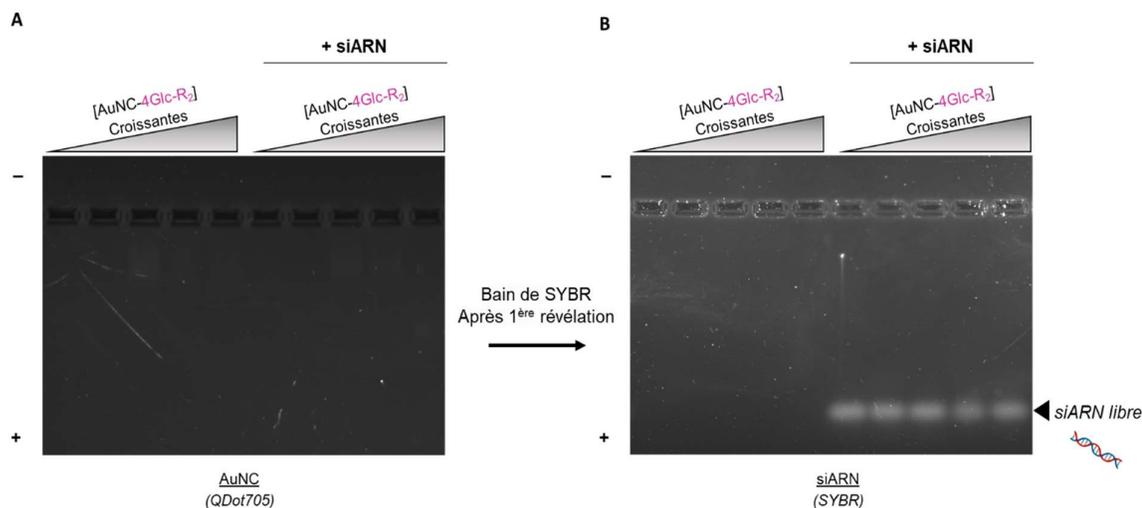
Le choix de greffer 2 arginines a été guidé par les résultats obtenus en II.2, où le AuNC-SG-R<sub>2</sub> présentait des niveaux d'inhibition de la protéine TRF2 un peu plus efficaces qu'avec les autres AuNCs (**Figure 68**).

Ce composé **26** a par la suite été caractérisé et sera noté **4Glc-R<sub>2</sub>** pour faciliter la lecture. La **Figure 93** représente le spectre UPLC-MS du composé **26** (**4Glc-R<sub>2</sub>**) après purification.



**Figure 93** : Spectre UPLC-MS du composé **26** purifié.  $m/z$  calculé pour  $[M+H]^+ = 2720,28$  ;  $m/z$  trouvé = 2719,94.

Une fois ce nouveau ligand obtenu et suivant la procédure de synthèse décrite en I.1, des AuNCs ont donc été synthétisés en utilisant ce composé **26** comme ligand pour obtenir des AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub>. A l'instar des AuNCs-SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>, ces nouveaux AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> ont ensuite été mis en contact avec un siARN ciblant TRF2 (30 minutes dans H<sub>2</sub>O sans RNase) dans l'objectif de former un auto assemblage. La complexation entre les deux molécules a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose où plusieurs quantités en AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> allant de 20 à 200 µg ont été ajoutées à la quantité de siARN précédemment utilisée en transfection (300 pmol, 4,7 µg) (**Figure 94**).



**Figure 94** : Etude de la complexation des siARNs avec des concentrations croissantes de AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde de 705 nm (**A**) et le siARN est observé à une longueur d'onde de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold (**B**). La quantité de siARNs par condition est de 4,7 µg (300 pmol). Les quantités de AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> testés sont de 20, 60, 100, 160 et 200 µg.

Comme précédemment, le gel de gauche représente le signal lié à la fluorescence des AuNCs et celui de droite, celle du siARN marqué avec un intercalant SYBR. De manière plutôt inattendue, les AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> n'ont pas été détectés dans le gel d'agarose, aucun signal lié à la fluorescence des AuNCs n'a été observé. De plus, seul du siARN libre est détecté et aucune complexation entre les AuNCs et le siARN ne semble être observée dans les différentes conditions testées.

Afin de mieux comprendre ces résultats, les AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> mixés ou non à un siARN ont été analysés par mesures de DLS et de Potentiel Zêta (**Tableau 9**).

AuNCs	Charge de surface déterminée par mesure de Potentiel Zêta	Taille déterminée DLS	Indice de polydispersité
AuNC-4Glc-R <sub>2</sub>	-2,1 mV ± 0,5	-	-
AuNC-4Glc-R <sub>2</sub> + <u>siARN</u> Ratio 8:1 (m/m)	-12,3 mV ± 2,3	169 nm	0,21

**Tableau 9 : Mesures de DLS et de Potentiel Zêta des AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> seuls ou avec un siARN anti TRF2.**

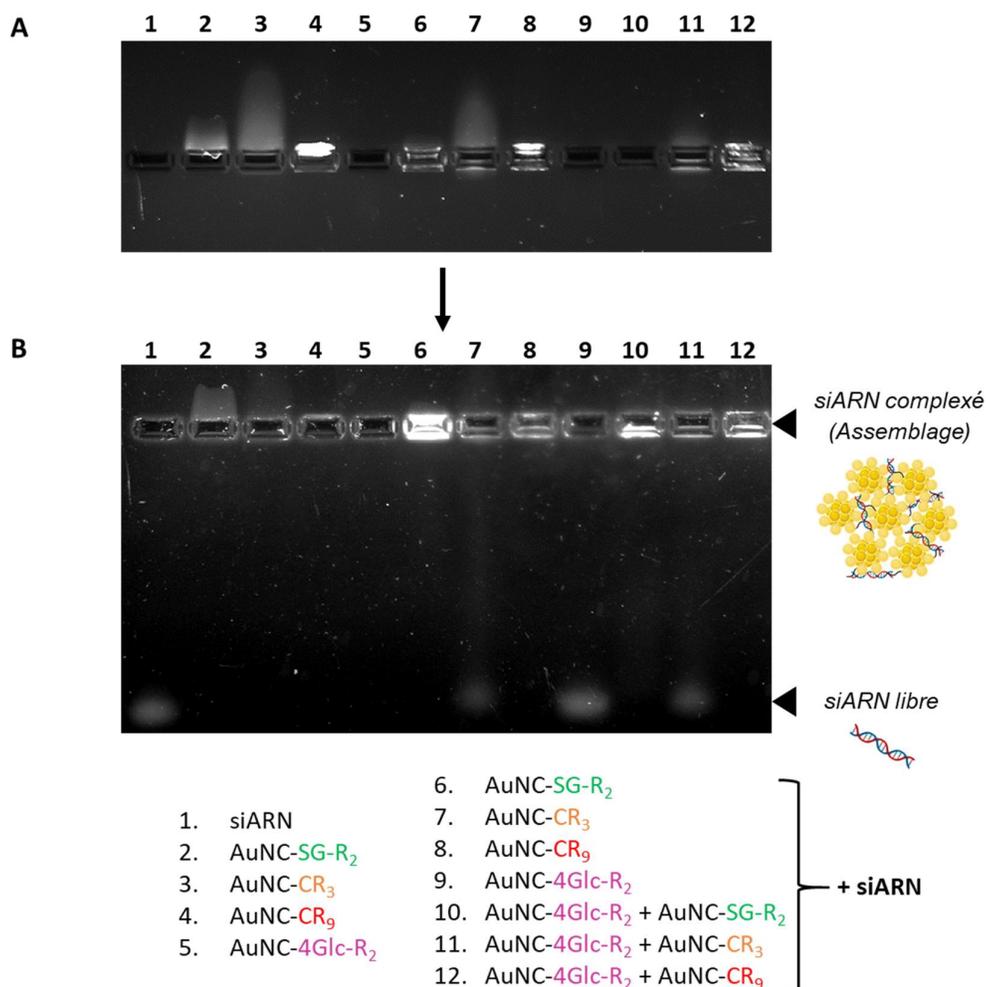
Les mesures montrent que le AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> affiche une charge globale légèrement négative. Mélangé avec un siARN au même ratio de masse que le ligand SG-R<sub>2</sub> le mix est également chargé négativement mais à une taille et un indice de polydispersité similaires aux autres formés avec les SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>, à savoir une taille globalement comprise entre 100 et 200 nm.

Suite à ces dernières mesures, plusieurs hypothèses ont été émises quant aux résultats précédents obtenus par électrophorèse où aucun signal lié aux AuNCs et aucune complexation du siARN n'étaient observés (**Figure 94**) :

1. La complexation avec le siARN ne se réalise pas puisque le AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> a une charge globale négative.
2. La fluorescence liée aux AuNCs est cachée par le ligand 4Glc-R<sub>2</sub> qui se situe à la périphérie des AuNCs et de taille volumineuse (2719,28 g/mol).
3. Les concentrations/ratios de masse utilisés ne sont pas adaptés.

Pour aller plus loin concernant ce AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> et pour examiner l'hypothèse 1, de nouveaux tests ont été réalisés en mixant ce composé avec les autres AuNCs dans l'objectif d'augmenter la charge globale afin de former des assemblages avec les siARNs qui seraient alors constitués de ces deux AuNCs.

Ces différents mix ont ensuite été déposés sur gel d'agarose une nouvelle fois pour évaluer la capacité à former un complexe avec les siARNs (**Figure 95**).



**Figure 95** : Etude de la complexation d'siARN avec les différents AuNCs par électrophorèse sur gel d'agarose (gel 4% ; 45 minutes à 100 V). Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde de 705 nm (A) et les siARNs observés à une longueur d'onde de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold (B).

Sur ce gel, les AuNC-SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> avec ou sans siARN ont bien un comportement attendu, à savoir une complexation avec le siARN. Le AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> seul n'est pas capable de complexer le siARN comme précédemment observé (**Figure 94 ; condition 9**). Cependant, lorsqu'on mixe ce AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> avec un des trois autres AuNCs (AuNC-SG-R<sub>2</sub>, ou AuNC-CR<sub>3</sub> ou AuNC-CR<sub>9</sub>), une complexation avec le siARN est observée (conditions 10, 11 et 12). Cette observation suggère que le complexe obtenu est formé de AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> + un des trois autres AuNCs + siARN, ou seulement d'un des 3 AuNCs (sans 4Glc) laissant les AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> libres, ou soit les deux possibilités de complexes cohabitent ensemble.

Suite à ces constats, la capacité du AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> à délivrer un siARN pour inhiber l'expression de TRF2 dans des cellules cancéreuses n'a été évaluée que *via* la formation de mix avec un autre AuNC pour permettre la complexation du siARN. Des expériences d'évaluation de la survie cellulaire et de la production de dommages à l'ADN sont actuellement en cours.

### III.4 Conclusion chapitre 3

Cette dernière partie de mon projet de thèse a été l'occasion pour moi de synthétiser différents glycoconjugués dans l'objectif de cibler spécifiquement les cellules tumorales surexprimant le transporteur GLUT1. Plusieurs types de glycoconjugués ont été synthétisés afin d'évaluer l'impact de la valence ainsi que la position de fonctionnalisation des molécules de Glc qui les composent sur l'efficacité d'interaction et de pénétration cellulaire dans des cellules tumorales. Le meilleur candidat, c'est-à-dire celui qui avait la meilleure interaction avec les cellules cancéreuses a été sélectionné et greffé aux AuNCs.

Les différents glycoconjugués ont été synthétisés majoritairement par synthèse et couplage peptidique associés à la chimie click. Ils étaient composés d'une ou quatre molécules de Glc, fonctionnalisés *via* leur carbone 1 ou *via* leur carbone 6. Des expériences de cytométrie en flux et microscopie électronique à fluorescence ont permis de montrer que le glycoconjugué formé avec 4 Glc fonctionnalisés *via* leur carbone 6 présentait les meilleurs taux d'interaction et de pénétration dans des lignées cellulaires cancéreuses. Des études réalisées avec un inhibiteur de GLUT1, dans des conditions inhibant les phénomènes d'endocytose ou utilisant des lignées cellulaires exprimant des niveaux variables en GLUT1 nous ont permis de conclure que la pénétration cellulaire de ce glycoconjugué se faisait majoritairement par endocytose. De plus, la disponibilité et les taux de GLUT1 avaient également un impact sur la cinétique de pénétration cellulaire du glycoconjugué. La structure correspondant au glycoconjugué formé avec 4 Glc fonctionnalisés *via* leur carbone 6 a donc été retenue par rapport aux autres pour être ajoutée à la surface de AuNCs.

Pour pouvoir greffer le glycoconjugué sélectionné aux AuNCs, un peptide composé d'un enchaînement de deux arginines (pour apporter des charges positives nécessaires à l'interaction avec le siARN) et un groupement composé de soufre (pour être lié à l'or) a été ajouté au glycoconjugué. Une fois que les AuNCs ont été greffés avec ce glycoconjugué, nommés AuNC-4Glc-R<sub>2</sub>, leur capacité à lier un siARN anti-TRF2 a été étudié. Cependant les résultats obtenus ont montré que, seuls, les AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> ne permettaient pas une complexation efficace du siARN. Cette absence de complexation a été attribuée à la charge globale négative de ces AuNCs. Voulant néanmoins tirer parti de ces nouveaux AuNCs glycoconjugués ayant une capacité de ciblage des cellules tumorales, ceux-ci ont été mélangés avec les AuNCs synthétisés précédemment et capables de se lier au siARN dans l'objectif d'obtenir des complexes hybrides AuNCs/siARN. En réalisant ces AuNCs hybrides, une complexation avec le siARN a finalement été observée et des études de transfection, de survie cellulaire et d'évaluation de la production de dommages à l'ADN ont été initiées

---

## **Discussion et perspectives**



L'objectif de ce projet était de développer un traitement multimodal permettant de lutter contre les mécanismes de radiorésistance activés dans le cadre des cancers pulmonaires à cellules non petites suite à un traitement radiothérapeutique. Un système théranostique radiosensibilisant innovant de vectorisation de siARN via des nanoparticules d'or a été synthétisé et caractérisé. Le siARN utilisé était dirigé contre la protéine télomérique TRF2, dont l'implication dans la radiorésistance des cellules cancéreuses a été démontrée à plusieurs reprises. Les nanoparticules d'or ont été choisies comme vecteurs en raison de leurs propriétés biologiques et physico-chimiques uniques, et en particulier leur effet radiosensibilisant et leur capacité à s'accumuler passivement dans les tumeurs. Dans le but d'apporter une amélioration du ciblage spécifique des cellules tumorales de poumon, nous avons également décidé d'ajouter à ce système des glycoconjugués dans l'objectif de cibler les transporteurs GLUTs surexprimés dans les cellules tumorales. Différentes fonctionnalisations ont été apportées à ce nanosystème afin d'optimiser ses propriétés physico-chimiques et biologiques. Après caractérisation et sélection des nanosystèmes présentant les propriétés les plus intéressantes pour notre projet, leur capacité à inhiber l'expression de la protéine télomérique TRF2 dans des cellules pulmonaires cancéreuses a été analysée. Les conséquences sur la radioresistance cellulaire suite à une irradiation des cellules tumorales traitées ou non avec ces nanosystèmes ont été ensuite évaluées.

Les synthèses chimiques ont été divisées en deux parties : la synthèse des AuNCs et la synthèse des glycoconjugués. Les AuNCs ont été obtenus en utilisant plusieurs ligands peptidiques lors de la synthèse qui ont apporté aux AuNCs des propriétés physico-chimiques différentes. Ces ligands étaient composés d'atomes de soufre permettant la liaison avec les atomes d'or (liaisons Au-S) et d'un nombre croissant d'arginines apportant des charges globales positives aux AuNCs nécessaires pour leur complexation avec du siARN anti-TRF2 par interactions électrostatiques. Concernant les glycoconjugués, le choix s'est porté sur le Glc car celui-ci est le substrat principal du transporteur GLUT1, surexprimés dans les cellules tumorales. Plusieurs configurations de glycoconjugués ont été synthétisées afin de tester l'impact du nombre de Glc (1 ou 4) ainsi que leur position de fonctionnalisation (*via* le carbone 1 ou carbone 6) sur l'efficacité d'interaction spécifique avec des cellules surexprimant le transporteur GLUT1. Ces composés synthétisés ont été également caractérisés au niveau de leurs propriétés chimiques et structurales.

Après synthèse des AuNCs, les conditions expérimentales pour obtenir une complexation totale des siARN dirigés contre TRF2 avec ces AuNCs ont été déterminées. Différentes conditions de ratio de masse AuNCs:siARNs, de quantité de siARN et de charge globale des AuNCs ont été testées en utilisant des techniques de spectroscopie et d'électrophorèse et ont montré que les AuNCs étaient capables de se complexer aux siARNs jusqu'à 100%. La capacité des AuNCs à délivrer le siARN dans les cellules tumorales pour inhiber l'expression de TRF2 a ensuite été étudiée par microscopie confocale à fluorescence. Mes résultats ont montré que le siARN anti-TRF2 a bien été délivré à l'intérieur des cellules

traitées avec les différents complexes AuNCs/siARNs dès 4 heures d'incubation. Suite à des transfections de ces complexes dans les cellules tumorales, les niveaux d'expression relative de TRF2 ont été quantifiés par western blot et une réduction de l'expression allant jusqu'à 60% a été mise en évidence. En parallèle, l'impact de cette inhibition de TRF2 sur l'induction d'une radiosensibilité cellulaire a été évaluée par essai clonogénique et une survie cellulaire plus basse a été observée chez les cellules traitées avec le nanosystème par rapport à celles non traitées.

Concernant les différents glycoconjugués que nous souhaitons ajouter aux AuNCs, ceux-ci ont dans un premier temps été liés à des fluorophores de type FITC ou Cy5. Suite à des études de cytométrie en flux et de microscopie confocale, le glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG a été retenu car il présentait les meilleurs niveaux d'interaction et de pénétration dans des cellules tumorales surexprimant le transporteur GLUT1. Le mécanisme de pénétration se ferait principalement par endocytose et des tests complémentaires seraient nécessaires pour conclure quant à l'implication de GLUT1 ainsi que sur la pénétration des cellules tumorales spécifiquement. Pour greffer ce glycoconjugué sur les AuNCs, la synthèse d'un nouveau ligand a dû être réalisée. Ce ligand était constitué de la configuration 4Glc(C6) liée à un acide lipoïque (composé de deux atomes de soufre pour permettre la liaison l'or) par l'intermédiaire d'une chaîne de deux arginines (apportant des charges positives). Ce AuNC-glycoconjugué a été caractérisé chimiquement et sa capacité à se complexer avec un siARN a été étudiée. Néanmoins, j'ai montré que ce AuNC-glycoconjugué ne permettait pas de lier un siARN par interaction électrostatique à cause de sa charge globale négative. Dans l'objectif d'augmenter la charge globale pour garantir une complexation avec le siARN, ce AuNC-glycoconjugué a été mélangé avec les autres AuNCs composés seulement de ligands arginines formant ainsi un AuNC /siARN hybride. Dans ces conditions, les siARN se complexent avec ces nanosystèmes hybrides. L'étude de l'efficacité d'inhibition de l'expression de TRF2 et de la radiosensibilisation des cellules traitées avec ces complexes hybrides et soumises à une irradiation est en cours.

## **Le choix de l'interférence par ARN comme stratégie d'inhibition**

Pour ce projet de thèse, la technique utilisant l'interférence par ARN a été retenue afin de diminuer l'expression de la protéine TRF2 pour lutter contre les mécanismes de radiorésistance des cellules cancéreuses de poumon. Il existe d'autres outils biotechnologiques permettant de cibler l'expression d'un gène dont les plus connus sont les nucléases à doigts de zinc (ZFNs) ou effectrices et activatrices de transcription (TALEN), et le système CRISPR-Cas.

Les ZFNs sont composées de deux parties. La première consiste en des enzymes de restriction générées artificiellement et résultant en des domaines de liaison à l'ADN à motifs doigts de zinc. Les domaines à doigts de zinc peuvent être modifiés pour cibler des séquences d'ADN spécifiques d'une longueur allant de 9 à 18 paires de bases [255]. La deuxième partie des ZFNs est un domaine de clivage de l'ADN, il s'agit généralement d'une endonucléase nommée Fok1. Fok1 fonctionne en dimère et va reconnaître des séquences 5'-GGATG-3' sur l'ADN cible pour induire un clivage des groupement phosphodiester [256] (**Figure 97-A**).

A l'instar des ZFNs, le système TALEN est aussi composé d'enzymes de restriction possédant des domaines de liaison à l'ADN (appelées « TALE ») et d'un domaine de clivage de l'ADN. Il est possible de concevoir des TALE qui se lient à n'importe quelle séquence d'ADN cible souhaitée en utilisant un domaine de liaison à l'ADN approprié [257]. On retrouve généralement Fok1 comme domaine de clivage de l'ADN, qui est alors fusionné à TALE pour former le système TALEN, ce qui apporte une activité endonucléase formant des cassures double brin de la séquence d'ADN cible [258] (**Figure 97-B**).

Pour le système CRISPR-Cas9, brièvement, il se compose d'un ARN guide simple brin couplé à une endonucléase appelée Cas9. L'ARN guide, généralement de 17 à 20 nucléotides de long, va reconnaître des séquences d'ADN complémentaires qui vont alors être dégradées par l'activité endonucléase de Cas9. En concevant artificiellement la séquence de l'ARN guide, il est possible de cibler les séquences d'ADN souhaitées pour induire la dégradation spécifique de celles-ci (**Figure 97-C**).

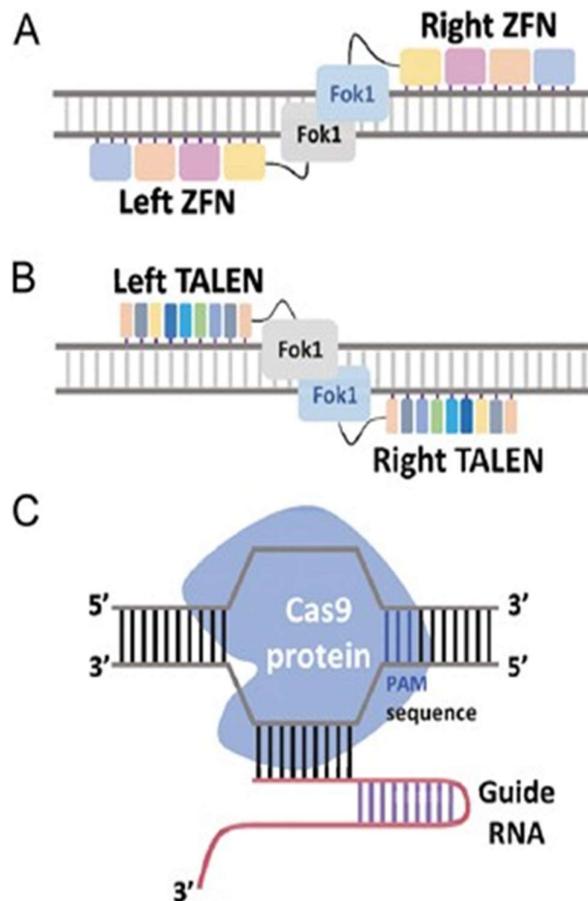


Figure 96 : Illustration du fonctionnement des systèmes ZFN, TALEN et CRISPR Cas9. Issue de Shim et al. 2017.

Ainsi, la première différence notable entre l'utilisation du siARN et les différentes méthodes décrites ci-dessus est que contrairement aux autres, l'interférence par ARN dégrade l'ARNm dans le cytoplasme et non l'ADN. Ceci permet notamment d'étudier les effets fonctionnels qui découlent de la transcription en tant que telle [257]. L'ARNi a un effet hypomorphe, c'est-à-dire qu'elle réduit l'expression du gène sans pour autant l'arrêter de manière permanente, comme c'est le cas pour les autres méthodes. Cette nature réversible de l'ARNi nécessite donc un maintien de l'activité des siARNs au sein de la cellule si l'on veut garder le phénotype inactif, là où ce n'est pas nécessaire avec les autres systèmes étant donné la permanence de la lésion génétique. Le fait que l'inhibition de l'expression du gène avec l'ARNi soit transitoire réduit donc drastiquement les éventuels effets secondaires qui seraient dus à un mauvais ciblage, un ciblage de cellules saines par exemple, ou bien liées à des mésappariements. De plus, l'ARNi est généralement plus facile d'utilisation comparée aux méthodes ZFN et TALEN puisqu'ils ne nécessitent que l'achat ou la synthèse d'ARN à la séquence souhaitée suivie d'une transfection dans les cellules cibles, sans passer par des étapes de conception et de clonage des domaines de liaisons à l'ADN. La taille des siARNs est également très bien adaptée dans le cadre de la formation de complexe et de la vectorisation *via* les AuNCs, là où le système CRISPR-Cas utilise des ARNs plus longs, ce qui pourrait entraver la vectorisation et/ou induire des problèmes de transcription.

## **Intérêt des nanoparticules d'or comparé aux nanoparticules lipidiques pour la vectorisation de siARN**

Les nanoparticules d'or font partie des molécules à fort potentiel thérapeutique et présentent des atouts rivalisant avec ceux des nanoparticules lipidiques (LNPs) largement utilisées notamment pour le transport des ARNm. Les LNPs ont été développées à l'origine comme vecteurs pour les médicaments à base d'ADN. Par la suite, elles ont été de plus en plus utilisées pour l'administration de siARN car elles présentent plusieurs avantages notamment l'encapsulation du siARN, le protégeant des attaques enzymatiques et de l'élimination rénale, mais aussi sa facilité de transport du siARN vers les tissus et cellules cibles (EPR). En effet, nous avons pu l'illustrer notamment en présentant brièvement dans cet ouvrage les traitements Patisiran et Givosiran approuvés par la FDA et connus pour la vectorisation de siARN, tous deux utilisant des LNPs.

Pour ce projet de thèse les AuNPs (NPs de type inorganiques) ont été privilégiées comme vecteurs. Ce choix a été fait à la fois pour pallier certaines limitations des LNPs, pour exploiter pleinement les avantages des AuNPs dans le cadre de thérapie anti-cancer utilisant les radiations ionisantes et finalement pour explorer une nouvelle méthode synergique de vectorisation de siARN. Effectivement comme abordé en partie introduction, malgré leurs nombreux avantages, les LNPs présentent encore quelques limitations notamment en terme de biocompatibilité, de sensibilités aux rayonnements thermiques et électromagnétiques [85], d'insolubilité dans les solvants aqueux [259] et parfois de faibles taux d'encapsulation de la drogue [86] [260]. De plus, bien que l'encapsulation protège l'intégrité du siARN, ceci impacte parfois son relargage dans la cellule *via* notamment des limitations provenant de l'échappement des endosomes où une étape de dégradation de la LNP est au préalable nécessaire [87]. Avec la méthode que nous proposons, nous nous affranchissons de cette étape supplémentaire étant donné que le siARN est directement lié au vecteur par des interactions électrostatiques ce qui rend son relargage moins contraignant. De plus, contrairement aux LNPs, la surface des AuNPs est facilement modifiable chimiquement ce qui permet d'adapter les conditions physico-chimiques du vecteur par rapport à la drogue mais aussi de greffer d'autres molécules d'intérêts notamment pour le ciblage comme nous en avons discuté pour les glycoconjugués. Finalement, l'utilisation des AuNPs permet aussi de profiter de leurs propriétés physiques uniques notamment en ce qui concerne leur effet radiosensibilisant et leur capacité à émettre de la fluorescence dans le NIR pour leur suivi *in cellulo* et *in vivo*.

## Etude plus approfondie de la radiosensibilité cellulaire après transfection avec les nanosystèmes AuNCs/siARNs

Au terme de ce projet de thèse, les AuNCs-SG-R<sub>2</sub> et CR<sub>3</sub> ont finalement été sélectionnés en raison de leur efficacité à réduire l'expression de TRF2 mais aussi de leurs meilleures stabilité et leur absence de toxicité comparé aux AuNCs-CR<sub>9</sub>.

Dans un premier temps nous avons voulu quantifier l'induction de dommages à l'ADN après irradiation dans une population de cellules transfectées avec le nanosystème AuNC/siARN. Pour cela, nous avons cherché à doser la forme phosphorylée de la protéine histone H2AX, un variant de la famille des protéines H2A faisant partie de l'octomère d'histones du nucléosome. En effet, il s'agit d'un bon indicateur des dommages à l'ADN puisqu'en réaction aux coupures double brin, cette protéine H2AX est phosphorylée au niveau de la sérine 139 et constitue la première étape de recrutement et de localisation des protéines de la réparation des dommages de l'ADN. Les niveaux d'expression de  $\gamma$ H2AX ont été quantifiés par western blot dans des populations pré-transfectées ou non avec le nanosystème AuNC/siARN anti-TRF2. Des résultats préliminaires ont montré des niveaux d'expression plus élevés de la protéine  $\gamma$ H2AX chez les cellules transfectées avec les nanosystèmes comparé aux cellules non transfectées et restent à être confirmés par des analyses supplémentaires.

Concernant l'impact des nanosystèmes sur la viabilité des cellules après irradiation, nous avons montré dans la partie 0 que les AuNCs-SG-R<sub>2</sub> favorisaient une baisse de la survie cellulaire. Ces résultats doivent être reproduits et les autres nanosystèmes tels que AuNC-CR<sub>3</sub> doivent également être testés.

Ces résultats sont en corrélation avec des résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire. En effet, l'effet radiosensibilisant des nanoparticules AuNCs-SG-R<sub>2</sub> non complexées à des siARN a été testé dans des cellules tumorales de glioblastome (*Figure 97*).

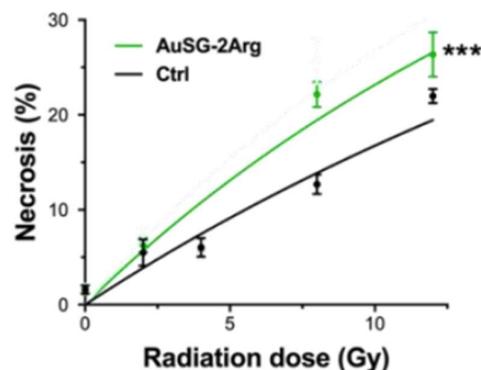


Figure 97 : Amélioration de l'effet radiosensibilisant sur le nombre de cellules tumorales de glioblastome entrant en nécrose après une exposition aux rayons ionisants en présence de AuNCs-SG-R<sub>2</sub>.

L'activité de radiosensibilisation des AuNCs-SG-R<sub>2</sub> a été évaluée par quantification des taux de nécrose cellulaire après exposition à différentes doses de radiation. Une augmentation significative de ces taux de nécrose et dépendante de la dose de radiation appliquée aux cellules a été observée en présence de AuNCs.

Nos résultats préliminaires ont montré que des cellules tumorales de poumon transfectées avec les AuNCs couplés à des siARNs ciblant TRF2 présentaient une radiosensibilité importante comparé à celle des cellules tumorales non transfectées suite à une irradiation.

Afin de compléter l'étude de l'impact des nanosystèmes AuNCs/siARN sur la radiosensibilité des cellules tumorales de poumon, il serait intéressant d'analyser ses conséquences au niveau moléculaire sur la stabilité des télomères. En particulier, une analyse de la formation de cassures double brin de l'ADN au niveau des télomères avant et après traitement des cellules avec les AuNCs permettrait de valider la cible télomérique. La localisation de protéines impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN comme 53BP1 ainsi que la phosphorylation de l'histone H2AX au niveau des télomères pourraient être déterminées par microscopie à fluorescence après immunomarquage et ADN-FISH [261].

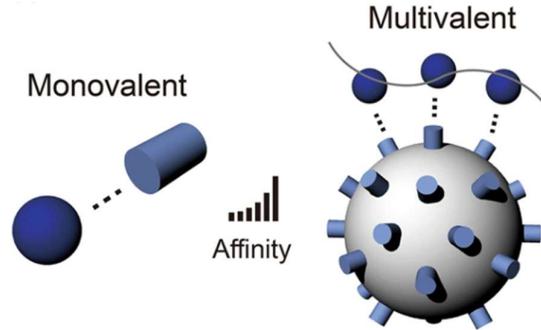
Finalement des tests complémentaires de transfection et d'irradiation avec ces nanosystèmes pourraient être réalisés en utilisant des lignées cellulaires cancéreuses rendues résistantes aux rayons et avec des cellules non cancéreuses, afin d'évaluer l'induction d'une radiosensibilité ainsi que le ciblage spécifique respectivement.

## **Impact de la multivalence sur l'amélioration de l'interaction avec GLUT1**

Au cours des travaux sur l'axe n°4 de ce projet, traitant de la synthèse de glycoconjugués pour améliorer le ciblage tumoral, nous avons pu constater les différences notables d'interaction entre les composés monovalents et les tétravalents en Glc, chacun utilisé dans les mêmes conditions. En effet, les intensités de fluorescence observées en cytométrie en flux étaient constamment plus élevées pour les glycoconjugués tétravalents que pour les monovalents et étaient aussi corrélés à une meilleure internalisation cellulaire.

Cependant, malgré le succès des stratégies de ciblage impliquant la multivalence, l'interprétation au niveau moléculaire n'est pas toujours facile car il dépend fortement de la nature et de la fonction de la protéine ciblée ainsi que de la géométrie du ligand. Elle est globalement attribuée à des effets de concentration locale ou bien de chélation mais elle peut aussi impliquer des mécanismes beaucoup plus complexes [262]. Dans la littérature, cet effet est également connu sous le nom de «Glycoside Cluster

Effect» et il est défini comme un renforcement de l'affinité d'un ligand multivalent pour son récepteur pouvant être modérée ou extrêmement forte selon le mécanisme d'interaction (**Figure 98**) [263] [264].



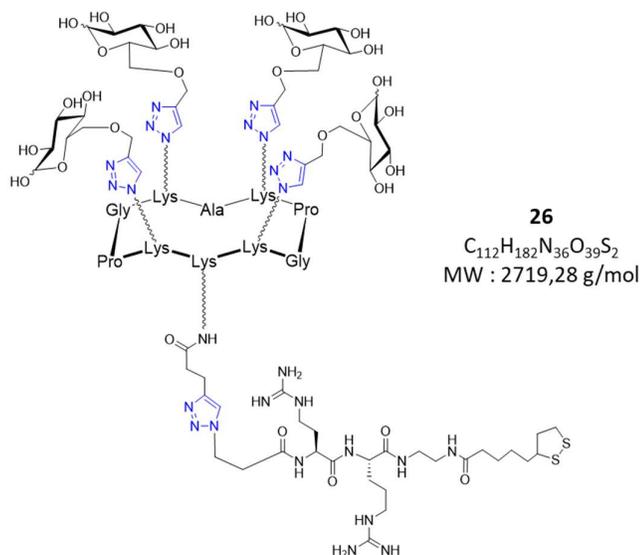
**Figure 98** : Illustration simplifiée représentant la différence d'interaction entre un ligand monovalent et un ligand multivalent. Issue de Jeong et al. 2018.

D'une manière générale, la présence de plusieurs sites de liaison permet des liaisons simultanées fortes si la géométrie du ligand le permet. De plus, au cours du processus de dissociation qui suit la liaison d'un ligand avec son récepteur, ce même ligand peut être de nouveau reconnu par ce même récepteur ou bien par un autre avoisinant, ce qui peut augmenter son temps de rétention à la surface [265].

En ce qui nous concerne, nous pouvons expliquer les différences observées par une plus forte concentration locale de Glc au niveau des transporteurs GLUTs qui fait que, statistiquement, plus de liaisons sucre/transporteur sont réalisées, d'où une amélioration significative du signal des glycoconjugués tétravalents comparé aux monovalents. Cependant, la dynamique d'interaction peut s'avérer complexe à décrire puisqu'il ne s'agit pas de protéines en solution ou d'un récepteur cellulaire comme couramment décrit dans la littérature mais d'un transporteur transmembranaire dont l'impact d'une interaction multivalente est très peu documenté. Une étude intéressante portant sur GLUT1 a toutefois montré sur des érythrocytes humains que le GLUT1 pouvait s'associer en dimère puis en tétramère et présenter de fait plusieurs sites de liaison pour les sucres [266], ce qui peut représenter une autre explication quant à l'augmentation que l'on a observée et fournit une piste à explorer sur la compréhension de l'interaction de glycoconjugué avec ce transporteur.

## Un AuNC-glycoconjugué hybride qui reste à caractériser

Au terme de l'axe 4, une partie glycoconjuguée composée de 4 Glc et d'une chaîne de 2 Arg a finalement été greffée sur des AuNCs. La **Figure 99** rappelle la structure de cette partie glycoconjuguée.



**Figure 99 : Structure du composé 26, glycoconjugué formé de 4Glc(C6)-RAFT-PEG-2Arg-Acide lipoïque, greffé sur les AuNCs au cours de l'axe 4 du projet de thèse.**

Concernant ce AuNC-glycoconjugué (AuNC-4Glc-R<sub>2</sub>) nous ne sommes pas arrivés à détecter la fluorescence liée aux AuNCs ainsi qu'à complexer un siARN par interactions électrostatiques à l'instar des autres AuNCs (SG-R<sub>2</sub>, CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub>). Comme discuté dans la partie résultat, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer ce phénomène :

1. La complexation ne se réalise pas car le AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> a une charge globale négative.
2. La fluorescence liée aux AuNCs est cachée par le ligand 4Glc-R<sub>2</sub> qui se situe à la périphérie des AuNCs et de taille volumineuse (2719,28 g/mol).
3. Les concentrations/ratios AuNCs:siARNs utilisés ne sont pas adaptés pour une complexation.

Concernant l'hypothèse 1, il y a bien présence d'une chaîne composée de 2 Arg sur chaque glycoconjugué qui, comme pour le AuNC-SG-R<sub>2</sub>, suffisent à fournir une charge positive globale nécessaire à la bonne interaction avec un siARN. On peut supposer que l'absence d'interaction proviendrait de la partie 4Glc-RAFT. Il est peu probable que les groupements OH de cette partie présents sur les unités de Glc soient déprotonés dans les conditions utilisées étant donné leur pKa élevé (16). Concernant les acides aminés présents sur le RAFT, ceux-ci ne possèdent pas de groupements chargés sur leurs chaînes latérales et il est aussi peu probable qu'ils interfèrent avec la charge globale du composé.

Pour l'hypothèse 2 il serait intéressant de compléter les résultats par des études d'analyse élémentaire ou de microscopie afin de visualiser l'arrangement spatial de ces AuNCs ainsi que leurs niveaux de colocalisation avec les glycoconjugués. Ces derniers pourraient « cacher » aussi bien la fluorescence émise par les AuNCs que les charges positives apportées par les AuNCs empêchant ainsi le siARN de se complexer.

Au niveau de l'hypothèse 3 l'absence de complexation AuNCs/siARNs pourrait être due à un mauvais choix dans les concentrations ou les ratios AuNCs:siARN trop faibles ou non adaptés dans les conditions testées. Une analyse plus complète testant un plus grand nombre de conditions expérimentales est donc nécessaire.

Finalement, le fait d'avoir utilisé ce AuNC-4Glc-R<sub>2</sub> en combinaison avec les AuNC-SG-R<sub>2</sub> et CR<sub>3</sub> (partie III.3.1) a permis la formation d'un complexe avec le siARN. De plus, des résultats préliminaires utilisant ces complexes hybrides ont montré une diminution de la survie cellulaire après irradiation chez les cellules transfectées avec ces complexes comparé aux cellules non traitées. Néanmoins, l'interprétation et la conclusion de ces résultats obtenus ne sont pas aisées puisqu'à ce stade nous ne sommes pas en mesure de déterminer quelle est la contribution de chaque AuNC utilisés dans ces mix, et surtout si les complexes formés sont bien composés du AuNCs-4Glc-R<sub>2</sub> et non pas seulement des deux autres. Là encore des études complémentaires telles que de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) ou de la microscopie électronique pourraient nous aider à identifier respectivement la composition élémentaire et la structure de ces tous nouveaux AuNCs

### **Pharmacocinétique et biodistribution du nanosystème AuNC/siARN *in vivo***

Afin de valider les résultats obtenus *in vitro* sur les effets radiosensibilisants du nanosystème créé, la mise en place d'expériences *in vivo* représente les perspectives à moyen terme. En ce qui concerne la capacité d'internalisation par les cellules et de réduction de l'expression de TRF2, l'assemblage AuNCs-SG-R<sub>2</sub>/siARNs serait le candidat le plus prometteur pour une injection par voie intraveineuse ou intratumorale dans des souris immunodéficientes (nude) préalablement xénotreffées avec des lignées cancéreuses A549. Dans un premier temps, une imagerie non invasive de fluorescence infrarouge serait réalisée à différents moments afin de contrôler la distribution, la pharmacocinétique et les voies d'élimination du nanosystème après administration systémique chez la souris. L'absence de toxicité aiguë sur les souris pourra également être vérifiée en parallèle. Par la suite, l'accumulation de l'assemblage AuNCs/siARNs dans les principaux organes pourrait être mesurée par imagerie de fluorescence *ex vivo* et par spectrométrie de masse. Les résultats ainsi obtenus pourraient fournir une base solide pour initier

d'autres essais thérapeutiques basés sur l'administration de AuNC couplé à un siARN anti-TRF2 chez des souris avec des tumeurs NSCLC orthotopiques, combinées à la radiothérapie.

La mise en place de ce genre de test est largement maîtrisée au sein de notre laboratoire notamment avec la proximité de la plateforme animale « OPTIMAL » de l'IAB à Grenoble dirigée par le Dr. Véronique Josserand. Cette plateforme a déjà travaillé sur des expérimentations animales en utilisant des AuNCs et fournirait une assistance efficace pour cette étape. La **Figure 100** illustre une étude *in vivo* sur des modèles murins présentant des tumeurs cancéreuses xénotreffées en sous-cutanée et en orthotopique qui a permis de démontrer la capacité de AuNC-SG-R<sub>2</sub> à s'accumuler passivement (EPR) dans des cellules cancéreuses avec des accumulations faibles dans les organes d'élimination tels que les reins et le foie.

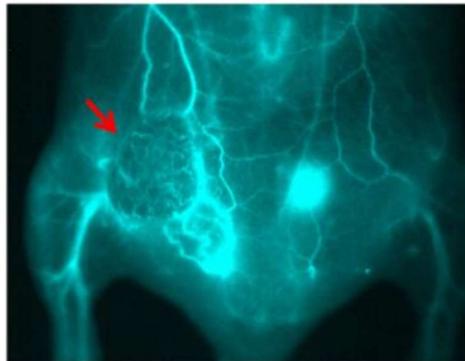


Figure 100 : Imagerie SWIR d'une souris avec une tumeur du sein implantée en orthotopique après injection intraveineuse de AuNCs-SG-R<sub>2</sub> (200  $\mu$ L ; 300  $\mu$ M).  $\lambda_{exc}$ . 808 nm ;  $\lambda_{em}$ . =1250-1700 nm.

## L'utilisation de siARNs pour le ciblage d'autres protéines d'intérêt

Dans ce projet de thèse, la protéine TRF2 a été désignée comme cible pour lutter contre les mécanismes de radiorésistance des cellules tumorales. En tant que protéine du complexe shelterin, elle a un rôle essentiel dans la stabilisation de la boucle-T et dans le maintien de l'intégrité des chromosomes suite à une exposition à des radiations. Bien que très importante, TRF2 n'est pas la seule cible envisageable et d'autres protéines peuvent être de bonnes candidates pour cibler la réponse télomérique protégeant la cellule des effets des irradiations. Nous avons notamment pu discuter de l'importance d'autres protéines impliquées dans la protection de l'intégrité chromosomique telles que TPP1 et POT1, et nous pourrions tout à fait envisager l'utilisation de siARN dirigé contre ces protéines à la place ou bien même en combinaison de celui dirigé contre TRF2. En effet bien qu'ayant des séquences nucléotidiques variables en fonction du gène à cibler, les propriétés physico-chimiques (tailles et charges notamment) des siARNs restent toutes relativement proches et sont donc tout à fait compatibles dans le cadre d'une vectorisation par nos AuNCs ce qui met en avant la flexibilité et l'adaptabilité de notre système à différentes cibles biologiques.

## **L'utilisation du nanosystème AuNCs/siARNs pour le traitement des patients**

L'objectif à plus long terme de ce projet est d'utiliser les AuNCs complexés à des siARNs ciblant la réponse télomérique dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse multi-modale innovante et aux effets synergiques chez le patient. En effet nous avons pu voir que le rôle des AuNCs est multiple car ils servent : i) d'agents de transfection pouvant apporter une protection à la dégradation enzymatique des siARNs anti-TRF2, ii) de sondes optiques pour le suivi non-invasif et en temps réel du traitement, et iii) d'agents radiosensibilisants.

Ce système possède des propriétés qui sont tout à fait adaptées pour une évolution vers des traitements cliniques, et à ce jour, aucune étude n'a examiné l'association de la radiothérapie utilisant des AuNCs transportant des siARN ciblant la réponse télomérique.

Effectivement, l'utilisation des AuNCs comme transporteurs de siARN présente des avantages car la structure et la taille des AuNCs peuvent être ajustées avec précision afin de relever le défi de l'acheminement et de la protection du siARN vis-à-vis de la dégradation cellulaire. En terme de formulation, leur excellente biocompatibilité et leur solubilité dans des solutions physiologiques sont tout à fait adaptées pour des injections intraveineuses ou intratumorales. Une autre approche prometteuse d'administration envisagée serait l'utilisation de l'aérosolisation (ou nébulisation) qui consiste en l'administration de NPs sous forme microgouttelettes en utilisant des injecteurs à haute pression [267]. De plus, nous avons vu que ces nanosystèmes pouvaient être détectés par fluorescence dans les larges fenêtres spectrales NIR et SWIR facilitant ainsi leur suivi dans l'organisme. L'augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales due au dysfonctionnement des télomères mais également à la propriété de radiosensibilisation des AuNCs devraient permettre de minimiser les effets secondaires souvent associés à la radiothérapie grâce à une baisse de la dose de rayons X administrée chez un patient atteint de cancer du poumon.

En ce qui concerne les limitations éventuelles de notre stratégie, nous pouvons envisager que malgré l'induction d'une radiosensibilité accrue en complément des traitements radiothérapeutiques, des cellules cancéreuses peuvent subsister et finir par reformer une tumeur maligne après la fin de des traitements. De plus, les télomères (et TRF2) étant également importants pour les cellules normales, il existe aussi un risque de cytotoxicité si le ciblage spécifique des cellules cancéreuses n'est pas satisfaisant. A noter cependant que des données rapportées dans la littérature révèlent une plus forte résistance au ciblage des télomères dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses [268], ce qui réduit la toxicité systémique. De plus, la focalisation du faisceau de rayons X sur les organes porteurs de la tumeur peut

permettre de réduire ces risques. Finalement le caractère réversible de l'action du siARN permet également de limiter dans le temps l'impact d'effets secondaires de ciblage non spécifique.

► Pour conclure, les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau nanosystème capable de transfecter *in vitro* des siARNs ciblant la réponse télomérique et de rendre plus radiosensibles après irradiation des cellules tumorales traitées. Cette étude offre par la suite de belles potentialités *in vivo* et a permis le développement d'une approche novatrice basée sur la multi-modalité de traitements thérapeutiques contre le cancer du poumon.

---

# Partie expérimentale



## 1. Synthèse des nanoparticules d'or

La plupart des produits chimiques utilisés pour cette partie provient de Sigma-Aldrich (France). Les peptides *SG-R<sub>2</sub>* (Gly-Cys-Glu-Arg-Arg ; 619,71 g/mol), *CR<sub>3</sub>* (Cys-Arg-Arg-Arg ; 589,76 g/mol) et *CR<sub>9</sub>* (Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg ; 1526,97 g/mol) ont été préparés par GenScript (Pays-Bas) avec un degré de purification >95%. Les synthèses ont été réalisées en utilisant de l'eau ultra pure.

Les nanoclusters d'or AuNC-*CR<sub>3</sub>* stabilisées avec 25%<sub>vol</sub> de glutathion (SG) et 75%<sub>vol</sub> de peptide *CR<sub>3</sub>* sont synthétisées en utilisant un ratio molaire Au / Ligand / NaBH<sub>4</sub> = 1 / 2 / 0.0125. Brièvement, les peptides *CR<sub>3</sub>* et SG sont mélangés dans 3 mL d'eau puis 96 µL d'une solution de chlorure d'Au(III) hydratée (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O) à 20 mM sont ajoutés sous agitation à 500 rpm. Le pH a ensuite été ajusté à 9 avec une solution d'NaOH 1 M avant l'ajout goutte à goutte de 24 µL d'une solution fraîchement préparée de NaBH<sub>4</sub> 1 mM, le tout gardé sous agitation pendant 30 min. Finalement le pH est baissé jusqu'à 2 *via* addition d'HCL 1 M et la solution est laissée sous agitation à 350 rpm pendant 4 h supplémentaires. Après cela, la solution subit une précipitation dans un mélange eau / éthanol (ratio volume 30 / 70) puis trois lavages avec des filtres Amicron de 3 kDa sont effectués afin d'ôter les produits résiduels et récupérer les AuNPs passant à travers le filtre. Cette solution de AuNC-*CR<sub>3</sub>* est ensuite lyophilisée et stockée à 4 °C avant utilisation. Le même protocole est utilisé pour la préparation de la solution de AuNC-*CR<sub>9</sub>*. Les AuNC-*SG-R<sub>2</sub>* et AuNC-SG (contenant 100%<sub>vol</sub> de SG) ont été préparées comme décrit dans le protocole [226].

## 2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin d'évaluer la mobilité électrophorétique des AuNCs complexées ou non avec les siARNs, des expériences d'électrophorèse sont réalisées sur gel d'agarose à 4 %, préparé dans un tampon composé de tris(hydroxyméthyl) aminométhane 0,2 M et de glycine 2 M dilués dans de l'eau ultra pure ajusté à pH 7 avec de l'HCl 1 mM. La complexation des siARNs aux AuNCs à différents ratios de masse et la formation d'auto assemblage se fait dans l'eau sans RNase à pH 7, pendant 30 min à température ambiante. Avant dépôt dans le gel, 2 µL d'une solution de glycérol sont ajoutés à 20 µL de solution de AuNCs (2 mg/mL). Finalement, 20 µL de ce mix sont déposés dans les puits du gel. La migration est réalisée avec le même tampon tris-glycine et avec un équipement BioRad PowerPac HC à 100 V pendant 45 min. Pour visualiser le signal émis par les AuNCs, une première révélation du gel est faite avec un appareil BioRad Chemidoc avec une excitation allant de 350 à 633nm (filtre infrarouge proche QDot705). Le même gel est ensuite incubé dans une solution de SYBR Gold (Invitrogen) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du tampon de migration pendant 30 min sous agitation douce à température ambiante et une seconde révélation est réalisée avec le même appareil afin de visualiser cette fois ci les bandes liées aux siARNs.

### 3. Mesure de Potentiel Zêta et diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de Potentiel zêta et de DLS ont été réalisées *via* un Zetasizer (Malvern Panalytical) au CERMAV de Grenoble. Les mesures ont été faites à chaque fois en triplicats, à 25 °C, en utilisant l'eau comme dispersant (indice de réfraction = 1.33 et viscosité = 0,89 mPa).

### 4. Mesures optiques

Les spectres d'absorbance des AuNPs ont été mesurés de 200 à 900 nm avec un spectrophotomètre UV-visible Lambda 650 (PerkinElmer).

Concernant les spectres de fluorescence des AuNPs, les mesures sont faites avec un spectrofluoromètre FS 5 (Edinburgh Instruments) entre 470 et 870 nm ( $\lambda_{exc} = 450$  nm).

### 5. Culture cellulaire et transfection de siARN anti TRF2

Les lignées A549 (cellules épithéliales d'adénocarcinome pulmonaire ; ATCC CCL-185) ont été maintenues dans du milieu de culture RPMI (Gibco-Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé et gardées à 37 °C en atmosphère humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les lignées HT-29 (cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal ; ATCC HTB-38) ont été maintenues dans du milieu de culture McCoy's (Gibco-Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé et gardées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les lignées SK-Mel28 (mélanome ; ATCC HTB-72) ont été maintenues dans du milieu de culture DMEM (Gibco-Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé et gardées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de  $1 \cdot 10^5$  cellules par puits. A environ 50 % de confluence, le milieu de culture est retiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture OptiMEM (Gibco-Life Technologies). En parallèle, 300 pmol de siARN anti TRF2 (Eurogentec ; 5'-CGGCUUUCUUUCCACAGAAU-3') ou siARN contrôle luciférase (Eurogentec ; 5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUA-3') sont mixés avec les AuNPs à différents ratios de masse. La complexation des siARNs aux AuNPs et la formation d'auto assemblage se réalisent dans 200  $\mu$ L d'eau sans RNase à pH 7, pendant 30 min à température ambiante. Les produits de Lipofectamine RNAiMax (ThermoFischer) ou d'INTERFERin (Polyplus) sont utilisés en guise de contrôles positifs de transfection et sont mixés aux siARNs selon les protocoles des fournisseurs. Les solutions de transfection sont ensuite ajoutées goutte à goutte dans chaque puits et les cellules sont incubées pendant 4 h à 37 °C. Finalement,

2 mL de milieu de culture RPMI 10% SVF sont ajoutés dans chaque puits et les cellules sont réincubées à 37 °C. Après 24h une deuxième dose du mix de transfection réalisé dans les mêmes conditions est ajoutée aux cellules qui sont alors laissées 24 h supplémentaires à 37°C. Chaque condition a été réalisée à minima trois fois lors de manipulations indépendantes.

## 6. Cytotoxicité

Les cellules A549 sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de  $8 \cdot 10^4$  cellules par puits. A environ 30-50 % de confluence, le milieu de culture est retiré de chaque puits et remplacé par 90µL de AuNCs, préalablement filtrés avec des filtres stériles PVDF de 0,22 µm (Perkinelmer), dilués dans du milieu de culture à des concentrations allant de 25 à 100 mg/mL. Après 72h d'incubation à 37°C, 10µL de réactif PrestoBlue (Invitrogen A13262) sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée 3h supplémentaires à 37°C. Le signal d'absorbance lié à la réduction de la résazurine en résorufine fluorescente est finalement mesuré dans chaque puits à 570 nm en utilisant 600 nm comme longueur d'onde de référence avec un lecteur de plaque Tecan.

## 7. Western Blot

Les protéines totales ont été extraites des cellules après transfection avec les complexes AuNCs/siARNs et quantifiées en utilisant un kit Micro BCA (Thermo Fisher). Brièvement, 40 µg d'extraits protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10 %. Après leur migration dans un tampon de migration (Tris-Glycine-SDS) ils sont électrotransférés pendant 1 heure à 100V sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) préalablement activée avec de l'éthanol 96 %. La membrane est ensuite saturée avec un mélange TBS 1X Tween20 lait 5% et incubée toute la nuit à 4 °C avec un anticorps primaire anti TRF2 (souris, monoclonal ; Novus NB100-56506) ou anti  $\gamma$ H2AX (lapin, polyclonal, Abcam AB11174). Après trois lavages de 10 min avec du TBST 1X la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à de la peroxydase de raifort (HRP) ciblant les IgG de lapin. Après ajout du substrat ECL (BioRad) de la HRP, le signal correspondant au produit de la réaction catalysée par la HRP est détecté à l'aide d'une caméra Vilber (Fusion FX) et quantifiée avec le logiciel ImageJ.

## 8. Microscopie confocale à fluorescence

Pour les études des auto-assemblages AuNCs-siARN et 24h avant l'expérience,  $1 \cdot 10^5$  cellules sontensemencées dans des lamelles Nunc Lab-Tek 4 puits (ThermoFisher; 155383). Le lendemain, le milieu de culture est retiré et remplacé par 500 µL de milieu de culture OptiMEM (Gibco-Life Technologies). En parallèle, 300 pmol de siARNs ciblant la luciférase marqué avec de la Cyanine 5.5 sont mis en contact avec les AuNCs à différents ratios de masse AuNCs : siARNs, 8 :1 pour le AuNC-SG-R<sub>2</sub>, 5:1 pour le

AuNC-R<sub>3</sub> et 3:1 pour le AuNC-CR<sub>9</sub>. La complexation des siARNs aux AuNPs et la formation d'auto assemblage se réalisent dans 200 µL d'eau sans RNase à pH 7, pendant 30 min à température ambiante. Les réactifs Lipofectamine RNAiMax (ThermoFischer) ou INTERFERin (Polyplus) sont utilisés comme contrôles positifs de transfection et mixés aux siARNs selon les protocoles des fournisseurs. Les solutions de transfection sont alors ajoutées goutte à goutte dans chaque puits et les cellules sont incubées 4 h à 37 °C. Par la suite le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) 1X (Gibco-Life Technologies). Les membranes cellulaires sont visualisées par marquage de l'actine au CellsMask Green (ThermoFisher) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 15 min à 37°C dans du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol (Gibco-Life Technologies). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldehyde 4 % (Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS 1X pendant 10 min à 37 °C et lavées trois nouvelles fois au PBS 1X. L'internalisation cellulaire des complexes AuNCs/siARNs est visualisée en utilisant un microscope Zeiss LSM7 Live (dynamscope) équipé de lasers qui excitent à 405, 488 et 561 nm à l'objectif x64 sous immersion (huile). La quantification de la fluorescence est réalisée avec le logiciel ImageJ.

Pour les études sur les glycoconjugués et 24h avant l'expérience,  $1.10^5$  cellules sontensemencées dans des lamelles Nunc Lab-Tek 4 puits (ThermoFisher; 155383) en utilisant un milieu de culture pauvre en glucose (DMEM, Gibco-Life Technologies, 1 g/L D-Glc). A environ 70 % de confluence, le milieu de culture est retiré et les cellules sont incubées avec les glycoconjugués mono- ou tétravalents fluorescents dilués dans du milieu de culture à une concentration finale de 10 µM et à différents temps d'incubation. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X (Gibco-Life Technologies) et les membranes cellulaires sont marquées avec du CellsMask Green (ThermoFisher) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol (Gibco-Life Technologies). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldehyde 4 % (Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS 1X pendant 10 min à 37 °C et lavées au PBS 1X. L'internalisation cellulaire des glycoconjugués fluorescents est visualisée en utilisant un microscope Zeiss LSM7 Live (dynamscope) équipé de lasers qui excitent à 405, 488 et 561 nm à l'objectif x64 sous immersion (huile). La quantification de la fluorescence est réalisée avec le logiciel ImageJ.

## 9. Irradiation et test clonogénique

Des quantités croissantes de cellules A549 préalablement transfectées avec des AuNCs-siARN ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Après adhérence des cellules, celles-ci ont été irradiées à des doses croissantes d'irradiation allant de 0 à 10 Grays. L'irradiation des cellules est réalisée à l'Etablissement Français du Sang (EFS, La Tronche). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant une durée équivalente à au moins six divisions cellulaires (environ deux semaines). Par la suite, les cellules sont lavées avec du PBS 1X, fixées avec 1mL d'une solution de glutaraldehyde 6% (Sigma-

Aldrich G5882) et colorées au cristal violet 0,5% (MERCK, V5265-500ML). Les cellules sont incubées au moins 30 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite lavées précautionneusement à l'eau du robinet. Finalement les plaques contenant les colonies sont laissées séchées à température ambiante et les colonies ont été dénombrées 10 jours après la coloration.

La procédure standard consiste à compter à l'aide d'un stéréomicroscope et d'un compteur de colonies automatique. On détermine dans un premier temps le facteur « **PE** » des cellules contrôle, c'est-à-dire la fraction des colonies provenant de cellules non exposées au traitement. Dans chaque expérience, le **PE** doit être déterminé, car de petits changements dans les conditions peuvent influencer ce facteur.

$$**PE** = \frac{\text{Nombre de colonies formées}}{\text{Nombre de cellulesensemencées}} \times 100$$

La fraction de cellules survivantes après un traitement « **SF** » est ensuite calculée en tenant compte du **PE** avec la formule suivante :

$$**SF** = \frac{\text{Nombre de colonies formées après le traitement}}{\text{Nombre de cellulesensemencées}} \times **PE**$$

## 10. Cytométrie en flux

La veille,  $4 \cdot 10^5$  cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits en utilisant un milieu de culture pauvre en glucose (DMEM, Gibco-Life Technologies, 1 g/L D-Glc). A environ 70 % de confluence, le milieu de culture est retiré et les cellules sont incubées avec les glycoconjugués mono- ou tétravalents fluorescents dilués dans du milieu de culture à une concentration finale de 10  $\mu$ M et à différents temps d'incubation. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X (Gibco-Life Technologies), resuspendues avec de la Trypsine-EDTA (Gibco-Life Technologies) et collectées dans des tubes Eppendorfs de 1.5 mL. Après centrifugation 5 min à 1500 rpm et trois lavages avec du PBS 1X, les cellules sont ensuite fixées au paraformaldehyde 4 % (Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS 1X pendant 10 min à 4 °C. Finalement les cellules sont de nouveau lavées au PBS 1X et l'interaction cellulaire avec les glycoconjugués fluorescents est analysée par cytométrie en flux (Accuri C6 BD ou Attune NxT ThermoFisher). Les différents niveaux d'intensité de fluorescence sont mesurés avec le logiciel FSC Express 6.

## 11. Synthèses chimiques

### a. Matériels, méthodes et équipements

Tous les réactifs chimiques utilisés proviennent de SigmaAldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ou Acros (Noisy-Le-Grand, France) et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Tous les acides aminés protégés ainsi que la résine Fmoc-Gly-Sasrin® sont obtenus auprès d'Advanced ChemTech

Europe (Bruxelles, Belgique), de BachemBiochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) et de France Biochem S.A. (Meudon, France).

*Caractérisations analytiques :*

Pour les suivis des réactions, des RP-HPLC sont réalisées à différents temps sur un module de séparation Waters alliance 2695, équipé d'un détecteur UV/visible Waters 2489. Les analyses ont été réalisées à 1,23 mL.min<sup>-1</sup> (Waters XBridge Shield, C18, 3,5 µm, 100x4,6 mm) avec un suivi UV à 214 nm et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1 % de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H dans l'eau ; solvant B : 0,1 % de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H dans l'acétonitrile). Les échantillons ont été préparés dans l'eau avec un ajout éventuel d'acétonitrile.

Les spectres RMN de proton sont réalisés avec un spectromètre BrukerAvance III 500 MHz et les déplacements chimiques (δ) ont été rapportés en parties par million (ppm). Les spectres ont été référencés par rapport aux pics de solvant de proton résiduel par rapport au signal de l'eau désionisée (D<sub>2</sub>O ; 4,79 ppm pour 1 proton).

Les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ou ionisation par électronébuliseur (ESI) ont été effectuées soit sur un Waters Xevo® G2-S QToF, soit sur un Thermo Scientific MS-ESI/LTQ Orbitrap XL sur le plateau de spectrométrie de masse PCN-ICMG du DCM NanoBio à Grenoble.

*Purifications :*

La purification des composés est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (RP-HPLC semi-préparative; Waters) composé d'un contrôleur Waters 600 et d'un détecteur double absorbance Waters 2487. Elle a été effectuée à 22 mL.min<sup>-1</sup> (Waters XBridge PrepShield C18, 5 µm, 250x19 mm) avec contrôle UV à 214 nm et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile).

b. Procédures générales de synthèse

**Procédure générale 1 : Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC)**

Une solution de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,1 éq par alcyne), de THPTA (0,2 éq par alcyne) et d'ascorbate de sodium (1 éq par alcyne) dans du tampon PBS 1X (500 µL, pH 7,5) a été ajoutée à une solution contenant un azoture (PEG ou RAFT, 1 éq) et du Glc propargylé (4,4 éq) dans 500 µL d'un mélange 1:1 de DMF / PBS 1X (pH 7,5). Le mélange est ensuite dégazé sous argon et agité à température ambiante pendant 2 h. Afin d'éliminer le cuivre résiduel, une résine Chelex® est ajoutée au mélange réactionnel pendant 45 min sous agitation. La résine est finalement filtrée et le brut réactionnel purifié par RP-HPLC semi-préparative.

### **Procédure générale 2 : Synthèse peptidique sur support solide (SPPS)**

Les peptides utilisés ont été synthétisés manuellement par SPPS en stratégie Fmoc/Boc (9-fluorenylmethoxycarbonyl/tert-butoxycarbonyl). La synthèse a été réalisée dans un réacteur en polypropylène (type seringue ; 150 mL #5147808 Grace SA, USA) fixé sur un agitateur (IKA Vibrax VXR basic, USA) et équipé d'un filtre en verre fritté puis d'un robinet sur la partie inférieure pour le passage des solutions de réactions. De la résine SASRIN-Gly-Fmoc (loading = 0,79 mmol/g) ou Chlorotriyle (loading = 0,74 mmol/g) est ajoutée dans le réacteur et gonflée par ajout successif de dichlorométhane (DCM) et de diméthylformamide (DMF; 10 mL par gramme de résine pendant 10 minutes). Elle est ensuite traitée avec une solution de DMF/pipéridine (80/20) (2 fois 10 minutes) pour enlever le Fmoc présent sur la glycine. Du DMF (6 fois 10mL) est ajouté pour laver la résine et retirer les traces de pipéridine. Le couplage avec l'acide aminé suivant est réalisé dans du DMF (10 mL par gramme de résine) dans lequel sont solubilisés l'acide aminé protégé par un groupement Fmoc (2 éq) activé par ajout de PyBOP (2 éq.) et de DIPEA (4-5 éq). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 45 minutes. Finalement, la résine est lavée 5 fois pendant 10 minutes avec du DMF (10 mL par gramme de résine) et de nouveaux cycles de déprotection/couplage acide aminé suivant sont réalisés jusqu'à obtention du peptide linéaire complet.

### **Procédure générale 3 : Décrochage de la résine**

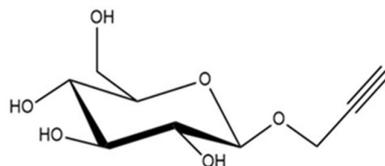
Les peptides synthétisés sur résine sont traités 10 fois 10 minutes (10 mL par gramme de résine) avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA)/DCM (1:99). La solution est récupérée et l'excès de TFA est neutralisé par ajout de DIPEA avant concentration sous pression réduite. Les peptides sont resolubilisés dans un minimum de DCM et précipités avec de l'éther diéthylique.

### **Procédure générale 4 : Coupure des groupements protecteurs Boc**

Les peptides protégés par des groupements Boc sont dissous dans 20 mL d'un mélange de TFA/DCM (50:50) et le mélange réactionnel est laissé 15 minutes à température ambiante. Le mélange de solvants est ensuite éliminé par évaporation. Les produits sont précipités dans de l'éther diéthylique et séchés sous vide pour obtenir un brut déprotégé. Ils sont finalement purifiés par RP-HPLC semi-préparative afin d'obtenir des produits déprotégés.

c. Synthèse et caractérisations**1-O-propargyl-D-Glucopyrannoside (composé n°1)**

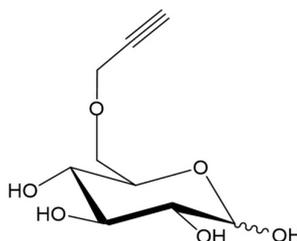
1 a été synthétisé suivant la procédure décrite par Abellán Flos, García Moreno [248], ultérieurement dans l'équipe.



**1**  
 $C_9H_{14}O_6$   
MW : 218,21 g/mol

**6-O-propargyl-D-Glucopyrannoside (composé n°5)**

5 a été synthétisé suivant la procédure décrite par Ekholm, Pynnönen [249] à partir de D-Glucose (1 g, 5,55 mmol) et a été obtenu avec un rendement global de 98% (0,98 g).

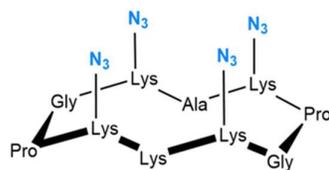


**5**  
 $C_9H_{14}O_6$   
MW : 218,21 g/mol

**RMN** : Les données sont en accord avec ceux de la littérature Ekholm, Pynnönen [249].



La plateforme cyclodécapeptidique (RAFT-4N<sub>3</sub>) **6** est obtenue en déprotégeant **P2** via la **procédure générale 4**. Après évaporation du solvant le produit est purifié par RP-HPLC.



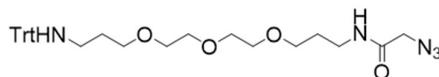
**6**  
C<sub>47</sub>H<sub>77</sub>N<sub>23</sub>O<sub>10</sub>  
MW : 1124,3 g/mol

**RP-HPLC** : 20% en solvant B pendant 3 min puis gradient 20-100% pendant 15 min, Rt =4 min

## Synthèse du Glycocomposé fluorescent Glucose monovalent (1-O-prop-D-Glc-PEG-FITC; composé n°12)

### Etape 1 : PEG-N<sub>3</sub> protégé (composé n°9)

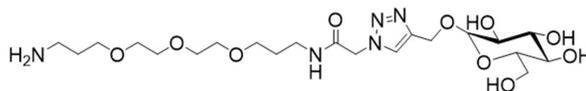
Le produit **9** a été obtenu par couplage entre une chaîne PEG protégée par un groupement trityl (7,6 mg;  $1,66 \cdot 10^{-4}$  mol) et un ester d'acide azidoacétique ( $1,66 \cdot 10^{-4}$  mol) en milieu basique avec ajout de DIPEA (58  $\mu$ L; 2 équ) 2 h sous agitation à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le produit purifié sur une colonne de silice dans un mélange DCM/Méthanol (95/5). Les fractions d'éluion sont récupérées et évaporées sous pression réduite. Le produit est alors séché sous pompe à vide et utilisé sans purification supplémentaire.



**9**  
C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW : 545,3 g/mol

### Etape 2 : PEG monosubstitué avec un 1 Glc en C1 (composé n°10)

Le produit **10** est obtenu en greffant un 1-O-propargyl-D-Glc (30 mg;  $1,37 \cdot 10^{-4}$  mol; composé **1**) avec le produit **9** (111,7 mg; 1,5 équ) précédemment obtenu par CuAAC en suivant la **procédure générale 1**. Le solvant est évaporé sous pression réduite et les groupement trityl sont retirés dans un mélange TFA/H<sub>2</sub>O/Triisopropylsilane (95/4/1) 20 min sous agitation à température ambiante. Après évaporation du solvant le produit **10** est purifié par RP-HPLC et est obtenu avec un rendement de 96% (103 mg).

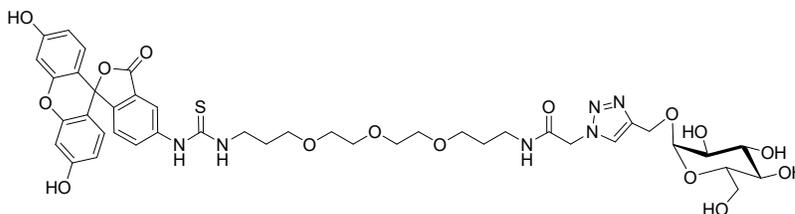


**10**  
C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>  
MW : 521,3 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 1,5 min

**Etape 3 : PEG monosubstitué avec un 1 Glc en C1 et marqué à la fluorescéine (1-O-prop-D-Glc-PEG-FITC; composé n°12)**

Le produit **10** (25 mg;  $4,8 \cdot 10^{-5}$  mol) précédemment obtenu est solubilisé dans 2 mL de DMF avant ajout de DIPEA (25  $\mu$ L; 3 éq). De l'isothiocyanate de fluorescéine (28 mg; 1,5 éq) est ensuite ajouté et le mélange réactionnel est laissé 15 min sous agitation à l'abri de la lumière. Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **12** pur est récupéré sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 12%.



**12**  
 $C_{42}H_{50}N_6O_{15}S$   
MW : 910,3 g/mol

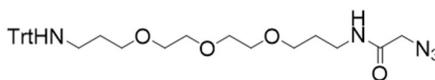
**RP-HPLC** : Gradient 5-100% en solvant B, Rt = 6 min

**ESI-MS(+)** : m/z calculé pour  $[M+H]^+$  = 910,31; m/z trouvé = 909,28

## Synthèse du Glycocomposé fluorescent Glucose monovalent (6-O-prop-D-Glc-PEG-FITC; composé n°13)

### Etape 1 : PEG-N<sub>3</sub> protégé (composé n°9)

Le même protocole que pour le composé **12** est suivi.

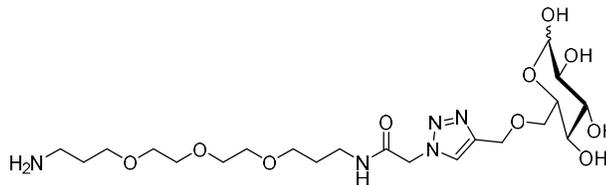


**9**

C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
MW : 545,3 g/mol

### Etape 2 : PEG monosubstitué avec un 1 Glc en C6 (composé n°11)

Le produit **11** est obtenu en réalisant le même protocole que pour le produit **10**, en utilisant du 6-O-propargyl-D-Glc (30 mg; 1,37.10<sup>-4</sup> mol; composé **5**). Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **11** pur est récupéré avec un rendement de 100%.



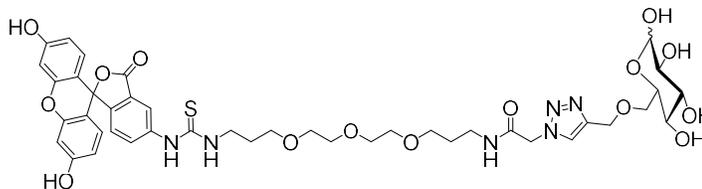
**11**

C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>  
MW : 521,3 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 1,5 min

### Etape 3 : PEG monosubstitué avec un 1 Glc en C6 et marqué à la fluorescéine (6-O-prop-D-Glc-PEG-FITC; composé n°13)

Le produit **13** est obtenu en réalisant le même protocole que pour le produit **12** à partir du produit **11** (25 mg;  $4,8 \cdot 10^{-5}$  mol) et de la fluorescéine (28 mg; 1,5 éq). Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **13** pur est récupéré sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 16%.



**13**

$C_{42}H_{50}N_6O_{15}S$   
MW : 910,3 g/mol

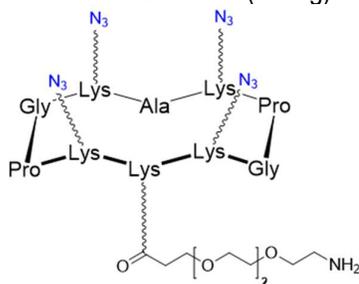
**RP-HPLC** : Gradient 5-100% en solvant B, Rt = 6 min

**ESI-MS(+)** : m/z calculé pour  $[M+H]^+$  = 910,31; m/z trouvé = 909,28

## Synthèse du Glycocomposé fluorescent Glucose tétravalent (1-O-prop-D-Glc-RAFT-PEG-FITC; composé n°17)

### Etape 1 : RAFT-4N<sub>3</sub> portant un PEG (composé n°14)

Une RAFT-4N<sub>3</sub> (50 mg;  $4,71 \cdot 10^{-5}$  mol; composé n°6) obtenu précédemment est solubilisé dans 500  $\mu$ L de DMF. En parallèle, un Fmoc-PEG-COOH (41 mg; 2 éq) est solubilisé dans 500  $\mu$ L DMF auxquels on ajoute du PyBOP (49 mg; 2 éq) et de la DIPEA (25  $\mu$ L; 3 éq) 30 min sous agitation à température ambiante. Les solutions contenant le RAFT-4N<sub>3</sub> et le PEG sont ensuite mixées et laissées 1 h sous agitation à température ambiante. Après purification par RP-HPLC et évaporation sous pression réduite l'intermédiaire réactionnel est resuspendu dans un mélange DMF/pipéridine (80/20) pendant 2 h pour enlever le groupement protecteur Fmoc présent sur le PEG. Après évaporation sous pression réduite le produit **14** est repris dans 1 mL de DMF et 3 mL d'acétonitrile. Il est finalement purifié par RP-HPLC et lyophilisé pour être obtenu avec un rendement de 62% (37 mg).



**14**

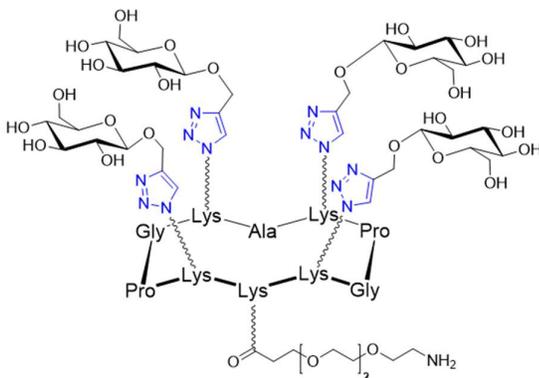
C<sub>56</sub>H<sub>94</sub>N<sub>24</sub>O<sub>14</sub>  
MW : 1326,7 g/mol

**(14 intermédiaire) RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 11 min

**(14) RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 7 min

### Etape 2 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C1 et portant un PEG (composé n°15)

Le produit **15** est obtenu en greffant un 1-O-propargyl-D-Glc (49 mg; 6 éq; composé **1**) avec le produit **14** (50 mg;  $3,76 \cdot 10^{-5}$  mol) précédemment obtenu par CuAAC en suivant la **procédure générale 1**. Le produit est finalement purifié par RP-HPLC et lyophilisé avec un rendement de 94% (48,3 mg).

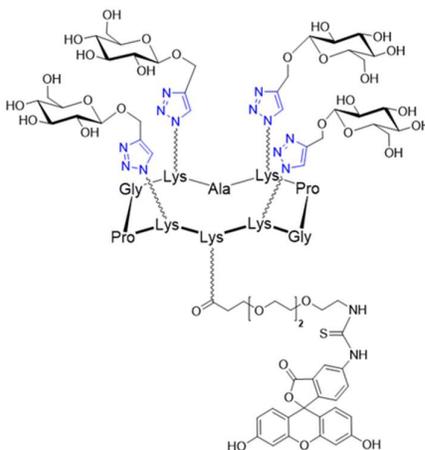
**15**

$C_{92}H_{150}N_{24}O_{38}$   
MW : 2200,3 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5-60% en solvant B, Rt = 3 min

**Etape 3 : RAFT tétrasubstitué avec 1 Glc en C1 et marqué à la fluorescéine (composé n°17)**

Le produit **15** (23 mg;  $1,04 \cdot 10^{-5}$  mol) précédemment obtenu est solubilisé dans 2 mL de DMF avant ajout de DIPEA (3,6  $\mu$ L; 2 éq). De l'isothiocyanate de fluorescéine (6 mg; 1,5 éq) est ensuite ajouté et le mélange réactionnel est laissé 15 min sous agitation à l'abri de la lumière. Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **17** pur est récupéré sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 72% (19,4 mg).

**17**

$C_{113}H_{161}N_{25}O_{43}S$   
MW : 2589,7 g/mol

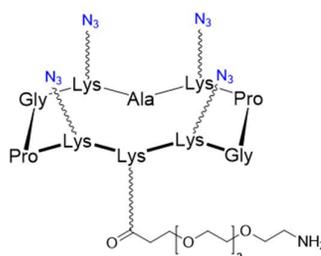
**RP-HPLC** : Gradient 5-60% en solvant B, Rt = 9 min

**ESI-MS(+)** : m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08

### Synthèse du Glycocomposé fluorescent Glucose tétravalent (6-O-prop-D-Glc-RAFT-PEG-FITC; composé n°18)

#### Etape 1 : RAFT-4N<sub>3</sub> portant un PEG (composé n°14)

Le même protocole que pour le composé **17** est suivi.



**14**

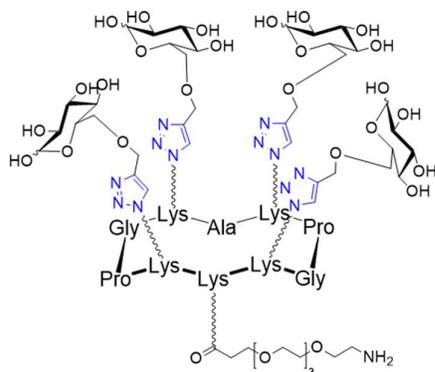
C<sub>56</sub>H<sub>94</sub>N<sub>24</sub>O<sub>14</sub>  
MW : 2589,7 g/mol

**(14 intermédiaire) RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 11 min

**(14) RP-HPLC** : Gradient 5-80% en solvant B, Rt = 7 min

#### Etape 2 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C6 et portant un PEG (composé n°15)

Le produit **16** est obtenu en réalisant le même protocole que pour le produit **15**, en utilisant du 6-O-propargyl-D-Glc (34,4 mg; 6 éq; composé **5**) et le composé **14** (35 mg; 2,63.10<sup>-5</sup> mol). Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **16** pur est récupéré avec un rendement de 100% (35 mg).

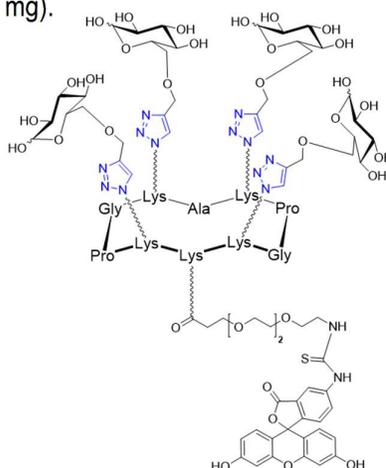
**16**C<sub>92</sub>H<sub>150</sub>N<sub>24</sub>O<sub>38</sub>

MW : 2589,7 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5-60% en solvant B, Rt = 3 min

**Etape 3 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C6 et marqué à la fluorescéine (composé n°18)**

Le produit **18** est obtenu en réalisant le même protocole que pour le produit **17** à partir du produit **16** (14 mg; 6,36.10<sup>-6</sup> mol) et de la fluorescéine (3,7 mg; 1,5 éq). Après purification par RP-HPLC et lyophilisation le produit **18** pur est récupéré sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de avec un rendement de 33% (4,7 mg).

**18**C<sub>113</sub>H<sub>161</sub>N<sub>25</sub>O<sub>43</sub>S

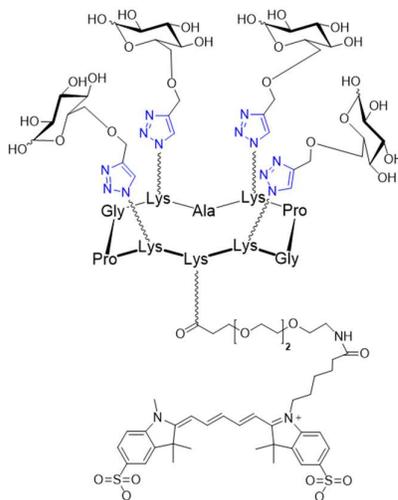
MW : 2589,7 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5-60% en solvant B, Rt = 9 min

**ESI-MS(+)** : m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08

**Synthèse du Glycoconjugué fluorescent Glucose tétravalent (6-O-prop-D-Glc-RAFT-PEG-Cya5; composé n°19)**

Le produit **16** (5 mg;  $2,27 \cdot 10^{-6}$  mol) préalablement obtenu est solubilisé dans 1 mL de DMF avant ajout de DIPEA (1 éq). De la sulfo-Cyanine5 NHS ester (1,9 mg; 1,1 éq) est ajoutée et le mélange réactionnel est laissé 30 min sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le produit est alors purifié par RP-HPLC avant d'être lyophilisé et récupéré sous forme d'une poudre bleue avec un rendement de 63% (3,2 mg).

**19**

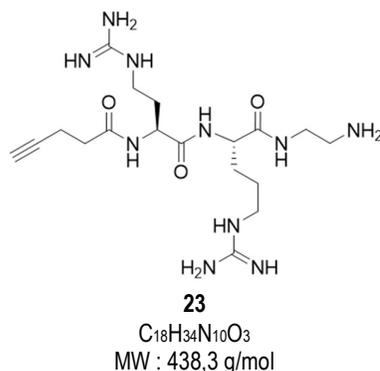
$C_{124}H_{185}N_{26}O_{45}S_2$   
MW : 2824,0 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 0-40% en solvant B, Rt = 20 min

**ESI-MS(+)** : m/z calculé pour  $[M+H]^+$  = 2825,07 ; m/z trouvé = 2824,23

**Synthèse du Glycoconjugué Glucose tétravalent portant une chaîne d'arginine (6-O-prop-D-Glc-RAFT-Arg2-Acide lipoïque; composé n°26)****Etape 1 : 2 Arginines portant un propargyle et un éthylènediamine (peptide 23)**

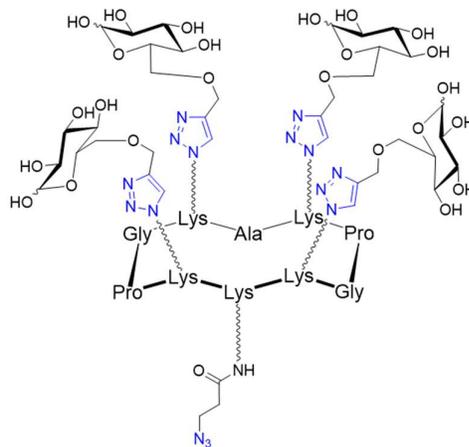
Le peptide **23** a été synthétisé par SPPS avec une résine Chlorotriptyle (1 g; loading 0,74 mmol/g) et en suivant la **procédure générale 2**. Une molécule d'éthylènediamine (200  $\mu$ L; 4 éq) est dans un premier temps couplée à la résine avant ajout de deux acides aminés arginines. De l'acide pentynoïque (150 mg; 4 éq) est ensuite ajouté du côté N-ter de l'arginine par couplage peptidique avec du PyBOP (1,5 g; 4 éq) et de la DIPEA (128  $\mu$ L; 4 éq) dans du DMF. Le peptide **23** est finalement détaché de la résine en suivant la **procédure générale 3**, évaporé sous pression réduite puis repris dans un minimum de DMF avant d'être précipité avec de l'éther diéthylique.



**RP-HPLC** : Gradient 0-10% en solvant B pendant 20 min,  $R_t = 5,4$  min

**Etape 2 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C6 et portant un azoture (composé n°22)**

Des molécules de 6-O-propargyl-D-Glc (17 mg; 4,4 éq; composé **5**) sont dans un premier temps ajoutés sur un RAFT-4N<sub>3</sub> (20 mg; 1,78.10<sup>-5</sup> mol; composé **6**) par CuAAC en suivant la **procédure générale 1** pour obtenir un produit intermédiaire RAFT tétravalent en Glc. Après purification par RP-HPLC et lyophilisation ce produit intermédiaire est obtenu avec un rendement de 79% (15,9 mg). Ce RAFT-4Glc (15,9 mg; 7,59.10<sup>-6</sup> mol) est ensuite resolubilisé dans du DMF auquel on vient ajouter le produit **8** (2,3 mg; 1,5 éq) et de la DIPEA (2,6 µL; 2 éq). Le mélange est laissé 1 h sous agitation à température ambiante avant d'être purifié par RP-HPLC et lyophilisé pour obtenir le produit **22** avec un rendement de 74% (11,9 mg).

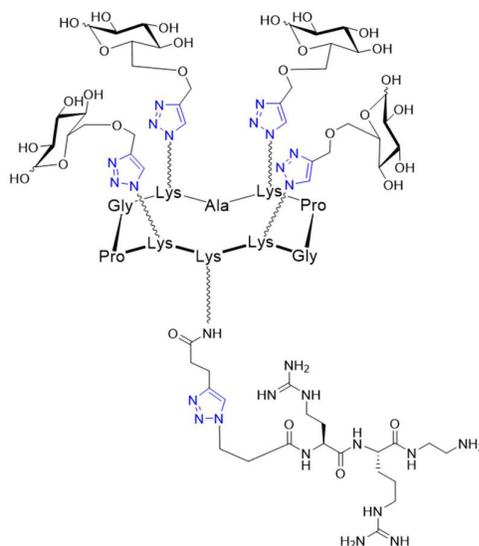
**22**

C<sub>86</sub>H<sub>136</sub>N<sub>26</sub>O<sub>35</sub>  
MW : 2092,9 g/mol

**RP-HPLC** : 5% en solvant B pendant 3 min puis gradient 5-80% pendant 20 min, Rt =12,5 min

### **Etape 3 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C6 et portant 2 arginines (composé n°24)**

Le peptide **23** (3,4 mg; 1,3 éq.) obtenu précédemment est greffé au composé **22** (11,9 mg; 5,5.10<sup>-6</sup> mol) par CuAAC en suivant la **procédure générale 1** pour obtenir le composé **24**. Après purification par RP-HPLC et lyophilisation, le produit **24** est obtenu avec un rendement de 50% (5,95 mg).

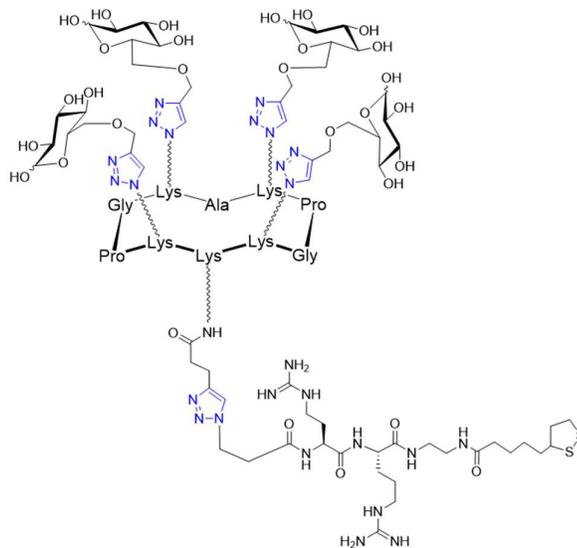
**24**

$C_{104}H_{170}N_{36}O_{38}$   
MW : 2531,2 g/mol

**RP-HPLC** : 5% en solvant B pendant 3 min puis gradient 5-70% pendant 20 min,  $R_t = 9,4$  min

**Etape 4 : RAFT tétrasubstitué avec 4 Glc en C6, portant 2 arginines et un acide lipoïque  
(composé n°26)**

Le produit **24** (5,95 mg;  $2,35 \cdot 10^{-6}$  mol) préalablement obtenu est solubilisé dans 1 mL de DMF avant ajout de DIPEA (1  $\mu$ L; 2 éq). Ensuite, le composé **25** (1 mg; 1,5 éq) est ajouté et le mélange réactionnel est laissé 30 min sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le produit **26** est alors purifié par RP-HPLC avant d'être lyophilisé et récupéré sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 33,7% (2 mg).



**26**

$C_{112}H_{182}N_{36}O_{39}S_2$   
 MW : 2589,7 g/mol

**RP-HPLC** : Gradient 5% pendant 3 min puis 0-40% en solvant B pendant 20 min, Rt = 9,4 min

**UPLC-MS** : m/z calculé pour  $[M+H]^+$  = 2720,28 ; m/z trouvé = 2719,94

---

# Annexes



## **Communications et participation à des congrès**

- ❖ **Novembre 2021** : Les Oncoriales ; Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes ; La Charpinière Saint Galmier.
- ❖ **Décembre 2021** : SF Nano 2021 ; Centre des Congrès de Angers.
  - Flash talk : Présentation de projet de thèse en 3 minutes.
- ❖ **Juillet 2022** : Journée EUR CBH ; Campus Santé Grenoble
  - Présentation de poster : "Development of gold nanoclusters, a sub-family of gold nanoparticle, as innovative siRNA delivery and radiotherapeutic nanosystem".
- ❖ **Décembre 2022** : SF Nano 2022 ; IRCAD Strasbourg.
  - Présentation de poster : "Development of a new theranostic approach targeting telomeric response in radio-resistant lung cancer cell".

## **Formations doctorales suivies**

- ❖ **Formations transversales** (46 heures)
  - ENTRER DANS LA COMMUNAUTE DES CHERCHEURS - B2 - Fabriquer des documents numériques longs, par exemple sa thèse - Making long digital documents / 26 janvier 2023 / 3 heures.
  - ENTRER DANS LA COMMUNAUTE DES CHERCHEURS -B15- Atelier pratique de prise en main du modèle de thèse - Workshop : starting with your thesis template / 14 mars 2023 / 3 heures.
  - MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche - Univ. Bordeaux- session 3 / 1 septembre 2020 / 15 heures.
  - [Anglais] - Communication de base # session 3 (En distanciel) / 3 décembre 2020 / 21 heures.
  - Intervenir sur un départ de Feu - Manipulation des Extincteurs / 26 avril 2021 / 2 heures.
  - Gestes de premiers secours / 27 janvier 2022 / 2 heures.

---

❖ **Poursuite de carrière** (24 heures)

- MOOC 'Doctorat et poursuite de carrière'- PhDOOC / 13 janvier 2021 / 24 heures.

❖ **Formations disciplinaires** (68 heures)

- Chimie des processus biologiques / 12 mars 2021 / 18 heures.
- Risques chimiques (CNRS) / 14 octobre 2021 / 10 heures.
- Formation à l'expérimentation animale pour les personnes concevant les procédures expérimentales aux animaux des espèces rongeurs / 7 juin 2022 / 40 heures.

**Articles en cours de soumission**

❖ **Mai 2023** : Langmuir.

- « *Gold Nanoparticle Translocation Across a Droplet Interface Bilayer via Dark-Field Microscopy* » - Jean-Baptiste Fleury, Sean Moro, Virginie Faure and Xavier Le Guével.

**Articles en cours d'écriture**

❖ Pour les travaux réalisés sur la synthèse de glycoconjugués et leur étude d'interaction et de pénétration cellulaire :

- « Improving cellular accumulation of GLUT1-based drug delivery RAFT platform »

❖ Pour les travaux réalisés sur la vectorisation d'un siARN anti-TRF2 *via* des nanoclusters d'or pour induire une radiosensibilité cellulaire.

❖ Suite à une collaboration avec le Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM, Grenoble) concernant l'étude par cytométrie en flux de l'interactions cellulaires de cyclopeptides réactifs à la lumière :

- « Obtaining more spatiotemporal control in cellular uptake : photoinduced macrocyclization of cyclopeptides with fast internalization » – Leandro dos Santos, Sean Moro, Virginie Faure, Mylène Pezet, Pascale Moser, Marie-Ange Lespinasse, Baptiste Leforestier, Anne Milet, Basile Pérès and Yung-Sing Wong.

---

# Remerciements



Ces trois années de thèse représentent l'aboutissement d'une période importante de ma vie. En effet, bien que les soutenances de thèse sont monnaie courante pour la plupart des personnes qui liront ces lignes, c'est pour moi le terme d'une ascension sociale incroyable que je pensais il n'y a pas si longtemps inatteignable. Dans cette période, il y a eu de nombreuses étapes à surmonter accompagnées de moments forts de joie, de stress, d'incertitude, de colère, de solidarité, d'amitié, de rencontre et d'accomplissement. Avec le recul, je réalise maintenant que certaines étapes auraient pu être faites différemment, mieux, en plus ou en moins. Néanmoins, elles font partie intégrante de mon parcours et je dois m'en servir pour mieux appréhender l'avenir.

Si je suis arrivé au bout de ce parcours c'est grâce à ma persévérance, mais aussi et surtout avec l'aide de personnes formidables que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ce projet. A travers ces quelques lignes c'est toutes ces personnes que je souhaite remercier chaleureusement :

Tout d'abord l'équipe du Dr. Jean-Luc Coll à l'IAB. Au sein de celle-ci j'ai passé mon Doctorat dans d'excellentes conditions tant sur le plan professionnel que social. Chaque membre a été avec moi très accueillant, aidant, pédagogue et compréhensif, aussi bien dans les périodes calmes que dans les plus tendues. Je pense dans un premier temps à Véronica et Théo avec qui j'ai partagé mon bureau dans une ambiance toujours agréable et solidaire. Plus particulièrement Véronica pour ses attentions et ses conseils sur les manipes, Théo pour les moments de discussion autour d'un verre et les matchs de tennis qui ont soulagés dans les moments où il y en avait besoin. Un grand merci aussi à Pierre et Laetitia pour leurs conseils, leur précieuse aide sur les manipes notamment les western blot et la culture cellulaire, ainsi que sur les papotages. Xavier pour sa pédagogie riche et patiente ainsi que son aide et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce projet de thèse. Merci beaucoup à Mohammed pour son aide sur les manipes lors de ma troisième année. Benoit et Lucie pour les discussions autour du café matinal. Merci à Fabien, Morgane, Pierre et Laetitia pour leur implication dans la vie du laboratoire et qui nous ont permis de manipuler dans des bonnes conditions sans manquements. Je remercie vivement Jean-Luc pour mon intégration dans l'équipe et qui, malgré ses nombreuses activités a toujours su se libérer pour nous conseiller et faire le point sur mon projet. Merci également aux autres membres de l'équipe avec lesquels j'ai moins eu l'occasion de travailler mais qui participaient tout autant à l'ambiance générale très agréable et dynamique de l'équipe. Pour les événements, séminaires, randonnées, barbecues, pots, congrès...

Ces moments qui représentent aujourd'hui d'excellents souvenirs et qui ont contribué à la cohésion d'équipe.

Un grand merci à Mylène Pezet pour sa patience, son apprentissage et ses (très) nombreuses heures passées à mes côtés au FACS et en microscopie. Merci à Solenne et Véronique pour les conseils,

apprentissages et discussions. Merci à Claire Vourch pour avoir cru en moi et appuyer mes candidatures dès le Master.

Je souhaite également remercier mon équipe du DCM Nanobio dirigée par le Dr. Didier Boturyn. Tout d'abord Pierre, Jordan, Coelio, Eugénie et Claire de manière générale pour les nombreuses discussions plus ou moins sérieuses, rigolades et soirées. Plus particulièrement merci à Pierre et Jordan pour tous les moments sportifs. Eugénie pour ses conseils et son aide au labo. Un grand merci à Claire pour son aide précieuse sur les manipes. Merci beaucoup à David d'avoir été là dès les premiers moments, de m'avoir transmis les bases de la synthèse peptidique et pour sa patience concernant toutes mes questions naïves de biologiste. Merci à Muriel pour son temps accordé pour les manipes de RMN DOSY. Merci également aux autres membres de l'équipe notamment pour leurs conseils lors de mes présentations. Merci à Laure et au plateau de spectrométrie de masse du DCM pour les analyses. Finalement, je remercie vivement Olivier pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet de thèse, pour son accompagnement, son encadrement, pour ces moments de discussions et de conseils dans le cadre professionnel ou plus personnel, et bien sûr sa patience sur mes dessins de structures de molécules.

Un grand merci à mon jury de thèse, les Drs Elisabeth Garanger, Cyrille Richard, May Morris et Ahcène Boumendjel d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci beaucoup également à mon jury de CSI, les Drs. Giovanna Lollo, Sami Halila, François Cretin et Patrick Midoux pour l'évaluation de mes travaux intermédiaires et leurs conseils.

Je remercie chaleureusement ma formidable compagne Cindy qui m'a soutenu et accompagné tout au long de ces trois années et sans qui tout cela aurait été bien plus éprouvant. Merci à mon père qui a su à un moment crucial de ma vie trouver les mots pour me relancer sur le chemin des études, pour son accompagnement tout au long de celles-ci et sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci à ma mère d'être toujours présente pour nous aider et pour m'avoir donné toutes les armes pour en arriver où j'en suis à ce jour.

Pour finir je souhaite remercier grandement mon encadrante Virginie. Pour avoir cru en moi dès la Licence dans une période où moi-même n'y croyais plus, Virginie m'a offert l'opportunité de découvrir le monde de la recherche *via* un stage à l'IAB. Ce stage m'a non seulement permis de retrouver goût au monde de la biologie mais aussi de reprendre confiance en moi, de m'apporter des compétences précieuses à valoriser et de rencontrer des personnes qui m'ont été d'une grande aide pour la suite et pour ma reprise d'étude. En plus de cela, elle a été une enseignante et une encadrante exceptionnelle, disponible, compréhensive, souriante, aidante et patiente, et ce malgré les difficultés que nous avons pu rencontrer. Que ce soit pour le travail ou à l'extérieur j'ai toujours passé d'excellents moments en sa compagnie.

# Table des figures

<b>Figure 1 : Illustration simplifiée du développement d'un cancer.</b> .....	12
<b>Figure 2 : Taux de mortalité lié aux cancers du poumon dans le monde en 2020 normalisé selon l'âge d'individus hommes et femmes. ASR : Age-Standardized Rate. Issue de GLOBOCAN 2020.</b> . 14	
<b>Figure 3 : Thérapies médicamenteuses non basées sur l'immunothérapie et dirigées contre les cancers du poumon à cellules non petites. Issue et adaptée de Dhruva Deb et al. 2022.</b> .....	17
<b>Figure 4 : Principe et conséquences de la radiothérapie. Figure issue de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).</b> .....	19
<b>Figure 5 : Les effets cellulaires des rayonnements ionisants et les mécanismes de résistance déclenchés en réponse. Figure librement adaptée à partir de Tang et al. 2018.</b> .....	21
<b>Figure 6 : Représentation schématique de la structure des télomères présents au niveau des extrémités des chromosomes eucaryotes. A) Représentation de l'ADN télomérique. Le brin 3' est riche en guanine (G) et surplombe le brin 5' riche en cytosine (C) opposé. B) Représentation de l'ADN télomérique sous forme de boucle T. Figure issue de Giardini et al. 2014.</b> .....	24
<b>Figure 7 : Illustration de la biologie des télomères chez des cellules saines vs chez des cellules cancéreuses.</b> .....	25
<b>Figure 8 : Structure du complexe shelterin et de ses six sous unités. A) Représentation du complexe shelterin humain associé à l'ADN télomérique double brin et simple brin. B) Domaines protéiques des six sous-unités du complexe shelterin et leurs interactions entre elles et l'ADN télomérique. Figure issue et adaptée de de Lange 2018.</b> .....	26
<b>Figure 9 : Impact de la longueur des télomères sur la radiosensibilité cellulaire. A) Longueur moyenne des télomères dans des cellules cancéreuses HEp-2 et HEp-2R déterminée par analyse de fragments de restriction. B) Courbes de survies issues d'essais clonogéniques. Issue et adaptée de Zhong et al. 2007.</b> .....	28
<b>Figure 10 : Corrélation entre la longueur des télomères et l'expression de la protéine télomérique POT1 sur la radiosensibilité cellulaire. A) Fraction de cellules survivantes après irradiation à une dose de 2 Gy en fonction de la longueur de leurs télomères. B) Fraction de cellules survivantes après irradiation à une dose de 2 Gy en fonction de leur expression relative en protéine télomérique POT1. Issue de Ferrandon et al. 2013.</b> .....	29
<b>Figure 11 : Clichés d'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence de cellules fibroblastiques déplétées (<math>\Delta</math>TRF2) ou non (TRF2) en protéine TRF2. Issue de Markiewicz-Potoczny et al. 2021.</b> .....	30
<b>Figure 12 : Evaluation de l'impact de l'inhibition de la protéine TRF2 sur la radiosensibilité cellulaire. A) Dosage de l'enzyme bêta galactosidase chez des cellules irradiées et traitées ou non avec un siARN anti-TRF2. B) Mesure de la viabilité cellulaire par essai clonogénique chez des cellules irradiées et traitées ou non avec un siARN anti-TRF2 POT1. C) Clichés de microscopie comparant la morphologie de cellules traitées ou non avec un siARN anti-TRF2 après irradiation. Figure issue et adaptée de O. Orun et al. 2015.</b> .....	31
<b>Figure 13 : TRF2 participe à la radiorésistance des cellules tumorales de poumon. Evaluation de la survie cellulaire après irradiation à des doses croissantes des cellules A549 traitées (siTRF2) ou non (CTRL) avec un siARN anti TRF2. Figure issue et adaptée de X. Yang et al. 2015.</b> .....	32
<b>Figure 14 : Structure simplifiée d'un siARN double brin.</b> .....	33
<b>Figure 15 : Illustration du processus de formation des petits ARNs interférents (siARNs) et dégradation d'un ARN messager (ARNm) cible.</b> .....	34
<b>Figure 16 : Observation de la différence de phénotypes chez des fleurs transgéniques comparé aux fleurs parentales. La perte progressive de la pigmentation chez les fleurs transgéniques illustre le phénomène d'interférence par ARN. Issue de Jorgensen et al. 1990.</b> .....	35
<b>Figure 17 : Illustration des principaux défis rencontrés lors de l'administration de siARN à visée thérapeutique <i>in vivo</i>. Inspirée de Artiga et al. 2019.</b> .....	36
<b>Figure 18 : Illustration des défis rencontrés lors de l'utilisation de siARN en thérapie et les solutions envisagées.</b> .....	37

<b>Figure 19 : Structure du siARN modifié utilisé dans le cadre du traitement Patisiran.</b> Plusieurs groupements OH en positions 2' des riboses constituant les nucléotides du siARN ont été substitués par des groupements méthyl (Me) afin d'améliorer la protection contre les dégradations enzymatiques. <i>Figure directement issue de Suzuki et al. 2021.</i> .....	38
<b>Figure 20 : Illustration reprenant un exemple de dégradation d'ARNm cible par un siARN en utilisant un vecteur viral.</b> .....	39
<b>Figure 21 : Illustration des différents types de nanoparticules pour la vectorisation de biomolécules.</b> .....	41
<b>Figure 22 : Illustration reprenant un exemple de dégradation d'ARNm cible par un siARN vectorisé par une nanoparticule de type lipidique.</b> .....	42
<b>Figure 23 : Structure du système de diffusion de siARN Givosiran.</b> <i>Issue de Majeed et al. 2022 et dictionnaire.acadpharm.org.</i> .....	43
<b>Figure 24 : Illustration des différents paramètres impactant les propriétés physico-chimiques des AuNPs.</b> .....	46
<b>Figure 25 : Représentation simplifiée d'un nanocluster d'or entouré et stabilisé par des ligands peptidiques à base de soufre.</b> .....	47
<b>Figure 26 : Illustration schématique de la variation des potentiels de surface de AuNPs en fonction de leur taille (A) corrélée à l'énergie d'émission (B).</b> <i>Issue de Zheng et al. 2012.</i> .....	49
<b>Figure 27 : Arborescence reprenant l'origine des principales sources de la photoluminescence des AuNPs plasmoniques et non plasmoniques.</b> <i>Adaptée de Zheng et al. 2021.</i> .....	50
<b>Figure 28 : Illustration des niveaux de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde.</b> <i>Adaptée de Joyce et al. 2020.</i> .....	51
<b>Figure 29 : Illustration des différents niveaux de dispersion de la lumière en fonction de différents fluorophores.</b> <i>Issue de Shuqing He et al. 2018.</i> .....	52
<b>Figure 30 : Illustration de quelques exemples de fonctionnalisation de AuNPs avec des biomolécules d'intérêts thérapeutique ou diagnostic.</b> .....	53
<b>Figure 31 : Illustration des différents mécanismes induisant une radiosensibilité cellulaire via l'utilisation de AuNPs.</b> <i>Inspirée de Chen et al. 2020.</i> .....	55
<b>Figure 32 : Illustration de l'utilisation combinatoire de la photothérapie (PTT) et de la thérapie photodynamique (PDT).</b> <i>Issue de Zhi et al. 2020.</i> .....	56
<b>Figure 33 : Illustration de l'effet d'amélioration de la pénétration et de la rétention de nanoparticules au sein d'un micro-environnement tumoral (effet EPR).</b> .....	57
<b>Figure 34 : Modèles bidimensionnels des GLUTs de classe I, II et III.</b> Les extrémités N et C terminales sont orientées vers le cytoplasme et des structures d'oligosaccharides liées par N-glycosylation sont orientées vers l'espace extracellulaire. <i>Issue de Uldry M. et Thorens B. 2004.</i> .....	61
<b>Figure 35 : Modélisation de la structure du transporteur de glucose humain GLUT1.</b> <i>Issue de Deng et al. 2014.</i> .....	62
<b>Figure 36 : Topologie putative du transporteur GLUT1 et organisation structurelle de sa cavité centrale.</b> <i>Issue de Blodgett et al. 2008.</i> .....	63
<b>Figure 37 : Modèle envisagé pour le transport de molécules médié par GLUT1.</b> <i>Issue de Deng et al. 2014.</i> .....	66
<b>Figure 38 : Illustration de l'effet Warburg.</b> <i>Adaptée de Heiden et al. 2012.</i> .....	68
<b>Figure 39 : Clichés de tomographie par émission de positons pour la visualisation de sites tumoraux marqués au glucose radioactif.</b> <i>Issue de Calvaresi et Hergenrother 2013.</i> .....	69
<b>Figure 40 : Molécule de paclitaxel chimiquement conjuguée à une molécule de glucose.</b> La conjugaison a lieu au niveau du carbone 2 du glucose. <i>Issue de Calvaresi et Hergenrother 2013.</i> .....	70
<b>Figure 41 : Représentation du <math>\beta</math>-D-Glucose en forme pyranose ainsi que ses différents sites de substitutions possibles.</b> .....	70
<b>Figure 42 : Illustration de la préparation de AuNPs glycoconjuguées pour vectoriser un siARN dans un microenvironnement tumoral.</b> <i>Issue et adaptée de Yi et al. 2019.</i> .....	71
<b>Figure 43 : Représentation schématique de l'organisation générale du projet de thèse.</b> .....	77
<b>Figure 44 : Schéma simplifié de la procédure de synthèse des AuNCs.</b> .....	80

<b>Figure 45 : Représentation schématisée des différents AuNCs synthétisés lors du projet de thèse.</b> .....	82
<b>Figure 46 : Clichés de microscopie électronique à transmission à haute résolution (HRTEM, gauche) et quantification de la taille (n=50) des AuNCs synthétisés : AuNC-SG (A), AuNC-SG-R<sub>2</sub> (B), AuNC-CR<sub>3</sub> (C) et AuNC-CR<sub>9</sub> (D).</b> .....	83
<b>Figure 47 : Mobilité électrophorétique des AuNCs déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose 4% après visualisation à 705 nm.</b> .....	87
<b>Figure 48 : Spectres d'absorbance entre 400 et 650 nm des AuNCs synthétisés (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7).</b> .....	88
<b>Figure 49 : Mesures d'absorption des AuNCs-CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7) en fonction du temps.</b> .....	89
<b>Figure 50 : Spectres de photoluminescence des AuNCs (0,2 mg/mL, H<sub>2</sub>O, pH 7).</b> .....	90
<b>Figure 51 : Translocation des AuNCs à travers une bicouche lipidique formée à l'interface de gouttelettes. A) Représentation schématisée de deux gouttelettes dans un compartiment de microfluidique en contact avec couche huileuse formée de phospholipides. B-C) Clichés de microscopie à champ sombre de la bicouche lipidique formée entre deux gouttelettes contenant, pour celle de gauche, un tampon + AuNC-CR<sub>9</sub> (B, couleur rosée) ou AuNC-CR<sub>3</sub> (C, couleur jaune) et pour celle à droite du tampon seulement. Le changement de couleur résultant du passage des AuNCs en fonction du temps est illustré dans les cases en dessous. D) Détection de AuNC-CR<sub>9</sub> au niveau des deux gouttelettes après 6 heures d'incubation (agrandissement x20).</b> .....	91
<b>Figure 52 : Quantification du transport passif des AuNCs à travers une bicouche lipidique artificielle. A) Intensité du signal lié aux AuNCs en fonction du temps (mesures prises sur une bicouche lipidique composée de DOPC/DOPE à un ratio molaire 2 : 1) ; B-C) Coefficient de perméabilité (jaune/violet) associé à l'énergie d'activation (E<sub>a</sub>, rouge) en fonction de bicouche lipidique aux compositions lipidiques différentes pour les AuNCs CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> ; D) Tracé d'Arrhenius du logarithme du coefficient de perméabilité (P) en fonction de l'inverse de la température absolue des membranes (même composition lipidique qu'en A).</b> .....	92
<b>Figure 53 : Viabilité cellulaire des cellules A549 après 72h d'incubation avec différentes concentrations de AuNCs (n = 3).</b> .....	94
<b>Figure 54 : Schéma simplifié de la formation d'auto assemblage entre les AuNCs et les siARNs.</b> .....	97
<b>Figure 55 : Etude de la complexation d'un siARN avec les différents AuNCs synthétisés par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. A) Détection à 705 nm +/- 20 nm des AuNCs après excitation à 405 nm (Qdot705). B) Détection à 537 nm du siARN après excitation à 300nm (SYBR Gold).</b> .....	98
<b>Figure 56 : Impact du ratio de masse AuNCs : siARN sur l'efficacité de complexation de ces 2 composés par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde d'émission de 705nm (A) et le siARN est observé à une longueur d'onde d'émission de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold (B).</b> .....	99
<b>Figure 57 : Etude de la taille et de la charge de surface des assemblages AuNCs/siARNs. A-B-C) Distribution de taille des complexes AuNCs/siARN déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS ; dans H<sub>2</sub>O pH7) ; D) Tableau résumant les tailles, les charges et les indices de polydispersité de chaque complexe AuNC/siARN.</b> .....	101
<b>Figure 58 : Caractérisations microscopiques des autoassemblages AuNCs/siARNs. A) Clichés de microscopie électronique en transmission des 3 AuNCs/siARNs étudiés. B) Diamètres des autoassemblages AuNCs/siARNs déterminés à partir des clichés de microscopie (n = 30). C) Clichés de microscopie électronique en transmission à balayage de l'autoassemblage AuNCs-CR<sub>3</sub>/siARNs.</b> .....	102
<b>Figure 59 : Spectres d'absorbance des AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A), CR<sub>3</sub> (B) et CR<sub>9</sub> (C) et du siARN complexés ou non dans l'eau entre 200 et 800 nm.</b> .....	103
<b>Figure 60 : Evaluation de la stabilité des complexes AuNC/siARN en fonction du temps par mesures des spectres d'absorbance entre 230 et 370 nm avec AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A) ou AuNC-CR<sub>3</sub> (B).</b> .....	104

<b>Figure 61 : Spectres de photoluminescence des différents AuNCs complexés ou non avec un siARN dans l'eau entre 500 et 800 nm. AuNC-SG-R<sub>2</sub> (A) AuNC-CR<sub>3</sub> (B) et AuNC-CR<sub>9</sub> (C). La photoluminescence a été quantifiée en déterminant l'aire sous chaque courbe. ....</b>	<b>105</b>
<b>Figure 62 : Activité de la luciférase chez des cellules A549-LUC après transfection avec des AuNC-SG-R<sub>2</sub> complexés à un siARN anti-luciférase. Le siARN (10 pmol, 100 pmol, 500 pmol ou 1 nmol) a été complexé aux AuNC-SG-R<sub>2</sub> avec des ratios de masse de 1:1 ou 10:1. ....</b>	<b>106</b>
<b>Figure 63 : Evaluation du rôle protecteur des AuNCs-CR<sub>3</sub> et CR<sub>9</sub> sur des siARNs incubés 15 min à 37°C dans H<sub>2</sub>O ou dans RNase A par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les siARNs sont observés à une longueur d'onde d'émission de 537 nm après incubation du gel dans du GelRed. ....</b>	<b>107</b>
<b>Figure 64 : Schéma simplifié représentant le protocole de transfection du système AuNCs/siARNs dans des cellules cancéreuses A549 avant analyse par microscopie confocale à fluorescence. ....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 65 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence de cellules A549 incubées avec les complexes AuNCs/siARNs. Le siARN est complexé avec de la Cyanine 5 et l'actine (membranes cellulaires) avec du CellMask green. Ratios de masse : AuNC-SG-R<sub>2</sub>/siARN = 8:1 ; AuNC-CR<sub>3</sub>/siARN = 5:1 ; AuNC-CR<sub>9</sub>/siARN = 3:1 ; quantité siARN par condition = 300 pmol ; incubation 4h à 37°C. ....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 66 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence de cellules A549 incubées avec les complexes AuNCs/siARNs. Le siARN est complexé avec de la Cyanine 5 et l'actine (membranes cellulaires) avec du CellMask green. Ratios de masse : AuNC-CR<sub>3</sub>/siARN = 5:1 ; AuNC-CR<sub>9</sub>/siARN = 3:1. ....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 67 : Protocole de transfection du système AuNCs/siARNs avant Western Blot. ....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 68 : Etude de l'expression relative de la protéine TRF2 après transfection avec les AuNCs complexés à un siARN anti TRF2 ou siARN contrôle (n=3). A) Analyse western blot ; B) Quantification de l'expression relative de la protéine TRF2 normalisée avec l'expression relative de la protéine GAPDH. Quantité de siARN complexée avec les AuNCs = 300 pmol (4,7 µg). Quantité de AuNC complexée avec les siARNs = 37,6 µg pour le AuNC-SG-R<sub>2</sub> (ratio de masse 8:1); 23,5 µg pour le AuNC-CR<sub>3</sub> (ratio de masse 5:1); 14,1 µg pour le AuNC-CR<sub>9</sub> (ratio de masse 3:1). ....</b>	<b>113</b>
<b>Figure 69 : Schéma simplifié de la procédure du test clonogénique réalisé sur des cellules A549 irradiées à différentes doses et préalablement transfectées avec le nanosystème AuNCs/siARNs anti TRF2. ....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 70 : Courbes de survie de cellules A549 ensemencées après traitements avec le nanosystème AuNCs-SG-R<sub>2</sub>/siARNs et irradiation à des doses croissantes. ....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 71 : Etude morphologique de cellules A549 transfectées avec le nanosystème AuNC-SG-R<sub>2</sub>/siARN après irradiation à des doses croissantes en Gy. ....</b>	<b>115</b>
<b>Figure 72 : Structure du composé n°12, une chaîne PEG conjuguée avec un Glc <i>via</i> le C1 et de la FITC. ....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 73 : Structure du composé n°13, une chaîne PEG conjuguée avec un Glc <i>via</i> le C6 et de la FITC. ....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 74 : Structure du composé n°17, une chaîne PEG conjuguée avec un RAFT-4Glc <i>via</i> le C1 et de la FITC. ....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 75 : Structure du composé n°18, une chaîne PEG conjuguée avec un RAFT-4Glc <i>via</i> le C6 et de la FITC. ....</b>	<b>121</b>
<b>Figure 76 : Structure du composé n° 1. ....</b>	<b>123</b>
<b>Figure 77 : Représentation schématique de la procédure de Synthèse Peptidique sur Support Solide (SPPS) stratégie Fmoc/tBu. ....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 78 : A) Chromatogramme RP-UPLC du composé 13 purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-100% en solvant B ; temps de rétention = 6 min. B) Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé 13 purifié. m/z calculé pour [M+H]<sup>+</sup> = 910,3 ; m/z trouvé = 909,30. ....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 79 : A) Chromatogramme RP-UPLC du composé 17 purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide</b>	

formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-60% en solvant B ; temps de rétention = 9 min. <b>B)</b> Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé <b>17</b> purifié. m/z calculé pour [M+H] <sup>+</sup> = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08. ....	130
<b>Figure 81 : Structure du glycoconjugué 4Glc-RAFT-PEG-Cya5 (composé 19).</b> ....	131
<b>Figure 80 : A)</b> Chromatogramme RP-UPLC du composé <b>18</b> purifié. Purification par RP-HPLC avec un contrôle UV à 214 et 250 nm en utilisant un gradient linéaire de solvant A-B (solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Gradient utilisé = 5-60% en solvant B ; temps de rétention = 9 min. <b>B)</b> Analyse de spectrométrie de masse à haute résolution du composé <b>18</b> purifié. m/z calculé pour [M+H] <sup>+</sup> = 2590,69 ; m/z trouvé = 2589,08. ....	131
<b>Figure 82 : Analyse ESI-MS du composé 19 purifié.</b> m/z calculé pour [M+H] <sup>+</sup> = 2825,07 ; m/z trouvé = 2824,23. ....	132
<b>Figure 83 : Etude de l'interaction des glycoconjugués marqués à la fluorescéine avec des cellules A549.</b> Incubation avec chaque glycoconjugué 3 h à 50 µM. <b>A)</b> Intensités de fluorescence des différents glycoconjugués par analyse en cytométrie en flux. Filtre FL1-A : Emission à 488nm. <b>B)</b> Tableau reprenant les moyennes d'intensité de fluorescence par glycoconjugués. ....	134
<b>Figure 84 : Etude de l'interaction du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-FITC (18) avec des cellules A549.</b> Incubation 3 h avec le glycoconjugué à des concentrations croissantes allant de 0,5 à 50 µM. <b>A)</b> Intensités de fluorescence du glycoconjugué par analyse en cytométrie en flux. Filtre FL1-A : Emission à 488nm. <b>B)</b> Tableau reprenant les moyennes d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en glycoconjugué. ....	135
<b>Figure 85 : Comparaison des capacités d'interaction cellulaire des composés 18 et 19 par cytométrie en flux.</b> Incubation 3 h avec chaque glycoconjugué à 10 µM. <b>A)</b> Intensité de fluorescence du glycoconjugué <b>18</b> par analyse en cytométrie en flux. Filtre BL1-A : Emission à 488 nm. <b>B)</b> Intensité de fluorescence du glycoconjugué <b>19</b> par analyse en cytométrie en flux. Filtre RL1-A : Emission à 670 nm. ....	136
<b>Figure 86 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence représentant l'internalisation du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) incubé pendant 5, 15, 30 min ou 1h dans des cellules cancéreuses A549 à 37°C.</b> Les membranes cellulaires (actine) ont été marquées avec du CellMask (Emission : 535 nm) et le siARN avec de la cyanine 5 (Emission : 710 nm). ....	137
<b>Figure 87 : Quantification de l'intensité de fluorescence dans des cellules A549 incubées à différents temps avec le composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19).</b> Fluorescence Cellulaire Totale Corrigée (CTCF) = Densité intégrée – (Aire de la cellule . Fluorescence moyenne du bruit de fond). Les données exprimées sont la moyenne (+/- SEM) de CTCF quantifiée dans chaque cellule (n=30). Pour les comparaisons statistiques, un test one-way ANOVA a été réalisé ; * p<0,05, **** p<0,001. ....	138
<b>Figure 88 : Structure de l'inhibiteur BAY-876</b> (496,1 g/mol; IC50 = 2 nM). ....	138
<b>Figure 89 : Etude de l'interaction du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) avec des cellules A549 en présence ou non d'inhibiteur de GLUT1 BAY-876.</b> Incubation des cellules pré-traitées ou non 5 minutes avec 20 µM de BAY-876 puis avec le glycoconjugué 15 min ou 1 h à 10 µM. ....	139
<b>Figure 90 : Etude du mécanisme de pénétration du glycoconjugué 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) dans des cellules A549 par microscopie à fluorescence.</b> L'intensité de fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) a été quantifiée les cellules A549 incubées ou non (NT) 15 minutes avec le glycoconjugué à 4 ou 37°C et en absence (-) ou en présence (+) d'inhibiteur de GLUT1 BAY-876. CTCF = Densité intégrée – (Aire de la cellule . Fluorescence moyenne du bruit de fond). Les données exprimées correspondent à la moyenne de CTCF quantifiée dans chaque cellule (n=30). ....	140
<b>Figure 91 : Clichés de microscopie confocale à fluorescence représentant l'internalisation du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) dans des cellules cancéreuses A549 après 15 minutes d'incubation à 4 ou 37°C et en absence ou en présence d'inhibiteur BAY-876.</b> Les membranes cellulaires (actine) ont été marquées avec du CellMask (Emission : 535 nm) et le glycoconjugué avec de la cyanine 5 (Emission : 710 nm). ....	141
<b>Figure 92 : Evaluation des taux d'interaction du composé 4Glc(C6)-RAFT-PEG-Cy5 (19) en fonction du taux d'expression de GLUT1 chez des lignées cellulaires cancéreuses HT29 et</b>	

---

<b>SKMel28.</b> Expressions relatives de GLUT1 chez des lignées HT29 et SKMel28 déterminées par western blot et normalisées avec l'expression de l'actine (n=3) <b>(A)</b> . Interaction du composé <b>19</b> 5, 10 ou 15 min avec les lignées HT29 <b>(B)</b> et SKMel28 <b>(C)</b> par cytométrie en flux.....	142
<b>Figure 93 :</b> Spectre UPLC-MS du composé <b>26</b> purifié. m/z calculé pour [M+H] <sup>+</sup> = 2720,28 ; m/z trouvé = 2719,94.....	145
<b>Figure 94 :</b> Etude de la complexation des siARNs avec des concentrations croissantes de AuNCs-4Glc-R <sub>2</sub> par électrophorèse sur gel d'agarose 4%. Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde de 705 nm <b>(A)</b> et le siARN est observé à une longueur d'onde de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold <b>(B)</b> . La quantité de siARNs par condition est de 4,7 µg (300 pmol). Les quantités de AuNCs-4Glc-R <sub>2</sub> testés sont de 20, 60, 100, 160 et 200 µg.....	145
<b>Figure 95 :</b> Etude de la complexation d'siARN avec les différents AuNCs par électrophorèse sur gel d'agarose (gel 4% ; 45 minutes à 100 V). Les AuNCs sont observés à une longueur d'onde de 705 nm <b>(A)</b> et les siARNs observés à une longueur d'onde de 537 nm après incubation du gel dans du SYBR gold <b>(B)</b> .....	147
<b>Figure 96 :</b> Illustration du fonctionnement des systèmes ZFN, TALEN et CRISPR Cas9. Issue de Shim et al. 2017. ....	153
<b>Figure 97 :</b> Amélioration de l'effet radiosensibilisant sur le nombre de cellules tumorales de glioblastome entrant en nécrose après une exposition aux rayons ionisants en présence de AuNCs-SG-R <sub>2</sub> .....	155
<b>Figure 98 :</b> Illustration simplifiée représentant la différence d'interaction entre un ligand monovalent et un ligand multivalent. Issue de Jeong et al. 2018. ....	157
<b>Figure 99 :</b> Structure du composé <b>26</b> , glycoconjugué formé de 4Glc(C6)-RAFT-PEG-2Arg-Acide lipoïque, greffé sur les AuNCs au cours de l'axe 4 du projet de thèse. ....	158
<b>Figure 100 :</b> Imagerie SWIR d'une souris avec une tumeur du sein implantée en orthoptique après injection intraveineuse de AuNCs-SG-R <sub>2</sub> (200 µL ; 300 µM). λ <sub>exc.</sub> 808 nm ; λ <sub>em.</sub> =1250-1700 nm. ....	160

# Bibliographie

1. Hecht, S.S., *Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(10): p. 733-744.
2. Peto, R., J. Boreham, and A.D. Lopez, *Mortality from smoking in developed countries*. 1996: Oxford university press.
3. Brândaș, C.-A., R.V. Roșu, and C.M. Pop, *Diagnosis particularities of lung cancer in a young patient without external risk factors—A case report*. Pneumologia. **69**(4): p. 256-259.
4. Organization, W.H., *International agency for research on cancer*. 2019.
5. Jemal, A., et al., *Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends* *Global Patterns of Cancer*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 2010. **19**(8): p. 1893-1907.
6. Kim, D., Y.Y. Jeong, and S. Jon, *A drug-loaded aptamer–gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer*. ACS nano, 2010. **4**(7): p. 3689-3696.
7. Chaturvedi, V.K., et al., *Cancer nanotechnology: a new revolution for cancer diagnosis and therapy*. Current drug metabolism, 2019. **20**(6): p. 416-429.
8. Morris, M., *Fluorescent biosensors for cancer cell imaging and diagnostics*. Biosensors and Cancer, 2012: p. 101-124.
9. Miller, K.D., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(4): p. 271-89.
10. Pignon, J.-P., et al., *Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group*, in *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-Assessed Reviews [Internet]*. 2008, Centre for Reviews and Dissemination (UK).
11. Deb, D., A.C. Moore, and U.B. Roy, *The 2021 global lung cancer therapy landscape*. Journal of Thoracic Oncology, 2022. **17**(7): p. 931-936.
12. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
13. Chae, Y.K., et al., *Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Journal for immunotherapy of cancer, 2018. **6**: p. 1-27.
14. Hussaini, S., et al., *Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors—a systematic review and meta-analysis*. Cancer treatment reviews, 2021. **92**: p. 102134.
15. Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. Nature Reviews Immunology, 2020. **20**(11): p. 651-668.
16. Baskar, R., et al., *Cancer and radiation therapy: current advances and future directions*. International journal of medical sciences, 2012. **9**(3): p. 193.
17. Vinod, S.K. and E. Hau, *Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions*. Respiriology, 2020. **25**: p. 61-71.
18. Reck, M., et al., *Management of non-small-cell lung cancer: recent developments*. The Lancet, 2013. **382**(9893): p. 709-719.
19. Tang, L., et al., *Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 87.
20. Yang, L., et al., *LncRNAs regulate cancer metastasis via binding to functional proteins*. Oncotarget, 2018. **9**(1): p. 1426.
21. Chen, X., et al., *Autophagy enhanced the radioresistance of non-small cell lung cancer by regulating ROS level under hypoxia condition*. International Journal of Radiation Biology, 2017. **93**(8): p. 764-770.
22. Yoshida, G.J. and H. Saya, *Therapeutic strategies targeting cancer stem cells*. Cancer science, 2016. **107**(1): p. 5-11.
23. Chan, R., et al., *Investigating the radioresistant properties of lung cancer stem cells in the context of the tumor microenvironment*. Radiation research, 2016. **185**(2): p. 169-181.
24. Chen, Y., et al., *14-3-3 $\sigma$  contributes to radioresistance by regulating DNA repair and cell cycle via PARP1 and CHK2*. Molecular Cancer Research, 2017. **15**(4): p. 418-428.
25. Unruh, A., et al., *The hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a negative factor for tumor therapy*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3213-3220.
26. Xie, G., et al., *Hypoxia-induced angiotensin II by the lactate-chymase-dependent mechanism mediates radioresistance of hypoxic tumor cells*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 42396.
27. Toulany, M., et al., *Impact of oncogenic K-RAS on YB-1 phosphorylation induced by ionizing radiation*. Breast Cancer Research, 2011. **13**: p. 1-14.

28. Berardinelli, F., et al., *Targeting telomerase and telomeres to enhance ionizing radiation effects in in vitro and in vivo cancer models*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2017. **773**: p. 204-219.
29. Giardini, M.A., et al., *Telomere and telomerase biology*. Progress in molecular biology and translational science, 2014. **125**: p. 1-40.
30. Henson, J.D., et al., *Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells*. oncogene, 2002. **21**(4): p. 598-610.
31. de Lange, T., *Shelterin-mediated telomere protection*. Annual review of genetics, 2018. **52**: p. 223-247.
32. Chen, C., et al., *Structural insights into POT1-TPP1 interaction and POT1 C-terminal mutations in human cancer*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 14929.
33. Soler, D., et al., *Radiation sensitivity increases with proliferation-associated telomere dysfunction in nontransformed human epithelial cells*. Aging cell, 2009. **8**(4): p. 414-425.
34. Wong, K.-K., et al., *Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation*. Nature genetics, 2000. **26**(1): p. 85-88.
35. Genescà, A., et al., *Telomere dysfunction: a new player in radiation sensitivity*. Bioessays, 2006. **28**(12): p. 1172-1180.
36. Castella, M., et al., *Telomere length modulates human radiation sensitivity in vitro*. Toxicology letters, 2007. **172**(1-2): p. 29-36.
37. Berardinelli, F., et al., *Telomere loss, not average telomere length, confers radiosensitivity to TK6-irradiated cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012. **740**(1-2): p. 13-20.
38. Sabatier, L., et al., *The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line*. Molecular cancer research, 2005. **3**(3): p. 139-150.
39. Goytisolo, F.A., et al., *Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(11): p. 1625-1636.
40. Drissi, R., et al., *Telomere shortening alters the kinetics of the DNA damage response after ionizing radiation in human cells*. Cancer Prevention Research, 2011. **4**(12): p. 1973-1981.
41. Callén, E. and J. Surrallés, *Telomere dysfunction in genome instability syndromes*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2004. **567**(1): p. 85-104.
42. Goytisolo, F.A. and M.A. Blasco, *Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 584-591.
43. Qiang, W., et al., *Suppression of telomere-binding protein TPP1 resulted in telomere dysfunction and enhanced radiation sensitivity in telomerase-negative osteosarcoma cell line*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **445**(2): p. 363-368.
44. Yang, L., et al., *Telomere-binding protein TPP1 modulates telomere homeostasis and confers radioresistance to human colorectal cancer cells*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e81034.
45. Zhou, F.-X., et al., *cDNA expression analysis of a human radiosensitive-radioresistant cell line model identifies telomere function as a hallmark of radioresistance*. Radiation research, 2010. **174**(5): p. 550-557.
46. Ferrandon, S., et al., *Telomere profiling: toward glioblastoma personalized medicine*. Molecular neurobiology, 2013. **47**: p. 64-76.
47. Turner, K.J., V. Vasu, and D.K. Griffin, *Telomere biology and human phenotype*. Cells, 2019. **8**(1): p. 73.
48. Guo, X., et al., *Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis*. The EMBO journal, 2007. **26**(22): p. 4709-4719.
49. Takai, K.K., et al., *Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2*. Molecular cell, 2011. **44**(4): p. 647-659.
50. Markiewicz-Potoczny, M., et al., *TRF2-mediated telomere protection is dispensable in pluripotent stem cells*. Nature, 2021. **589**(7840): p. 110-115.
51. Orun, O., P.M. Tiber, and N. Serakinci, *Partial knockdown of TRF2 increase radiosensitivity of human mesenchymal stem cells*. Int J Biol Macromol, 2016. **90**: p. 53-8.
52. Yang, X., et al., *Knockdown of telomeric repeat binding factor 2 enhances tumor radiosensitivity regardless of telomerase status*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2015. **141**: p. 1545-1552.
53. Hutvagner, G., *Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation*. FEBS letters, 2005. **579**(26): p. 5850-5857.
54. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans*. The plant cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
55. Kubczak, M., et al., *Nanoparticles for local delivery of siRNA in lung therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021. **179**: p. 114038.

56. Hu, B., et al., *Therapeutic siRNA: state of the art*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 101.
57. Moffatt, S., *siRNA-based nanoparticles for cancer therapy: hurdles and hopes*. MOJ. Proteomics Bioinform, 2016. **4**(00142.10): p. 15406.
58. Artiga, Á., et al., *Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery*. Journal of Materials Chemistry B, 2019. **7**(6): p. 876-896.
59. Kanasty, R., et al., *Delivery materials for siRNA therapeutics*. Nature materials, 2013. **12**(11): p. 967-977.
60. Kanasty, R.L., et al., *Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles*. Molecular Therapy, 2012. **20**(3): p. 513-524.
61. Ui-Tei, K., et al., *Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect*. Nucleic acids research, 2008. **36**(22): p. 7100-7109.
62. Maguregui, A. and H. Abe, *Developments in siRNA modification and ligand conjugated delivery to enhance RNA interference ability*. ChemBioChem, 2020. **21**(13): p. 1808-1815.
63. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.
64. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. The EMBO journal, 2001. **20**(23): p. 6877-6888.
65. Cummins, L.L., et al., *Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity*. Nucleic acids research, 1995. **23**(11): p. 2019-2024.
66. Foster, D.J., et al., *Advanced siRNA designs further improve in vivo performance of GalNAc-siRNA conjugates*. Molecular Therapy, 2018. **26**(3): p. 708-717.
67. Suzuki, Y. and H. Ishihara, *Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2021. **41**: p. 100424.
68. Shyng, C., et al., *Synergistic effects of treating the spinal cord and brain in CLN1 disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(29): p. E5920-E5929.
69. Rodriguez-Gascon, A., et al., *Vaginal gene therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **92**: p. 71-83.
70. Lukashev, A. and A. Zamyatnin, *Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives*. Biochemistry (Moscow), 2016. **81**: p. 700-708.
71. Zhao, Z., P. Qin, and Y.-W. Huang, *Lysosomal ion channels involved in cellular entry and uncoating of enveloped viruses: Implications for therapeutic strategies against SARS-CoV-2*. Cell Calcium, 2021. **94**: p. 102360.
72. Tian, Y., et al., *Integration of cell-penetrating peptides with rod-like bionanoparticles: virus-inspired gene-silencing technology*. Nano Letters, 2018. **18**(9): p. 5453-5460.
73. Mun, J.-Y., et al., *Minicircle microporation-based non-viral gene delivery improved the targeting of mesenchymal stem cells to an injury site*. Biomaterials, 2016. **101**: p. 310-320.
74. Subhan, M.A. and V. Torchilin, *siRNA based drug design, quality, delivery and clinical translation*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2020. **29**: p. 102239.
75. Mousazadeh, H., et al., *Cyclodextrin based natural nanostructured carbohydrate polymers as effective non-viral siRNA delivery systems for cancer gene therapy*. Journal of Controlled Release, 2021. **330**: p. 1046-1070.
76. Kozielski, K.L., et al., *Cancer-selective nanoparticles for combinatorial siRNA delivery to primary human GBM in vitro and in vivo*. Biomaterials, 2019. **209**: p. 79-87.
77. Joudeh, N. and D. Linke, *Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists*. Journal of Nanobiotechnology, 2022. **20**(1): p. 262.
78. Roduner, E., *Size matters: why nanomaterials are different*. Chemical society reviews, 2006. **35**(7): p. 583-592.
79. Xin, Y., et al., *Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy*. Molecular cancer, 2017. **16**(1): p. 1-9.
80. Pan, K. and Q. Zhong, *Organic nanoparticles in foods: fabrication, characterization, and utilization*. Annual Review of Food Science and Technology, 2016. **7**: p. 245-266.
81. Adams, D., et al., *Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis*. New England Journal of Medicine, 2018. **379**(1): p. 11-21.
82. Georgilis, E., et al., *Nanoparticles based on natural, engineered or synthetic proteins and polypeptides for drug delivery applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2020. **586**: p. 119537.
83. Majeed, C.N., et al., *Spotlight on givosiran as a treatment option for adults with acute hepatic porphyria: design, development, and place in therapy*. Drug Design, Development and Therapy, 2022: p. 1827-1845.

84. Balwani, M., et al., *Phase 3 trial of RNAi therapeutic givosiran for acute intermittent porphyria*. New England journal of medicine, 2020. **382**(24): p. 2289-2301.
85. Ealia, S.A.M. and M.P. Saravanakumar. *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*. in *IOP conference series: materials science and engineering*. 2017. IOP Publishing.
86. Mitchell, M.J., et al., *Engineering precision nanoparticles for drug delivery*. Nature reviews drug discovery, 2021. **20**(2): p. 101-124.
87. Wittrup, A., et al., *Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown*. Nature biotechnology, 2015. **33**(8): p. 870-876.
88. Mauter, M.S. and M. Elimelech, *Environmental applications of carbon-based nanomaterials*. Environmental science & technology, 2008. **42**(16): p. 5843-5859.
89. Oh, W.-K., H. Yoon, and J. Jang, *Size control of magnetic carbon nanoparticles for drug delivery*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1342-1348.
90. Baranwal, A., et al., *Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 422.
91. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. Nature biotechnology, 2015. **33**(9): p. 941-951.
92. Su, X., et al., *Phospholipid encapsulated AuNR@ Ag/Au nanosphere SERS tags with environmental stimulus responsive signal property*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(16): p. 10201-10211.
93. Thies, S., et al., *In situ growth and size regulation of single gold nanoparticles in composite microgels*. Small, 2018. **14**(51): p. 1803589.
94. Park, J.S., E.-Y. Ahn, and Y. Park, *Asymmetric dumbbell-shaped silver nanoparticles and spherical gold nanoparticles green-synthesized by mangosteen (Garcinia mangostana) pericarp waste extracts*. International journal of nanomedicine, 2017: p. 6895-6908.
95. Zhang, T., et al., *Single-particle spectroscopic study on fluorescence enhancement by plasmon coupled gold nanorod dimers assembled on DNA origami*. The journal of physical chemistry letters, 2015. **6**(11): p. 2043-2049.
96. Battogtokh, G., et al., *Glycol chitosan-coated near-infrared photosensitizer-encapsulated gold nanocages for glioblastoma phototherapy*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2019. **18**: p. 315-325.
97. Sarfraz, N. and I. Khan, *Plasmonic gold nanoparticles (AuNPs): properties, synthesis and their advanced energy, environmental and biomedical applications*. Chemistry—An Asian Journal, 2021. **16**(7): p. 720-742.
98. Musnier, B., et al., *High photoluminescence of shortwave infrared-emitting anisotropic surface charged gold nanoclusters*. Nanoscale, 2019. **11**(25): p. 12092-12096.
99. Liu, H., et al., *Atomic-precision gold clusters for NIR-II imaging*. Advanced materials, 2019. **31**(46): p. 1901015.
100. Yu, Z., et al., *v. josseland and X. Le Guével*. ACS Nano, 2020. **14**: p. 4973-4981.
101. Goswami, N., et al., *Luminescent metal nanoclusters with aggregation-induced emission*. The journal of physical chemistry letters, 2016. **7**(6): p. 962-975.
102. Zhou, M. and R. Jin, *Optical Properties and Excited-State Dynamics of Atomically Precise Gold Nanoclusters*. Annual Review of Physical Chemistry, 2021. **72**: p. 121-142.
103. Zheng, J., P.R. Nicovich, and R.M. Dickson, *Highly fluorescent noble-metal quantum dots*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007. **58**: p. 409-431.
104. Qian, H., et al., *Quantum sized gold nanoclusters with atomic precision*. Accounts of chemical research, 2012. **45**(9): p. 1470-1479.
105. Le Guevel, X., et al., *Ligand effect on the size, valence state and red/near infrared photoluminescence of bidentate thiol gold nanoclusters*. Nanoscale, 2014. **6**(14): p. 8091-8099.
106. Pyo, K., et al., *Ultrabright luminescence from gold nanoclusters: rigidifying the Au (I)-thiolate shell*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(25): p. 8244-8250.
107. Meric, F., et al., *Positive surgical margins and ipsilateral breast tumor recurrence predict disease-specific survival after breast-conserving therapy*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2003. **97**(4): p. 926-933.
108. Nagtegaal, I.D. and P. Quirke, *What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer?* Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(2): p. 303-312.
109. Chalfin, H.J., et al., *Impact of surgical margin status on prostate-cancer-specific mortality*. BJU international, 2012. **110**(11): p. 1684-1689.
110. Snijder, R.J., et al., *Survival in resected stage I lung cancer with residual tumor at the bronchial resection margin*. The Annals of thoracic surgery, 1998. **65**(1): p. 212-216.
111. Singh, P., et al., *Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(7): p. 1979.

112. Vahrmeijer, A.L., et al., *Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence*. Nature reviews Clinical oncology, 2013. **10**(9): p. 507-518.
113. Liu, J.T. and N. Sanai, *Trends and challenges for the clinical adoption of fluorescence-guided surgery*. Journal of Nuclear Medicine, 2019. **60**(6): p. 756-757.
114. Young, A.R., *Chromophores in human skin*. Physics in Medicine & Biology, 1997. **42**(5): p. 789.
115. Martin, J.P., N.R. Fetto, and M.J. Tucker, *Comparison of biological chromophores: photophysical properties of cyanophenylalanine derivatives*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016. **18**(30): p. 20750-20757.
116. Hong, G., A.L. Antaris, and H. Dai, *Near-infrared fluorophores for biomedical imaging*. Nature biomedical engineering, 2017. **1**(1): p. 0010.
117. He, S., et al., *Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores: design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics*. Chemical Society Reviews, 2018. **47**(12): p. 4258-4278.
118. Viana, B., et al., *NIR-persistent luminescence nanoparticles for bioimaging, principle and perspectives*. Near Infrared-Emitting Nanoparticles for Biomedical Applications, 2020: p. 163-197.
119. Tiwari, P.M., et al., *Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications*. Nanomaterials, 2011. **1**(1): p. 31-63.
120. Ghosh, P., et al., *Gold nanoparticles in delivery applications*. Advanced drug delivery reviews, 2008. **60**(11): p. 1307-1315.
121. Yafout, M., et al., *Gold nanoparticles as a drug delivery system for standard chemotherapeutics: A new lead for targeted pharmacological cancer treatments*. Scientific African, 2021. **11**: p. e00685.
122. Pędzwiatri-Werbicka, E., et al., *Evaluation of dendronized gold nanoparticles as siRNAs carriers into cancer cells*. Journal of Molecular Liquids, 2021. **324**: p. 114726.
123. Lei, Y., et al., *Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15130.
124. Kotcherlakota, R., et al., *Engineered fusion protein-loaded gold nanocarriers for targeted co-delivery of doxorubicin and erbB2-siRNA in human epidermal growth factor receptor-2+ ovarian cancer*. Journal of Materials Chemistry B, 2017. **5**(34): p. 7082-7098.
125. Kumar, K., et al., *Efficacious cellular codelivery of doxorubicin and EGFP siRNA mediated by the composition of PLGA and PEI protected gold nanoparticles*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017. **27**(18): p. 4288-4293.
126. Chen, Y.-H., et al., *Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model*. Molecular pharmaceutics, 2007. **4**(5): p. 713-722.
127. Brown, S.D., et al., *Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(13): p. 4678-4684.
128. Ali, M.M., N.A. Rajab, and A.A. Abdulrasool, *Etoposide-loaded gold nanoparticles: preparation, characterization, optimization and cytotoxicity assay*. Syst. Rev. Pharm, 2020. **11**(2): p. 372-381.
129. Wang, F., et al., *Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells*. ACS nano, 2011. **5**(5): p. 3679-3692.
130. Attix, F.H., *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. 2008: John Wiley & Sons.
131. Cui, L., et al., *Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic?* Radiotherapy and Oncology, 2017. **124**(3): p. 344-356.
132. Carter, J.D., et al., *Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures*. The journal of physical chemistry B, 2007. **111**(40): p. 11622-11625.
133. Chen, Y., et al., *Gold nanoparticles as radiosensitizers in cancer radiotherapy*. International Journal of nanomedicine, 2020: p. 9407-9430.
134. Albayedh, F. and J.C. Chow, *Monte Carlo simulation on the imaging contrast enhancement in nanoparticle-enhanced radiotherapy*. Journal of medical physics, 2018. **43**(3): p. 195.
135. Singh, M., et al., *Application of gold nanorods for photothermal therapy in ex vivo human oesophagogastric adenocarcinoma*. Journal of biomedical nanotechnology, 2016. **12**(3): p. 481-490.
136. Parida, S., et al., *Gold nanorod embedded reduction responsive block copolymer micelle-triggered drug delivery combined with photothermal ablation for targeted cancer therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2017. **1861**(1): p. 3039-3052.
137. Singh, S.P., et al., *NIR triggered liposome gold nanoparticles entrapping curcumin as in situ adjuvant for photothermal treatment of skin cancer*. International journal of biological macromolecules, 2018. **110**: p. 375-382.
138. Allegra, A., et al., *Nanoparticles in oncology: the new theragnostic molecules*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2011. **11**(7): p. 669-686.
139. Ntziachristos, V., et al., *Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(6): p. 2767-2772.

140. Pitsillides, C.M., et al., *Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles*. Biophysical journal, 2003. **84**(6): p. 4023-4032.
141. Lin, J., et al., *Photosensitizer-loaded gold vesicles with strong plasmonic coupling effect for imaging-guided photothermal/photodynamic therapy*. ACS nano, 2013. **7**(6): p. 5320-5329.
142. Ikeda-Imafuku, M., et al., *Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation*. Journal of Controlled Release, 2022. **345**: p. 512-536.
143. Longmire, M., P.L. Choyke, and H. Kobayashi, *Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats*. 2008.
144. Ma, N., et al., *Shape-dependent radiosensitization effect of gold nanostructures in cancer radiotherapy: comparison of gold nanoparticles, nanospikes, and nanorods*. ACS applied materials & interfaces, 2017. **9**(15): p. 13037-13048.
145. Nagy, J.A., et al. *Heterogeneity of the tumor vasculature*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2010. © Thieme Medical Publishers.
146. Ojha, T., et al., *Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors*. Advanced drug delivery reviews, 2017. **119**: p. 44-60.
147. Marjanovic, N.D., R.A. Weinberg, and C.L. Chaffer, *Cell plasticity and heterogeneity in cancer*. Clinical chemistry, 2013. **59**(1): p. 168-179.
148. Hiratsuka, S., *Vasculogenesis, angiogenesis and special features of tumor blood vessels*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2011. **16**(4): p. 1413-1427.
149. Tong, X., et al., *Size dependent kinetics of gold nanorods in EPR mediated tumor delivery*. Theranostics, 2016. **6**(12): p. 2039.
150. Tan, Y.F., et al., *Controlled-release nanotherapeutics: State of translation*. Journal of controlled release, 2018. **284**: p. 39-48.
151. Deng, D. and N. Yan, *GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters*. Protein Science, 2016. **25**(3): p. 546-558.
152. Galant, A., R. Kaufman, and J. Wilson, *Glucose: Detection and analysis*. Food chemistry, 2015. **188**: p. 149-160.
153. Deng, D., et al., *Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 121-5.
154. Deng, D., et al., *Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters*. Nature, 2015. **526**(7573): p. 391-396.
155. Faham, S., et al., *The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/sugar symport*. Science, 2008. **321**(5890): p. 810-814.
156. Xu, Y., et al., *Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 448-452.
157. Uldry, M. and B. Thorens, *The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters*. Pflügers Archiv, 2004. **447**: p. 480-489.
158. Joost, H.-G. and B. Thorens, *The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members*. Molecular membrane biology, 2001. **18**(4): p. 247-256.
159. Yan, N., *Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters*. Trends in biochemical sciences, 2013. **38**(3): p. 151-159.
160. Lienhard, G.E., et al., *How cells absorb glucose*. Scientific American, 1992. **266**(1): p. 86-91.
161. Blodgett, D.M., C. Graybill, and A. Carruthers, *Analysis of glucose transporter topology and structural dynamics*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(52): p. 36416-36424.
162. Salas-Burgos, A., et al., *Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules*. Biophysical journal, 2004. **87**(5): p. 2990-2999.
163. Uldry, M., et al., *GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter*. FEBS letters, 2002. **524**(1-3): p. 199-203.
164. Takata, K., et al., *Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers*. Biochemical and biophysical research communications, 1990. **173**(1): p. 67-73.
165. Zhao, F., D. Glimm, and J. Kennelly, *Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues*. The International journal of biochemistry, 1993. **25**(12): p. 1897-1903.
166. Johnson, J.H., et al., *The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(12): p. 6548-6551.
167. Colville, C.A., et al., *Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in Xenopus oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors*. Biochemical journal, 1993. **290**(3): p. 701-706.

168. Haber, R.S., et al., *Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter*. *Endocrinology*, 1993. **132**(6): p. 2538-2543.
169. Kasahara, T. and M. Kasahara, *Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1997. **1324**(1): p. 111-119.
170. Rumsey, S.C., et al., *Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* Oocytes and isolated rat adipocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(36): p. 28246-28253.
171. Burant, C., et al., *Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(21): p. 14523-14526.
172. Rand, E., et al., *Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1993. **264**(6): p. G1169-G1176.
173. DOEGE, H., et al., *Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes*. *Biochemical Journal*, 2000. **350**(3): p. 771-776.
174. Zhao, F.-Q. and A.F. Keating, *Functional properties and genomics of glucose transporters*. *Current genomics*, 2007. **8**(2): p. 113-128.
175. Li, Q., et al., *Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004. **287**(1): p. G236-G242.
176. Ibberson, M., M. Uldry, and B. Thorens, *GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(7): p. 4607-4612.
177. Doblado, M. and K.H. Moley, *Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2009. **297**(4): p. E831-E835.
178. Anzai, N., et al., *Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans*. *Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(40): p. 26834-26838.
179. Dawson, P.A., et al., *Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1*. *Molecular genetics and metabolism*, 2001. **74**(1-2): p. 186-199.
180. McVie-Wylie, A.J., D.R. Lamson, and Y. Chen, *Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13. 1: a candidate gene for NIDDM susceptibility*. *Genomics*, 2001. **72**(1): p. 113-117.
181. Wu, X., et al., *Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues*. *Molecular genetics and metabolism*, 2002. **76**(1): p. 37-45.
182. Sasaki, T., et al., *Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001. **289**(5): p. 1218-1224.
183. Rogers, S., et al., *Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003. **308**(3): p. 422-426.
184. Rogers, S., et al., *Identification of a novel glucose transporter-like protein—GLUT-12*. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2002. **282**(3): p. E733-E738.
185. Uldry, M., et al., *Identification of a mammalian H<sup>+</sup>-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain*. *The EMBO journal*, 2001. **20**(16): p. 4467-4477.
186. Wu, X. and H.H. Freeze, *GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms*. *Genomics*, 2002. **80**(6): p. 553-557.
187. Galochkina, T., et al., *New insights into GluT1 mechanics during glucose transfer*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 998.
188. Chari, R.V., M.L. Miller, and W.C. Widdison, *Antibody–drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014. **53**(15): p. 3796-3827.
189. Kim, M., et al., *Applications of cancer cell-specific aptamers in targeted delivery of anticancer therapeutic agents*. *Molecules*, 2018. **23**(4): p. 830.
190. Fu, J., et al., *Glycoconjugates for glucose transporter-mediated cancer-specific targeting and treatment*. *Carbohydrate Research*, 2020. **498**: p. 108195.
191. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
192. Szablewski, L., *Expression of glucose transporters in cancers*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1835**(2): p. 164-9.
193. Macheda, M.L., S. Rogers, and J.D. Best, *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer*. *Journal of cellular physiology*, 2005. **202**(3): p. 654-662.

194. Barron, C.C., et al., *Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment*. Metabolism, 2016. **65**(2): p. 124-139.
195. Ancey, P.B., C. Contat, and E. Meylan, *Glucose transporters in cancer—from tumor cells to the tumor microenvironment*. The FEBS journal, 2018. **285**(16): p. 2926-2943.
196. Higashi, K., et al., *Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with [18 F] FDG uptake in non-small cell lung cancer*. European journal of nuclear medicine, 2000. **27**: p. 1778-1785.
197. Pezzuto, A., et al., *Expression and role of p16 and GLUT1 in malignant diseases and lung cancer: a review*. Thoracic cancer, 2020. **11**(11): p. 3060-3070.
198. Choi, W.H., et al., *Is the Glut expression related to FDG uptake in PET/CT of non-small cell lung cancer patients?* Technology and Health Care, 2015. **23**(s2): p. S311-S318.
199. Ancey, P.-B., et al., *GLUT1 expression in tumor-associated neutrophils promotes lung cancer growth and resistance to radiotherapy*. Cancer research, 2021. **81**(9): p. 2345-2357.
200. Suzawa, N., et al., *Assessment of factors influencing FDG uptake in non-small cell lung cancer on PET/CT by investigating histological differences in expression of glucose transporters 1 and 3 and tumour size*. Lung Cancer, 2011. **72**(2): p. 191-198.
201. Berghmans, T., et al., *Primary tumor standardized uptake value (SUVmax) measured on fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) is of prognostic value for survival in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis (MA) by the European Lung Cancer Working Party for the IASLC Lung Cancer Staging Project*. Journal of Thoracic Oncology, 2008. **3**(1): p. 6-12.
202. Higashi, T., et al., *Expression of glucose transporters in human pancreatic tumors compared with increased FDG accumulation in PET study*. Journal of Nuclear Medicine, 1997. **38**(9): p. 1337-1344.
203. Kurata, T., et al., *Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases*. Japanese journal of cancer research, 1999. **90**(11): p. 1238-1243.
204. Calvaresi, E.C. and P.J. Hergenrother, *Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer*. Chemical science, 2013. **4**(6): p. 2319-2333.
205. Kim, W.H., et al., *Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications*. Sensors, 2012. **12**(4): p. 5005-5027.
206. Welling, M.M. and R. Alberto, *Performance of a 99mTc-labelled 1-thio-β-D-glucose 2, 3, 4, 6-tetraacetate analogue in the detection of infections and tumours in mice: a comparison with [18F] FDG*. Nuclear Medicine Communications, 2010. **31**(3): p. 239-248.
207. Bronstein, Y., S. Tummala, and E. Rohren, *F-18 FDG PET/CT for detection of malignant involvement of peripheral nerves: case series and literature review*. Clinical nuclear medicine, 2011. **36**(2): p. 96-100.
208. Calvaresi, E.C. and P.J. Hergenrother, *Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer*. Chem Sci, 2013. **4**(6): p. 2319-2333.
209. Liu, P., et al., *Highly water-soluble platinum (II) complexes as GLUT substrates for targeted therapy: improved anticancer efficacy and transporter-mediated cytotoxic properties*. Chemical communications, 2013. **49**(24): p. 2421-2423.
210. Li, H., et al., *Glucose conjugated platinum (II) complex: antitumor superiority to oxaliplatin, combination effect and mechanism of action*. European journal of medicinal chemistry, 2015. **101**: p. 400-408.
211. Patra, M., et al., *A potent glucose-platinum conjugate exploits glucose transporters and preferentially accumulates in cancer cells*. Angewandte Chemie, 2016. **128**(7): p. 2596-2600.
212. Barnett, J., G. Holman, and K. Munday, *Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte*. Biochemical journal, 1973. **131**(2): p. 211-221.
213. Mueckler, M. and C. Makepeace, *Model of the exofacial substrate-binding site and helical folding of the human Glut1 glucose transporter based on scanning mutagenesis*. Biochemistry, 2009. **48**(25): p. 5934-5942.
214. Spinelli, N., E. Defrancq, and F. Morvan, *Glycoclusters on oligonucleotide and PNA scaffolds: synthesis and applications*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(11): p. 4557-73.
215. Barros, L.F., et al., *Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes*. Journal of neurochemistry, 2009. **109**: p. 94-100.
216. Speizer, L., R. Haugland, and H. Kutchai, *Asymmetric transport of a fluorescent glucose analogue by human erythrocytes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1985. **815**(1): p. 75-84.
217. Yi, Y., et al., *Glucose-linked sub-50-nm unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles for targeted siRNA delivery to glucose transporter 1-overexpressing breast cancer stem-like cells*. Journal of Controlled Release, 2019. **295**: p. 268-277.
218. Park, K., *The beginning of the end of the nanomedicine hype*. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, 2019. **305**: p. 221-222.

219. Sindhwani, S., et al., *The entry of nanoparticles into solid tumours*. Nature materials, 2020. **19**(5): p. 566-575.
220. Miller, M.A., et al., *Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt (IV) pro-drug*. Nature communications, 2015. **6**(1): p. 8692.
221. Misra, C., et al., *Biodegradable self-assembled nanocarriers as the drug delivery vehicles*, in *Nanoparticle Therapeutics*. 2022, Elsevier. p. 293-325.
222. Brust, M., et al., *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1994(7): p. 801-802.
223. Porret, E., et al., *Influence of the spatial conformation of charged ligands on the optical properties of gold nanoclusters*. The Journal of Physical Chemistry C, 2019. **123**(43): p. 26705-26717.
224. Häkkinen, H., *The gold-sulfur interface at the nanoscale*. Nature chemistry, 2012. **4**(6): p. 443-455.
225. Pensa, E., et al., *The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model*. Accounts of chemical research, 2012. **45**(8): p. 1183-1192.
226. Porret, E., et al., *Influence of the Spatial Conformation of Charged Ligands on the Optical Properties of Gold Nanoclusters*. The Journal of Physical Chemistry C, 2019. **123**(43): p. 26705-26717.
227. Huang, X. and M.A. El-Sayed, *Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy*. Journal of advanced research, 2010. **1**(1): p. 13-28.
228. Yu, Y., et al., *Identification of a highly luminescent Au<sub>22</sub> (SG) 18 nanocluster*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(4): p. 1246-1249.
229. Bayley, H., et al., *Droplet interface bilayers*. Molecular BioSystems, 2008. **4**(12): p. 1191-1208.
230. Fleury, J.-B., *Enhanced water permeability across a physiological droplet interface bilayer doped with fullerenes*. RSC advances, 2020. **10**(33): p. 19686-19692.
231. Faugeras, V., et al., *Impact of cyclization and methylation on peptide penetration through droplet interface bilayers*. Langmuir, 2022. **38**(18): p. 5682-5691.
232. Fröhlich, E., *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. International journal of nanomedicine, 2012: p. 5577-5591.
233. Weiss, M., et al., *Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential*. Journal of nanobiotechnology, 2021. **19**(1): p. 1-19.
234. Porret, E., et al., *Augmented interaction of multivalent arginine coated gold nanoclusters with lipid membranes and cells*. RSC Adv, 2020. **10**(11): p. 6436-6443.
235. Nishino, M., et al., *Measurement and visualization of cell membrane surface charge in fixed cultured cells related with cell morphology*. PLoS One, 2020. **15**(7): p. e0236373.
236. Leventis, P.A. and S. Grinstein, *The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes*. Annual review of biophysics, 2010. **39**: p. 407-427.
237. Mudalige, T., et al., *Characterization of nanomaterials: Tools and challenges*. Nanomaterials for food applications, 2019: p. 313-353.
238. Wu, J., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application*. Journal of Personalized Medicine, 2021. **11**(8): p. 771.
239. Yahia-Ammar, A., et al., *Self-assembled gold nanoclusters for bright fluorescence imaging and enhanced drug delivery*. ACS nano, 2016. **10**(2): p. 2591-2599.
240. Al-Jumaili, B.E., et al. *The correlation of blue shift of photoluminescence and morphology of silicon nanoporous*. in *AIP Conference Proceedings*. 2016. AIP Publishing.
241. Trwoga, P., A. Kenyon, and C. Pitt, *Modeling the contribution of quantum confinement to luminescence from silicon nanoclusters*. Journal of applied physics, 1998. **83**(7): p. 3789-3794.
242. Yin, H., et al., *Non-viral vectors for gene-based therapy*. Nature Reviews Genetics, 2014. **15**(8): p. 541-555.
243. Hill, A.B., et al., *Overcoming gene-delivery hurdles: physiological considerations for nonviral vectors*. Trends in biotechnology, 2016. **34**(2): p. 91-105.
244. Chen, J., et al., *Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery*. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2016. **3**.
245. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nature protocols, 2006. **1**(5): p. 2315-2319.
246. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 136-51.
247. Jiang, X., et al., *Recent applications of click chemistry in drug discovery*. Expert opinion on drug discovery, 2019. **14**(8): p. 779-789.
248. Abellán Flos, M., et al., *Potent glycosidase inhibition with heterovalent fullerenes: Unveiling the binding modes triggering multivalent inhibition*. Chemistry-A European Journal, 2016. **22**(32): p. 11450-11460.
249. Ekholm, F.S., et al., *Introducing glycolinkers for the functionalization of cytotoxic drugs and applications in antibody-drug conjugation chemistry*. ChemMedChem, 2016. **11**(22): p. 2501-2505.

- 
250. Mahmoudian, J., et al., *Comparison of the photobleaching and photostability traits of Alexa Fluor 568-and fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody*. Cell Journal (Yakhteh), 2011. **13**(3): p. 169.
251. Ma, J., et al., *Photostability of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells: the effect of photo-oxidation*. Nanotechnology, 2006. **17**(9): p. 2083.
252. Siebeneicher, H., et al., *Identification and Optimization of the First Highly Selective GLUT1 Inhibitor BAY-876*. ChemMedChem, 2016. **11**(20): p. 2261-2271.
253. Wolkers, W.F., et al., *Temperature dependence of fluid phase endocytosis coincides with membrane properties of pig platelets*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2003. **1612**(2): p. 154-163.
254. Drin, G., et al., *Peptide delivery to the brain via adsorptive-mediated endocytosis: advances with SynB vectors*. AAPS PharmSci, 2002. **4**: p. 61-67.
255. Liu, Q., et al., *Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(11): p. 5525-5530.
256. Wah, D.A., et al., *Structure of Fok I has implications for DNA cleavage*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10564-10569.
257. Boettcher, M. and M.T. McManus, *Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR*. Molecular cell, 2015. **58**(4): p. 575-585.
258. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends in biotechnology, 2013. **31**(7): p. 397-405.
259. Wang, H., et al., *Update on nanoparticle-based drug delivery system for anti-inflammatory treatment*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **9**: p. 630352.
260. Gavas, S., S. Quazi, and T.M. Karpiński, *Nanoparticles for cancer therapy: current progress and challenges*. Nanoscale research letters, 2021. **16**(1): p. 173.
261. Mender, I. and J.W. Shay, *Telomere dysfunction induced foci (TIF) analysis*. Bio-protocol, 2015. **5**(22): p. e1656-e1656.
262. Dimick, S.M., et al., *On the meaning of affinity: cluster glycoside effects and concanavalin A*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(44): p. 10286-10296.
263. Lee, Y.C. and R.T. Lee, *Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology*. Accounts of chemical research, 1995. **28**(8): p. 321-327.
264. Ozaki, K., et al., *The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages*. Glycoconjugate journal, 1995. **12**: p. 268-274.
265. Jeong, W.-j., et al., *Peptide-nanoparticle conjugates: a next generation of diagnostic and therapeutic platforms?* Nano Convergence, 2018. **5**(1): p. 1-18.
266. Hamill, S., E.K. Cloherty, and A. Carruthers, *The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites*. Biochemistry, 1999. **38**(51): p. 16974-16983.
267. Braet, H., et al., *The effect of electrostatic high pressure nebulization on the stability, activity and ex vivo distribution of ionic self-assembled nanomedicines*. Acta Biomaterialia, 2023.
268. Berardinelli, F., et al., *The G-quadruplex-stabilising agent RHPS4 induces telomeric dysfunction and enhances radiosensitivity in glioblastoma cells*. DNA repair, 2015. **25**: p. 104-115.